

# Detektion von Persulfidbildung an Proteinen (S-Sulfhydrierung) mithilfe einer Tag-Switch-Technik\*\*

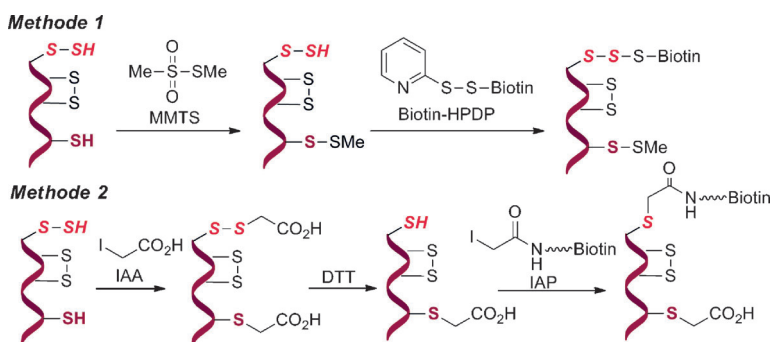
Dehui Zhang, Igor Macinkovic, Nelmi O. Devarie-Baez, Jia Pan, Chung-Min Park, Kate S. Carroll, Milos R. Filipovic\* und Ming Xian\*

**Abstract:** Protein-Persulfidbildung (die Bildung von -S-SH-Addukten aus Cysteinresten) ist eine vor kurzem entdeckte oxidative posttranslationale Modifikation, die eine wichtige Rolle bei H<sub>2</sub>S-vermittelten Signalwegen spielt. Hier berichten wir über die erste selektive „Tag-Switch“-Methode, mit der Protein-Persulfidreste direkt markiert werden können, um stabile Thioether-Konjugate zu bilden. Des Weiteren zeigen wir, dass H<sub>2</sub>S allein nicht zur Persulfidbildung führen kann und dass die beiden möglichen physiologischen Mechanismen eine Reaktion mit Protein-Sulfensäuren (P-SOH) oder die Beteiligung von Metallzentren umfassen, die die Oxidation von H<sub>2</sub>S zu HS<sup>•</sup> ermöglichen.

Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S) wurde vor kurzem als ein wichtiges Molekül der Zellkommunikation eingestuft.<sup>[1]</sup> Veröffentlichungen der letzten Jahre lassen zunehmend darauf schließen, dass H<sub>2</sub>S eine vermittelnde Rolle bei vielen physiologischen und/oder pathologischen Vorgängen einnimmt.<sup>[2]</sup> Einige dieser Effekte werden der Bildung von Protein-Persulfiden, auch S-Sulfhydrierung genannt (d.h. der Umwandlung von Cysteinresten -SH zu Persulfiden -S-SH), zugeschrieben. Dieser Vorgang wurde als neue oxidative posttranslationale Modifikation (oxidative post-translational modification, oxPTM) definiert.<sup>[3,4]</sup> Die Bildung von Persulfiden könnte von Bedeutung sein, da sie einen Mechanismus darstellt, über den H<sub>2</sub>S die

Funktionen eines breiten Spektrums zellulärer Proteine und Enzyme modifiziert.<sup>[5]</sup> Zum jetzigen Zeitpunkt sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Persulfidbildung mithilfe von H<sub>2</sub>S immer noch unklar.<sup>[3,4]</sup> Ein großes Problem ist, dass der Persulfidrest (-S-SH) eine Reaktivität aufweist, die der von anderen Schwefelverbindungen (vor allem von Thiolen (-SH)) ähnelt. Dies führt zu Schwierigkeiten bei der Entwicklung selektiver Detektionsmethoden für die Persulfidbildung.<sup>[4]</sup>

Bislang wurden zwei Methoden angewendet, um Persulfidbildung zu detektieren (Schema 1). Die erste Methode ist eine Biotin-Switch-Technik.<sup>[5a]</sup> Hierbei wird die alkylierende Verbindung S-Methylmethanthiosulfonat (MMTS) eingesetzt, um Thiole und Persulfide zu unterscheiden. Zunächst



Schema 1. Gegenwärtige Strategien zur Detektion von Persulfidbildung.

[\*] Dr. D. Zhang,<sup>[‡]</sup> Dr. N. O. Devarie-Baez, Dr. C.-M. Park, Prof. M. Xian  
Department of Chemistry, Washington State University  
Pullman, WA 99164 (USA)  
E-Mail: mxian@wsu.edu

I. Macinkovic,<sup>[‡]</sup> Dr. M. R. Filipovic  
Department Chemie und Pharmazie  
Universität Erlangen-Nürnberg  
Erlangen (Deutschland)  
E-Mail: milos.filipovic@fau.de

Dr. J. Pan, Prof. K. S. Carroll  
Department of Chemistry  
The Scripps Research Institute  
Jupiter, FL 33458 (USA)

[†] Diese Autoren haben zu gleichen Teilen zu der Arbeit beigetragen.

[\*\*] M.X. dankt NSF-CAREER (0844931) und bedankt sich für einen American Chemical Society-Teva USA Scholar Grant. M.R.F. und I.M. danken für die Unterstützung durch die Universität Erlangen-Nürnberg im Rahmen der Emerging Field Initiative (EFI-MRIC). K.S.C. dankt NIH R01 GM102187.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201305876> zu finden.

