

**Streszczenie pracy doktorskiej mgr Patrycji Bronowickiej-Adamskiej pt.: „*Study of the activity and expression of the enzymes involved in the formation of hydrogen sulfide in various experimental systems*”**

**Streszczenie.**

Siarkowodor (H<sub>2</sub>S) jest obok tlenu azotu oraz tlenu węgla kolejnym nieorganicznym gazowym mediatorem. H<sub>2</sub>S jest lipofilny - jego wnikanie do komórek nie wymaga transporterów. Jest produkowany endogennie w wątrobie, nerkach, mózgu oraz wielu innych tkankach ludzkich i ssaczych. Jego synteza odbywa się przy udziale enzymów, których kofaktorem jest fosforan pirydoksalu: beta-syntazy cystationinowej (CBS, EC 4.2.1.22), gamma-cystationazy (CTH, EC 4.4.1.1) oraz zależnej od jonów cynku transferazy siarkowej 3-merkaptopirogronianu (MPST, EC 2.8.1.2). H<sub>2</sub>S może być wytwarzany enzymatycznie z L-cysteiny, L-cystyny, 3-merkaptopirogronianu, L-homocysteiny oraz D-cysteiny. Synteza H<sub>2</sub>S z D-cysteiny odbywa się przy udziale MPST i oksydazy D-aminokwasowej (DAO). H<sub>2</sub>S może być również uwalniany nieenzymatycznie z nadsiaczków w warunkach redukujących.

Celem podjętych badań było oznaczanie tworzenia H<sub>2</sub>S w różnych tkankach oraz hodowlach komórkowych poprzez badanie aktywności enzymów mających znaczenie dla jego powstawania i metabolizmu (CBS, CTH, MPST, TST) oraz oznaczanie poziomu H<sub>2</sub>S w tkankach prawidłowych i objętych stanem zapalnym. Opracowana została metoda oznaczania aktywności układu enzymatycznego CBS/CTH w obecności homoseryny (substrat dla CBS) oraz cystationiny (substrat dla CTH). W celu analizowania zmian stężenia cystationiny (produktu przekształcenia homoseryny przez CBS) zmodyfikowana została metoda RP-HPLC (Dominik i wsp., 2011). Modyfikacja pozwoliła również na oznaczanie, w czasie jednego rozdziału, poziomu zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) glutationu, cysteiny (CSH), cystyny (CSSC) oraz cystationiny.

Doświadczenia związane z modyfikacją metody RP-HPLC zostały przeprowadzone w homogenatach tkankowych pochodzących z różnych regionów mózgu ludzkich. Efektem tych badań było zarówno opracowanie modyfikacji, jak również oznaczenie poziomu cystationiny w badanych tkankach. Najwyższy poziom cystationiny oznaczono we wzgórzu i był on około 11 razy większy w porównaniu do mózdzku. Wysoki poziom cystationiny we wzgórzu był skorelowany z niską aktywnością CTH. Najwyższy poziom cysteiny oznaczono we wzgórzu, podwzgórzu i jądrach podkorowych. Wysoki poziom cysteiny we wzgórzu był związany z wysokim poziomem GSH. Sugerowana jest rola cystationiny w mózgu ludzkim jako neuromodulatora, oprócz jej udziału w metabolizmie cysteiny i tworzeniu H<sub>2</sub>S. Wysoki poziom cystationiny w niektórych regionach mózgu ludzkiego może być związany z wysoką aktywnością CBS. CBS podobnie jak CTH katalizuje reakcje, w których powstaje H<sub>2</sub>S [Publikacja nr 1].