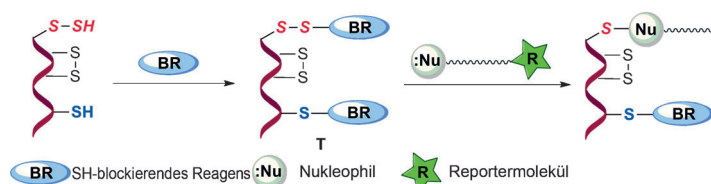
werden Thiolreste (-SH) in Proteinen durch MMTS blockiert. Von Persulfiden (-S-SH) nimmt man an, dass sie nicht reagieren und daher für eine anschließende Konjugation an N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid (Biotin-HPDP) zur Verfügung stehen. Mit Methode wurden zahlreiche Proteine als Targets der Persulfidbildung identifiziert, und der grundlegende Grad der Sulfhydrierung einiger Proteine wurde auf 25 % geschätzt. Bei Methode 2<sup>[5c]</sup> wird vorgeschlagen, das sowohl -SH als auch -SSH von alkylierenden Reagentien wie Iodessigsäure (IAA) blockiert werden können. Dann können die Persulfidaddukte mit Dithiotreitol (DTT) zu freien -SH-Resten reduziert werden und mit Iodacetamid-gebundenem Biotin (IAP) markiert werden.

Aus chemischer Sicht sind beide Vorgehensweisen problematisch. Bei Methode 1 bleibt der zugrundeliegende Mechanismus der Selektivität von MMTS für das Thiol gegenüber dem Persulfid unklar. Forschungen belegen, dass Persulfide und Thiole ähnliche Reaktivitäten mit Elektrophilen wie MMTS aufweisen sollten.<sup>[4]</sup> Bei Methode 2 bleibt unklar,

wie DTT als Reduktionsmittel selektiv Persulfid-Modifikationen von anderen, durch DTT reduzierbaren Resten wie Disulfiden und *S*-Nitrosothiolen, unterscheiden kann.

Folglich sind die chemischen Grundlagen der derzeitigen Methoden zweifelhaft, was zu fehlerhaften Ergebnissen führen könnte. Offenbar sind verlässlichere Methoden zur Detektion von Persulfidbildung an Proteinen vonnöten. Nachdem wir erkannt hatten, dass Thiole und Persulfide sehr ähnliche Reaktivitäten aufweisen, schlugen wir eine Tag-Switch-Technik vor, um Persulfidbildung nachzuweisen. Hier beschreiben wir die Entwicklung und die Anwendung dieser Methode.

Wie in Schema 2 illustriert, schlagen wir vor, dass Persulfidbildung selektiv mithilfe einer Tag-Switch-Methode detektiert werden kann (d.h. mithilfe zweier Reagentien, um



**Schema 2.** Vorgeschlagene Tag-Switch-Technik der Persulfidbildung.

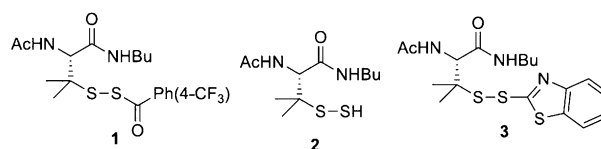
Persulfidreste an Proteinen in zwei Schritten zu markieren). Im ersten Schritt wird eine Verbindung eingeführt, die den SH-Rest blockiert und sowohl -SH als auch -SSH unter Bildung des Intermediates **T** markieren sollte. Wenn ein geeignetes Tag verwendet wird, können die Disulfidbindungen in Persulfidaddukten eine deutlich höhere Reaktivität gegenüber bestimmten Nukleophilen aufweisen, als herkömmliche Disulfide in Proteinen dies tun. Deshalb waren wir in der Lage, ein Tag-Switch-Molekül (das sowohl das Nukleophil als auch ein Reportermolekül wie Biotin enthält) einzuführen, um ausschließlich die Persulfidaddukte zu markieren. Es sollte angemerkt werden, dass es sich bei den Thioetheraddukten aus dem ersten Schritt um Thioether handelt, von denen nicht angenommen wird, dass sie mit dem Nukleophil reagieren.

Bei dieser Technik stellt sich die entscheidende Frage, ob die gerade geknüpfte Disulfidbindung des Persulfidrestes eine Reaktivität für ein geeignetes Nukleophil aufweist, die so spezifisch ist, dass sie sich von herkömmlichen Disulfiden unterscheidet. Thiol-blockierende Verbindungen sind allgemein bekannt.<sup>[6]</sup> Die Zahl entsprechender Substanzen, die die Kriterien für diesen Assay erfüllen, ist jedoch begrenzt. Verbindungen etwa, die Thiole irreversibel blockieren, wie Maleimide und Iodacetamide, zeigen eine gute Selektivität und schnelle Reaktivität.<sup>[6]</sup> Reagieren solche Verbindungen mit Persulfiden, entstehen Alkyl-Disulfid-Addukte, deren Reaktivität sich nicht von derjenigen von Cystein-Disulfiden oder glutathionylierten Protein-Disulfiden unterscheidet. Aus diesem Grund sind solche Verbindungen für einen Tag-Switch ungeeignet. Unsere Idee war, dass eine Verbindung nach der Reaktion mit Persulfiden ein gemischtes aromatisches Disulfid bildet, das die Reaktivitätskriterien erfüllen könnte. Ein potenzieller Kandidat ist Methylsulfonylbenzothiazol (MSBT), eine Thiol-blockierende Verbindung, die kürzlich

von unserer Gruppe entwickelt wurde.<sup>[7]</sup> Wir nahmen an, dass die aus MSBT und Persulfiden entstandenen Disulfide hoch aktiviert sind und eine spezifische Reaktivität mit bestimmten Nukleophilen, vor allem Enolaten, haben.<sup>[8]</sup>

Wir testeten zunächst die Reaktion von MSBT mit Persulfidsubstraten. Da es sich bei MSBT um ein sehr effektives SH-blockierendes Molekül handelt und Persulfide (-S-SH) dafür bekannt sind, eine ganz ähnliche Reaktivität aufzuweisen als Thiole,<sup>[4]</sup> war unsere Erwartung, dass MSBT effektiv Persulfidreste blockieren sollte. Allerdings ist bekannt, dass kleine Persulfidmoleküle sehr instabil sind.<sup>[9]</sup> Wir konnten keine aufgereinigten/isolierten Persulfide bei den Experimenten verwenden. Stattdessen versuchten wir verschiedene Methoden, um Persulfide in situ aus Vorstufen wie **1** zu generieren (Schema S1 in den Hintergrundinformationen)

und verwendeten die Persulfidintermediate direkt zum Blockieren mit MSBT. Tatsächlich erhielten wir das gewünschte Produkt **3**, wenn auch nur in geringer Ausbeute (13 %). Dieser Befund zeigt, dass MSBT mit Persulfiden unter Bildung von R-S-S-BT-Addukten reagieren kann. Als Hauptprodukte der Reaktion wurden von Persulfid **2** abgeleitete Polysulfide gefunden. Dies sollte Persulfide an Proteinen nicht betreffen, da Polysulfidbildung an Protein-Persulfiden nicht ohne weiteres zu erwarten ist.



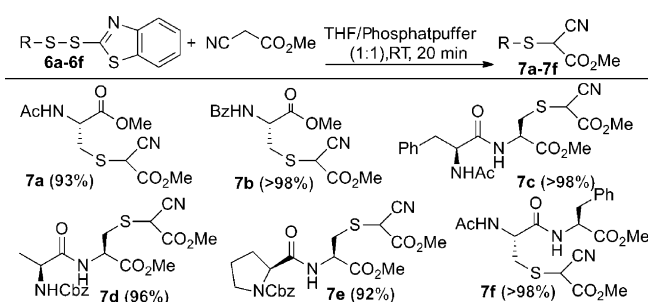
Wir verwendeten als nächstes ein Cysteinsubstrat **4**, um nach einem geeigneten Nukleophil für den Tag-Switch-Schritt zu suchen (Tabelle 1). Die Herstellung von **4** ist in Schema S2 in den Hintergrundinformationen gezeigt. R-S-S-BT-Produkte wie **4** sind recht stabil und reagieren nicht mit potenziell nukleophilen Gruppen wie -OH und -NH<sub>2</sub> (Schema S3 in den Hintergrundinformationen). Wir haben eine Reihe kohlenstoffbasierter Nukleophile als mögliche Kandidaten untersucht. Wie in Tabelle 1 gezeigt, erwiesen sich drei Verbindungen (Dimedon, Malononitril und Methylcyanacetat) als effektiv, und die entsprechenden Produkte **5b**, **5e** und **5f** wurden in guten Ausbeuten erhalten. Die Reaktionen laufen schnell ab und sind nach 20 min abgeschlossen. Unter diesen Kandidaten erschien Methylcyanacetat (MCA; Tabelle 1, Nr. 6) als besonders vielversprechend, da die Esterfunktion eine einfache Ankupplung von Reportermolekülen ermöglicht. Aus diesem Grund wurde MCA für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt.

Angeichts der drastischen Strukturänderungen in Protein-Persulfid-Substraten stellten wir uns die Frage, ob MCA effektiv mit verschiedenen R-S-S-BT-Substraten reagieren kann. Die Bandbreite der Reaktion wurde unter Verwendung einer Reihe von Cystein-S-S-BT-Derivaten untersucht (Schema 3), wobei sich die Reaktion als hocheffektiv erwies. In sämtlichen Fällen wurden die Substitutionsprodukte in guten Ausbeuten erhalten.

**Tabelle 1:** Suche nach Nukleophilen für den Tag-Switch-Schritt.<sup>[a]</sup>

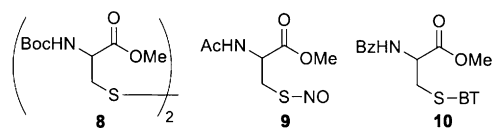
$\text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{S}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{N} \xrightarrow[\text{THF/Phosphatpuffer (1:1), RT}]{\text{Nukleophil}} \text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{Nu}$		
Nr.	Nukleophil	Produkt (Ausb.)
1		$\text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{Cyclopentanedione}$ <b>5a</b> (Spuren)
2		$\text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{Cyclohexanedione}$ <b>5b</b> (85%)
3		$\text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{CO}_2\text{Me}$ <b>5c</b> (Spuren)
4		$\text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{CONHBn}$ <b>5d</b> (Spuren)
5		$\text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{CN}$ <b>5e</b> (60%)
6		$\text{BnHN}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}(\text{NHAc})-\text{S}-\text{CO}_2\text{Me}$ <b>5f</b> (98%)

[a] Bn = Benzyl.