Kolejnym etapem badań było opracowanie metody oznaczania aktywności układu enzymatycznego CBS/CTH, ważnego zarówno w tworzeniu H<sub>2</sub>S w tkankach, jak i w dostarczaniu cysteiny do syntezy glutationu. Prace doświadczalne zostały przeprowadzone w homogenatach wątroby, nerek oraz mózgu myszy przy użyciu dwóch substratów: homoseryny oraz cystationiny. Aktywność CTH badano na podstawie przyrostu stężenia  $\alpha$ -ketomaślanu (produktu reakcji katalizowanej przez CTH). Metoda po raz pierwszy została opisana w Publikacji nr 2. Aktywność CBS oznaczano na podstawie zmian poziomu cystationiny w homogenacie zawierającym inhibitor CTH - D,L-propargylglicynę (PPG) w stężeniu całkowicie hamującym aktywność CTH. W tkankach myszy aktywność CBS najwyższa była w mózgu. W mózgu myszy nie stwierdzono aktywności CTH, co potwierdziło główną rolę CBS w wytwarzaniu H<sub>2</sub>S. W obecności homoseryny oznaczano w mózgu zwiększony poziom cystationiny, co potwierdza wysoką aktywność CBS. W wątrobie

niski, w porównaniu do mózgu, poziom cystationiny oraz wysoki poziom  $\alpha$ -ketomałšanu, są związane z wysoką aktywnością CTH. Równocześnie wysoki poziom GSH w homogenatach wątroby myszy, świadczy o roli CBS i CTH w dostarczaniu cysteiny do syntezy GSH [Publikacja nr 2].

Opracowaną metodę oznaczania aktywności układu enzymatycznego CBS/CTH zastosowano do porównania dwóch linii komórkowych: neuroblastomy ludzkiej (linia SH-SY5Y) oraz glioblastomy - astrocytomy ludzkiej (linia U87-MG) w zakresie ich potencjalnych możliwości w tworzeniu siarkowodoru. Kolejną metodą wdrożoną w czasie realizacji projektu była metoda oznaczania poziomu  $H_2S$  wiązanego w warstwie agarozy i dostosowanie jej do oznaczeń w hodowlach komórkowych oraz homogenatach tkankowych. Badania wykazały, że linie: U-87 MG oraz SH-SY5Y są zdolne do tworzenia siarkowodoru w obecności L-cysteiny, odpowiednio o 20% dla linii SH-SY5Y oraz 5% dla linii U-87 MG w porównaniu do komórek kontrolnych bez L-cysteiny. W obu liniach komórkowych potwierdzono również aktywność MPST, CBS oraz CTH. Stwierdzono, że aktywność badanych enzymów w neuroblastomie ludzkiej jest większa w porównaniu do komórek glioblastomy ludzkiej i największą aktywność właściwą oznaczono dla MPST. Sugeruje to, że komórki neuroblastomy mają potencjalnie większą zdolność do tworzenia  $H_2S$  z cysteiny niż komórki astrocytomy i głównym enzymem odpowiedzialnym za wytwarzanie siarkowodoru z cysteiny w tych komórkach jest MPST. Aktywność enzymów zależy od ekspresji genów, co zasugerowało konieczność opracowania warunków badania ekspresji na poziomie mRNA oraz białka dla badanych enzymów. Przeprowadzone badania potwierdziły największą ekspresję MPST w komórkach neuroblastomy. W komórkach glioblastomy ludzkiej (U-87 MG) oznaczono wysoki poziom glutationu, co wydaje się mieć zasadnicze znaczenie dla ochrony neuronów, np. przed toksycznym działaniem reaktywnych form tlenu. Ponad trzykrotnie większy poziom siarki sulfanowej w komórkach glioblastomy ludzkiej może sugerować możliwość nieenzymatycznego uwalniania  $H_2S$  z tej puli w warunkach redukujących [Publikacja nr 3].

Metody przedstawione w publikacjach 1, 2, 3 pozwoliły na badanie w różnych układach doświadczalnych udziału poszczególnych enzymów - CBS, CTH i MPST w tworzeniu  $H_2S$  oraz na ilościowe oznaczanie tworzenia  $H_2S$ .