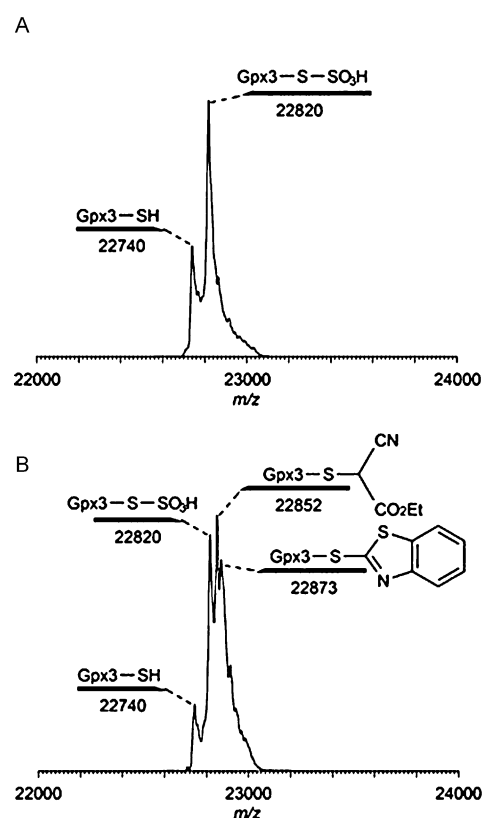


**Schema 3.** Bandbreite der Reaktion von MCA mit R-S-S-BT-Derivaten. Cbz = Benzylchlorformiat.

Wird MCA verwendet, um spezifisch aus Protein-Persulfiden erhaltene R-S-S-BT-Reste zu markieren, ist der Nachweis entscheidend, dass MCA gegenüber herkömmlichen Disulfiden inert ist. Deshalb führten wir einige Kontrollexperimente durch (Schema S5 in den Hintergrundinformationen). Zunächst untersuchten wir die Reaktivität von MCA gegenüber Cys-Disulfiden **8** (Boc = *tert*-Butoxycarbonyl). Unter Tag-Switch-Reaktionsbedingungen wurde das entsprechende Produkt nicht beobachtet, nicht einmal nach Stunden. Wir prüften auch die Reaktivität von MCA gegenüber *S*-Nitrosothiol **9**, das ebenfalls eine wohlbekannte Thiolmodifikation in Proteinen ist; erneut wurde keine Reaktion beobachtet. Schließlich wurde ein Crossover-Experiment durchgeführt, bei dem sowohl R-S-BT **10** (abgeleitet von Thiolen) und R-S-S-BT **4** (abgeleitet von Persulfiden) getestet wurden. Wir beobachteten nur Produkt **5f** (aus **4**). Das vom Thiol stammende Substrat **10** war unreaktiv und blieb vollständig erhalten. Diese Befunde deuteten darauf hin, dass die vorgeschlagene Tag-Switch-Methode für Persulfide spezifisch war.



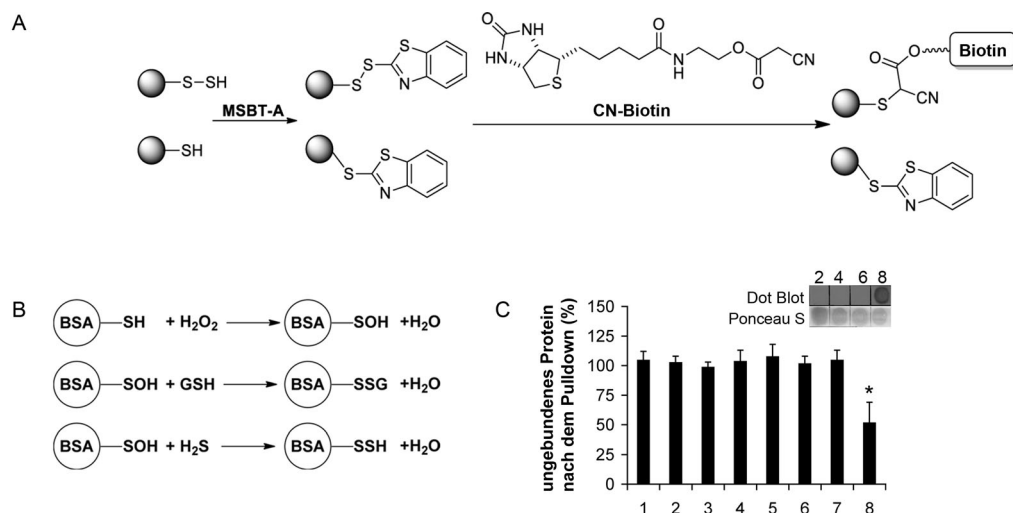
Die obigen Resultate zeigen die chemische Grundlage der Tag-Switch-Methode auf. Anschließend testeten wir die Methode an Proteinproben. Gpx3, ein etabliertes Protein-S-SH-Modell,<sup>[4]</sup> wurde für dieses Experiment verwendet. Frisch vorbereitetes Gpx3-Persulfid wurde mit MSBT-A, einem wasserlöslichen MSBT-Derivat, behandelt,<sup>[7]</sup> und anschließend wurde Cyanacetat zugefügt. Das Protein wurde dann aufgereinigt und mit LC-MS analysiert. Wie in Abbildung 1 B



**Abbildung 1.** Massenspektrometrische Analyse des Tag-Switch-Assays mit Gpx3-Persulfid. A) Kontrollreaktion zwischen Gpx3-Persulfid und Ethylcyanacetat (ohne MSBT-A). B) Reaktion zwischen Gpx3-Persulfid und Ethylcyanacetat (mit MSBT-A).

gezeigt, wurde das Cyanacetat-markierte Protein eindeutig durch MS identifiziert. In der Kontrollprobe (Abbildung 1 A, ohne MSBT-A) beobachteten wir das Signal des Cyanacetat-markierten Proteins nicht. Ein oxidatives Nebenprodukt (P-S-SO<sub>3</sub>H) wurde in beiden Proben beobachtet, was unserer vorherigen Erfahrung nach für Gpx3 häufig der Fall ist.<sup>[4]</sup>

Anschließend testeten wir die Selektivität des Tag-Switch-Assays gegenüber verschiedenen oxPTMs. Ein Biotin-gebundenes Cyanacetat (CN-Biotin) wurde synthetisiert und eingesetzt. Eine relativ stabile Sulfensäure von Rinderse-rumalbumin (BSA-SOH) wurde hergestellt,<sup>[10]</sup> und entspre-

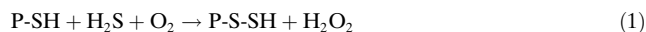


**Abbildung 2.** Test der Selektivität des Tag-Switch-Assays. A) Schematische Beschreibung des Tag-Switch-Assays. B) Präparatives Vorgehen zur Herstellung verschiedener oxPTMs von BSA. C) Prozentuale Verteilung ungebundener Proteine nach Behandlung mit Streptavidin-Agarose-Harz. Proben 1, 3, 5 und 7 sind jeweils unbehandelte Proben von BSA-SH, BSA-SOH, BSA-SSG und BSA-SSH. Proben 2, 4, 6 und 8 sind jeweils mit Tag-Switch-Reagentien behandelte Proben von BSA-SH, BSA-SOH, BSA-SSG und BSA-SSH.  $n=3$ ,  $*p<0.001$ . Der Einschub zeigt die Dot-Blot-Detektion nach erfolgreicher Biotinylierung.

chende glutathionylierte und S-sulphydrierte Derivate wurden in Reaktionen mit Glutathion<sup>[10,11]</sup> und H<sub>2</sub>S generiert (Abbildung 2 A,B). Weder BSA-SH noch BSA-SOH oder BSA-SSG ergaben positive Signale im Tag-Switch-Assay. Im Falle von BSA-SSH konnte biotinyliertes Produkt mit Streptavidin-Agarose-Harz gewonnen und mittels Dot Blot und ESI-TOF-MS detektiert werden (Abbildung 2 C und Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen).

Auch wenn einige Studien nahelegen, dass Persulfidbildung eine potenzielle, H<sub>2</sub>S-vermittelte posttranslationale Modifikation ist, die Proteinfunktionen regulieren kann,<sup>[5]</sup> gibt es zurzeit keine Informationen bezüglich der zugrundeliegenden Bildungsmechanismen. Aus chemischer Sicht ist keine direkte Reaktion von Protein-Thiolen (-SH) mit H<sub>2</sub>S möglich. Allerdings könnten Sauerstoff und Metallzentren eine vermittelnde Rolle einnehmen, und Reaktionen mit anderen posttranslationalen Modifikationen des Cysteins könnten stattfinden.

Basierend auf mechanistischen Studien zur S-Glutathionylierung<sup>[3,11]</sup> betrachteten wir die eine Reihe hypothetischer Reaktionen als mögliche Wege der P-SSH/PSS<sup>-</sup>-Bildung unter physiologischen Bedingungen [Gl. (1)–(6)].



Sulfensäuren [Gl. (3)] findet wie in Abbildung 2 B gezeigt statt. S-Nitrosothiole würden mit H<sub>2</sub>S eher zu HSNO reagieren, als HNO und das entsprechende S-sulphydrierte Protein zu bilden, wie wir im Vorfeld gezeigt haben (mit  $\Delta_{\text{rxn}} G^\circ = +40 \text{ kJ mol}^{-1}$ ).<sup>[14]</sup> Neueste computerbasierte Studien zeigen allerdings, dass die Umgebung der S-NO-Bindung die thermodynamische Durchführbarkeit der Reaktion in Gleichung (4) signifikant beeinflussen und sie folglich für bestimmte Proteine ermöglichen könnte, die positiv geladene Aminosäurereste in unmittelbarer Nähe der S-NO-Bindung aufweisen.<sup>[15]</sup>