Ostatnim etapem badań było zastosowanie wcześniej opracowanych metod do określenia tworzenia  $H_2S$  w żołądkach szczurzych ze śluzówką uszkodzoną, z owrzodzeniami, będącymi wynikiem stresu wynikającego z oziębienia i unieruchomienia w wodzie (WRS) w porównaniu do żołądków z nieuszkodzoną śluzówką. Badano również wpływ prekursora  $H_2S$  – NaHS, podanego przed wywołaniem uszkodzeń śluzówki, na powstawanie i gojenie się uszkodzeń wywołanych stresem. W pierwszym etapie badań potwierdzono, że  $H_2S$  jest wytwarzany w błonie śluzowej żołądka zdrowych szczurów. Potwierdzono ekspresję czterech enzymów: MPST, CTH, CBS, TST, biorących udział w tworzeniu  $H_2S$  oraz w metabolizmie siarki sulfanowej. Oznaczona aktywność MPST i CTH oraz nieoznaczalna aktywność CBS sugerują, że MPST i CTH są głównymi enzymami odpowiedzialnym za wytwarzanie  $H_2S$  w prawidłowej błonie śluzowej żołądka. W homogenatach błony śluzowej żołądków szczurów z regionów z owrzodzeniami zaobserwowano 2-3-krotnie większą zdolność do tworzenia  $H_2S$  w porównaniu do błony śluzowej żołądka zdrowych szczurów, co sugeruje, że może to być wynikiem zwiększonej aktywności enzymów w stanie zapalnym. Potwierdzono trzykrotnie zwiększoną aktywność CTH, podwyższoną aktywność MPST i TST oraz wzrost aktywności CBS do wartości oznaczalnych w grupie WRS. Nie stwierdzono natomiast zmian w ekspresji badanych enzymów w porównaniu do zdrowej błony śluzowej żołądka. Podobnie, poziom siarki sulfanowej był porównywalny z poziomem siarki sulfanowej w zdrowej śluzówce. Poziom GSH i GSSG był natomiast znacznie obniżony w porównaniu do zdrowej błony śluzowej

żołądka. Uzyskane wyniki wskazują na to, że w stresie, który prowadzi do uszkodzenia śluzówki żołądka wzrasta produkcja siarkowodoru, co ma korzystny wpływ na proces gojenia uszkodzonej śluzówki. Szczury, którym podawano NaHS, wykazywały zmniejszoną zdolność do tworzenia endogennego H<sub>2</sub>S w błonie śluzowej z owrzodzeniami i zmiany niektórych parametrów biochemicznych (z wyjątkiem aktywności MPST i CTH oraz poziomu cysteiny) w kierunku wartości oznaczonych w zdrowej błonie śluzowej. Przeprowadzone badania potwierdziły, że endogenne H<sub>2</sub>S oraz H<sub>2</sub>S uwolniony z donorów (NaHS) chroni błonę śluzową żołądka, co jak można przypuszczać związane jest ze zwiększeniem przepływu w naczyniach [Publikacja nr 4].

Wyniki przedstawione w zaprezentowanych publikacjach przyczyniły się do opracowania metod badania aktywności układu enzymatycznego CBS/CTH, metod badania ekspresji enzymów odpowiedzialnych za wytwarzanie siarkowodoru w tkankach ludzkich, mysich, szczurzych i hodowlach komórkowych oraz metod oznaczania poziomu H<sub>2</sub>S. Badania z wykorzystaniem opracowanych metod pozwoliły na określenie możliwości różnych tkanek (wątroba, nerki, mózg) oraz komórek nowotworowych (komórki ludzkie układu nerwowego: linia SH-SY5Y i U87-MG) w zakresie tworzenia H<sub>2</sub>S oraz na wyjaśnienie roli H<sub>2</sub>S w wywołanym stresem procesie zapalnym, związanym z uszkodzeniem śluzówki żołądka szczurów. Uzyskane wyniki dają podstawę do dalszych badań w kierunku wyjaśnienia roli H<sub>2</sub>S w schorzeniach związanych ze zmianą jego poziomu oraz w kierunku modulowania poziomu H<sub>2</sub>S zarówno poprzez stosowanie różnych szybko lub wolno uwalniających prekursorów H<sub>2</sub>S, jak i poprzez zmiany aktywności oraz ekspresji (wyciszenie genów) enzymów odpowiedzialnych za tworzenie siarkowodoru.