Die Reaktion von Protein-Thiolen mit Nitroxyl (HNO), einem Redoxverwandten von NO mit anderen Signalwegen,<sup>[16]</sup> führt zur Bildung von einem (Hydroxyamino)sulfanyl-Derivat. Es ist bekannt, dass dieses (Hydroxyamino)sulfanyl-Derivat anschließend mit anderen Thiolen unter Eliminierung von Hydroxylamin reagiert, wie in Gleichung (5) gezeigt.<sup>[16]</sup>

Schließlich ist ein möglicher Weg zur Bildung S-sulphydrierter Proteine die Reaktion von HS<sup>•</sup> mit Protein-Thiolen, bei der zunächst PSSH<sup>•</sup> gebildet wird, das in einem nachfolgenden Schritt mit O<sub>2</sub> schnell zu O<sub>2</sub><sup>-</sup> und PSSH reagiert [Gl. (6)], wie man es bei der Bildung von S-glutathionylierten Proteinen beobachtet.<sup>[11]</sup> Die Entstehung von HS<sup>•</sup> unter physiologischen Bedingungen würde die Wechselwirkung mit oxidierten Metallzentren voraussetzen, etwa in Fe<sup>III</sup>-Häm-Porphyrinen, die unter Bildung von HS<sup>•</sup> über einen Innensphären-Elektronenübergang reduziert würden.<sup>[17]</sup>

Wir testeten die Reaktionswege (1), (3), (5) und (6) und verwendeten Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Modell. Angelis Salz wurde als HNO-Donor verwendet,<sup>[18]</sup> um das (Hydroxyamino)sulfanyl-Derivat herzustellen. Die Bildung von P-SOH wurde durch die Reaktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> herbeigeführt. Proteine wurden außerdem versetzt

Die in Gleichung (1) gezeigte Reaktion ist lediglich die Summe einer Vielzahl von Reaktionsschritten, die sich während der spontanen Oxidation von H<sub>2</sub>S ereignen könnten, wobei HS<sup>•</sup> ein mögliches Intermediat ist,<sup>[12]</sup> das anschließend, durch die in Gleichung (6) gezeigte Reaktion, zur Bildung eines Protein-Persulfids führt.

Die Reduktion einer Disulfidbrücke durch H<sub>2</sub>S [Gl. (2)] ist thermodynamisch nicht begünstigt.<sup>[13]</sup> Geht man von der Berechnung der Bindungsenergien von GSSG und GSSH aus, hat letzteres eine um ca. 18 kJ mol<sup>-1</sup> niedrigere Bindungsenergie.<sup>[14]</sup> Die Reaktion mit



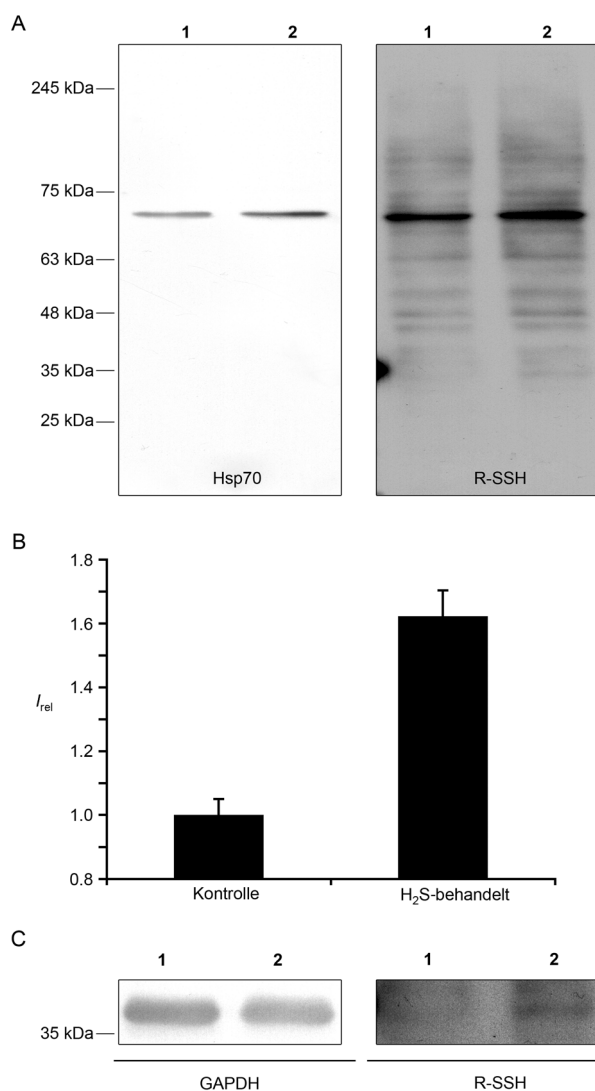
mit supraphysiologischen/pharmakologischen Konzentrationen von  $\text{H}_2\text{S}$  sowie mit  $\text{H}_2\text{S}$  in Kombination mit starkem Schütteln, um die Oxygenierung der Reaktion zu beschleunigen. Eine Kombination aus wasserlöslichem  $\text{Fe}^{\text{III}}$ -Porphyrin und  $\text{H}_2\text{S}$  fungierte als Quelle für  $\text{HS}^\bullet$ .<sup>[19]</sup> Nur in den Fällen, in denen  $\text{H}_2\text{S}$  mit P-SOH umgesetzt wurde oder  $\text{HS}^\bullet$  mithilfe von Eisenzentren generiert wurde, war PS-SH detektierbar. (Abbildung S2 in den Hintergrundinformationen). Wurde BSA als Modell für ein Protein mit intramolekularen Disulfidbindungen verwendet, wurde keine S-Sulfhydrierung bei Zugabe von  $\text{H}_2\text{S}$  beobachtet, was die geringe Reduktionsstärke von freiem  $\text{H}_2\text{S}$  bestätigt. Ein alternativer Mechanismus kann womöglich zur Bildung von Protein-Persulfiden führen, ähnlich der Reaktion mit Polysulfiden;<sup>[5g]</sup> die physiologische Relevanz dieses Prozesses muss aber noch erforscht werden.

Für den prinzipiellen Nachweis, dass die Methode in komplexeren Systemen wie dem intrazellulären Milieu angewendet werden kann, versuchten wir, mit der Tag-Switch-Technik Proteine in Zellextrakten zu markieren. Proteinextrakte aus Jurkat-Kontrollzellen sowie Jurkat-Zellen, die mit  $200\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{S}$  30 min lang bei  $37^\circ\text{C}$  behandelt wurden (wobei  $\text{Na}_2\text{S}$  als Äquivalent verwendet wurde), wurden mit der Tag-Switch-Methode markiert, mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und mit Meerrettichperoxidase (HRP)-konjugierten Anti-Biotin-Antikörpern identifiziert. Der repräsentative Western blot (Abbildung 3 A–C) gibt darüber Auskunft, dass eine kleine Zahl an Proteinen positive Signale zeigt, eine Bestätigung des Auftretens endogener Persulfidbildung an Proteinen. Die Behandlung mit  $\text{Na}_2\text{S}$  erhöhte zwar die Signalintensität, die Zahl der S-sulfhydrierten Proteine änderte sich jedoch nicht signifikant. Wurden Zellysate mit Streptavidin-Agarose-Harz behandelt und anschließend analysiert, konnten keine biotinylierten Proteine nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass alle modifizierten Proteine extrahiert werden konnten und dass die Methode für die weitere Proteomanalyse verwendet werden konnte, z.B. in Abbildung S3A in den Hintergrundinformationen.

Schon früher wurde berichtet, dass GAPDH eines der Haupt-Targets der Persulfidbildung sein könnte.<sup>[5a,b]</sup> Tatsächlich fanden wir bei unserem Versuch, GAPDH mit spezifischen Antikörpern zu identifizieren, dass dieses Protein endogen S-sulfhydriert ist, wenn auch die Behandlung mit  $\text{H}_2\text{S}$  das Signal verstärkte (Abbildung 3 C).

Die auffälligste Persulfidbildung wurde an einem Protein mit ca. 70 kDa detektiert. Unter Verwendung von Antikörpern, die spezifisch für Heat Shock Protein 70 (Hsp70) sind, konnten wir zeigen, dass dieses Protein aller Wahrscheinlichkeit nach Hsp70 ist. Hsp70 ist von sehr großem pharmakologischem Interesse,<sup>[20a]</sup> und neuere Studien zeigen, dass es mittels Oxidation seiner Cysteinreste zu Sulfensäuren (P-SOH) als Redoxsensor wirken kann,<sup>[20b]</sup> was auch erklärt, wie Hsp70 Persulfide bilden könnte [Gl. (3)].

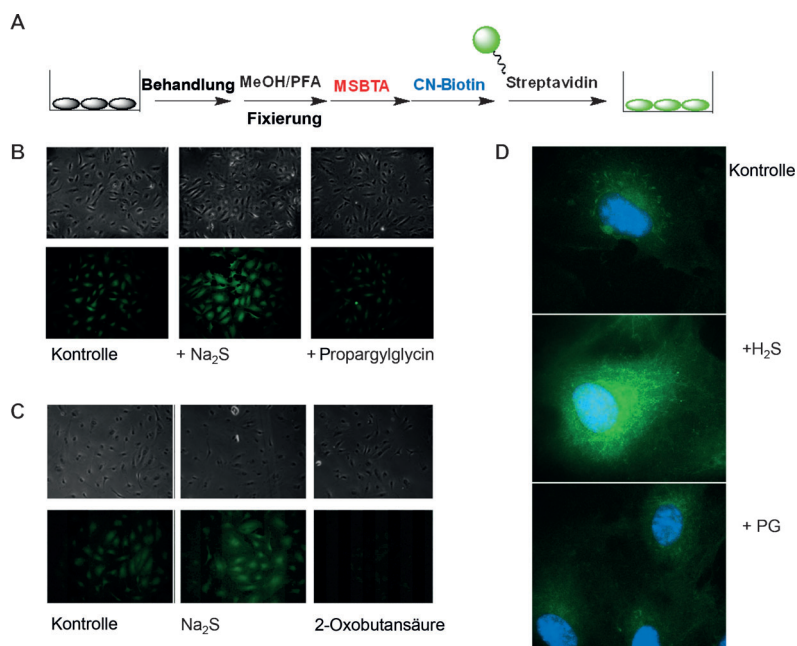
Wie in den Hintergrundinformationen [Abbildung S2, Gleichung (6)] gezeigt, könnte die metallvermittelte Generierung von P-SSH der Hauptbildungsweg von P-SSH sein, aber auch eine Quelle für seine künstliche Herstellung. Tatsächlich zeigen die in den Experimenten in Abbildung 3 ge-