### **Summary.**

Apart from nitric oxide and carbon monoxide, hydrogen sulphide (H<sub>2</sub>S) is another inorganic gaseous mediator. H<sub>2</sub>S is lipophilic - its penetration into cells does not require transporters. It is produced endogenously in the liver, kidneys, brain and many other human and mammalian tissues. Its synthesis is carried out with the participation of enzymes, where the co-factor is pyridoxal phosphate: cystathionine beta-synthase (CBS, EC 4.2.1.22), gamma-cystathionase (CTH, EC 4.4.1.1) and zinc ions-dependent 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST, EC 2.8.1.2). H<sub>2</sub>S can be produced enzymatically from L-cysteine, L-cystine, 3-mercaptopyruvate, L-homocysteine and D-cysteine. The synthesis of H<sub>2</sub>S from D-cysteine takes place with the participation of MPST and D-amino acids oxidase (DAO). H<sub>2</sub>S can be also released non-enzymatically from the persulfates under reducing conditions.

The aim of the study were to determine the production of H<sub>2</sub>S in various tissues and cell cultures by examining the activity of the enzymes responsible for its formation and metabolism (CBS, CTH, MPST, TST) and to determine H<sub>2</sub>S levels in healthy and inflammatory tissues. A method of determination the activity of the CBS/CTH tandem in the presence of homoserine (CBS substrate) and cystathionine (CTH substrate) was developed. For the analysis of changes in cystathionine concentration (a product of homoserine transformation by CBS), the RP-HPLC method was modified (Dominick et al., 2011). The modification also allowed for determination, during one separation, of the level of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, cysteine (CSH), cystine (CSSC) and cystathionine.

The experiments related to RP-HPLC modification were carried out in homogenates of tissue from different regions of the human brains. The effects of these studies were developing a modification and also determining the level of cystathionine in the examined tissues. The highest level of cystathionine was detected in the thalamus and it was about 11 times higher as compared to the cerebellum. A high level of cystathionine in the thalamus was correlated with a low CTH activity. The highest level of cysteine was detected in the

thalamus, hypothalamus and subcortical nucleus. A high level of cysteine in the thalamus was associated with a high level of GSH. The role of cystathionine as a neuromodulator has been suggested in the human brain, in addition to its contribution to cysteine metabolism and production of H<sub>2</sub>S. A high level of cystathionine in some regions of the human brain might be associated with a high CBS activity. CBS, similarly as CTH, catalyzes reactions, in which H<sub>2</sub>S is produced [Publication No1].

The next step in the study, important for the production of H<sub>2</sub>S in tissues and for delivery of cysteine to GSH synthesis, was developing a method for determination of the activity of the CBS/CTH tandem. The research was carried out in homogenates of the mouse liver, kidneys and brain in the presence of two substrates: homoserine and cystathionine. The CTH activity was examined through the increase of the amount of  $\alpha$ -ketobutyrate (a product of catalyzed reaction through CTH). The method was described for the first time in Publication No. 2. A difference in the cystathionine levels between the homogenates with totally CTH-inhibiting PPG concentrations and without the inhibitor was employed to evaluate the activity of CBS. The CBS activity was the highest in the mice brain. The CTH activity was undetectable in the mice brain, which was confirmed by the major role of CBS in H<sub>2</sub>S production. In the presence of homoserine, increased levels of cystathionine were determined in the brain, which confirmed the high CBS activity. In the liver, the low – as compared to the brain - level of cystathionine and high levels of  $\alpha$ -ketobutyrate were associated with a high CTH activity. Simultaneously, a high level of GSH indicated the main role of CBS and CTH in delivering cysteine for GSH synthesis in homogenates of the mouse liver [Publication No. 2].

A method was developed for determination of the activity of the CBS/CTH tandem and used to compare potential possibilities of H<sub>2</sub>S generation in two cell lines: the human neuroblastoma (SH-SY5Y cells) and the human glioblastoma (U87-MG cells). Another method employed during the project was determination of the amount of H<sub>2</sub>S bound in the agarose layer and its adaptation to analysis in the cell cultures and homogenates of tissues. The studies showed the U-87 MG and SHSY5Y cells capacity of hydrogen sulfide formation from L-cysteine, 20% for SH-SY5Y cells and 5% for U-87 MG cells, respectively, as compared to the control cells without L-cysteine. The activities of MPST, CBS and CTH were also confirmed in both the cell lines. A higher activity of the investigated enzymes was found in the neuroblastoma cells as compared to the astrocytoma cells, and the highest appropriate activity of MPST was examined. The findings suggested that the neuroblastoma cells had a potentially higher capacity of H<sub>2</sub>S generation from cysteine than the astrocytoma cells, and MPST was the main enzyme responsible for H<sub>2</sub>S production from cysteine in either of the cell lines. The activity of the enzymes depended on gene expression, which suggested a necessity of determining the conditions necessary for analyzing the expression (mRNA and protein) for the investigated enzymes. The results confirmed the highest expression of MPST in the neuroblastoma cells. The human glioblastoma cells (U-87 MG cells) demonstrated a higher level of GSH in comparison to the neuroblastoma cells, what seemed to be essential for neuron protection, e.g. against the toxicity of reactive oxygen species. The sulfane sulfur level was more than three-fold higher in the human glioblastoma cells, which might suggest a nonenzymatic release of H<sub>2</sub>S from sulfane sulfur-containing compounds under reducing conditions [Publication No. 3].

The methods presented in the publications No. 1, 2, 3 allowed for studying the participation of several enzymes - CBS, CTH and MPST - in the production of H<sub>2</sub>S in various experimental systems, as well as for quantitative determination of H<sub>2</sub>S.

The final step in the research was employing the previously developed methods to determine the production of H<sub>2</sub>S in rat stomachs with damaged mucosa, with ulcers, caused by stress and immobilization in cold water (WRS) in comparison to the healthy mucosa.

The effect of NaHS – a precursor of H<sub>2</sub>S, administered prior to WRS, on the production and healing of stress-induced damage was also investigated. In the first stage of the research, it was confirmed that H<sub>2</sub>S was produced in the gastric mucosa of healthy rats. The results confirmed the expression of MPST, CTH, CBS and TST involved in the production of H<sub>2</sub>S and the metabolism of sulfane sulfur. In the gastric mucosa of healthy rats, the activity of MPST and CTH were determined, the activity of CBS was undetectable, what suggested the main role of MPST and CTH in H<sub>2</sub>S production. The gastric mucosa of rats with ulcers had a 2–3-fold higher ability to generate H<sub>2</sub>S in comparison to the gastric mucosa of healthy rats, what suggested increased activities of the enzymes in the inflammatory process. A three-fold increase of the CTH activity, the elevated activity of MPST and TST and the increased activity of CBS were confirmed as compared to the healthy mucosa. No increased expression of the investigated enzymes was found when compared to the healthy mucosa. Similarly, the level of sulfane sulfur was comparable to that in the healthy mucosa. The GSH and GSSG levels were significantly decreased as compared to the healthy mucosa. These results may suggest that a higher capability of H<sub>2</sub>S generation by ulcerated mucosa resulted from an increased specific activity of the enzymes involved in the process, which had a beneficial effect on the healing process of the damaged mucosa. The rats administered NaHS demonstrated a decreased ability of endogenous H<sub>2</sub>S generation in the gastric mucosa and changes of some biochemical parameters (except the MPST and CTH activities and the level of cysteine) back to the values found in the healthy tissue.

The research confirmed that endogenous H<sub>2</sub>S and H<sub>2</sub>S released from the donors (NaHS) protected the gastric mucosa, which may be associated with an increase in gastric flow [Publication No. 4].

The results shown in the presented publications contributed to the development of methods of determining the activity of the enzyme CBS/CTH tandem, expression of the enzymes responsible for the production of hydrogen sulfide in the human, mouse and rat tissues and cell cultures, and methods of determining the amount of H<sub>2</sub>S. The research using the developed methods allowed for defining the capabilities of different tissues (the liver, kidneys, brain) and cancer/tumor cells (human cells of the nervous system: the SH-SY5Y cells and U87-MG cells) in the production of H<sub>2</sub>S and explained the role of H<sub>2</sub>S in the inflammation caused by stress, associated with damage to the gastric mucosa.

The results provide the foundation for further research aiming at explanation of the role of H<sub>2</sub>S in conditions associated with the changes of its level and at modulating the amount of H<sub>2</sub>S through using a variety of fast or slow-release H<sub>2</sub>S precursors, as well as through changes of the activity and expression (gene-silencing) of enzymes participating in the production of hydrogen sulfide.