**Abbildung 3.** Detektion von Persulfidbildung an Proteinen in Zellysaten mit dem Tag-Switch-Assay. A) Mit dem Tag-Switch-Assay analysierte Jurkat-Zellysate von Kontrollprobe (Spur 1) und  $\text{H}_2\text{S}$ -behandelten Zellen (Spur 2;  $200\ \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}$ , 30 min,  $37^\circ\text{C}$ ). Parallel dazu wurde mit denselben Zellextrakten ein Western blot für Hsp70 durchgeführt. Die entstehende Bande befand sich auf exakt der Position der intensivsten Bande des Persulfid-Westerblots. B) Quantifizierung der Persulfidbildung in Kontrolle und  $\text{H}_2\text{S}$ -behandelten Zellen auf Grundlage der Intensität der Bande bei 70 kDa. C) Detektion von GAPDH als Standardprotein für die Persulfidbildung.

zeigten Jurkat-Zellysate eine viel stärkere S-Sulfhydrierung als lebend behandelte Zellen, wenn man beide mit zusätzlichem  $200\ \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{S}$  versetzt (Abbildung S3B in den Hintergrundinformationen).

Abschließend versuchten wir mit orientierenden Experimenten, die Tag-Switch-Technik für die In-situ-Markierung von Methanol- oder Paraformaldehyd-fixierten Zellen zu verwenden. Menschliche Nabelschnurvenen-Endothelzellen (human umbilical vein endothelial cells; HUVECs), die 30 min lang  $100\ \mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{S}$  oder 2 h lang 2 mM Propargylglycin, einem Cystathionin-Gamma-Lyase-Inhibitor,<sup>[14]</sup> ausgesetzt waren, wurden mit eiskaltem Methanol fixiert. Freie Thiol-



**Abbildung 4.** In-situ-Fluoreszenzdetektion von intrazellulärer Persulfidbildung an Proteinen. A) Schematische Darstellung des Verfahrens, das zur intrazellulären Markierung von Persulfiden verwendet wurde. B,C) Phasenkontrast- und Fluoreszenzabbildungen von mit Methanol (B) oder Paraformaldehyd (PFA; C) fixierten Zellen. Unbehandelte Zellen wurden als Kontrolle herangezogen. Behandlungen waren wie folgt: 100  $\mu$ M Na<sub>2</sub>S (30 min, 37°C), 2 mM Propargylglycin (PG; 2 h, 37°C) oder 2 mM 2-Oxobutansäure (2 h, 37°C). D) Mit 100-facher Vergrößerung aufgenommene Fluoreszenzabbildungen. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) gefärbt.

reste wurden mit MSBT-A blockiert, und die Persulfidbildung an den Proteinen wurde mit CN-Biotin markiert. Zum Schluss wurden die Zellen mit Fluorescein-markiertem Streptavidin versetzt. Ähnlich wurde mit den Zellen verfahren, die mit Na<sub>2</sub>S oder 2-Oxobutansäure (einem Inhibitor vom Mercaptopyruvat-S-Transferase, einem mitochondrialen H<sub>2</sub>S-produzierenden Enzym) behandelt wurden, mit dem Unterschied, dass diese Zellen mit Paraformaldehyd fixiert wurden.

Wie in Abbildung 4 A,B gezeigt, erhöhte sich die Zahl der detektierbaren S-sulhydrylierten Proteine in HUVECs, die mit H<sub>2</sub>S behandelt worden waren. Im Vergleich mit der Kontrollprobe wurde mit Propargylglycin eine partielle Inhibition erreicht, jedoch wurde durch die Behandlung mit 2-Oxobutansäure das Signal fast komplett ausgelöscht, was auf die wichtige Rolle von mitochondrial produziertem H<sub>2</sub>S hindeutet, wie es im Vorfeld vorgeschlagen wurde.<sup>[21]</sup> Das fast vollständige Fehlen des Signals in den mit 2-Oxobutansäure behandelten Zellen bestätigt auch, dass unselektive Bindung des Fluoreszenzsensors, unvollständiges Blockieren der freien Thiolreste und/oder unselektive Hintergrundfluoreszenz nicht zum Hauptfluoreszenzsignal beitragen. Darüber hinaus beeinflusste die Vorbehandlung der fixierten Zellen mit Dimedon die Detektion intrazellulärer Persulfide nicht (Abbildung S4 in den Hintergrundinformationen). Diese Daten lassen darauf schließen, dass der Tag-Switch-Assay gegenüber P-S-SH, im Unterschied zu P-S-OH, selektiv ist. Es sollte angemerkt werden, dass die Reaktivität von Sulfensäuren gegenüber Kohlenstoffnukleophilen wie Cyanacetat je nach

Proteinumgebung verschieden sein könnte. Doch selbst wenn bestimmte P-S-OHs mit Cyanacetat reagieren sollten, könnten die Proben zunächst immer mit Dimedon vorbehandelt werden, um falsche Signale von P-S-OHs auszuschließen, denn wie wir im Vorfeld gezeigt haben, reagiert Dimedon mit P-S-OH, aber nicht mit P-S-SH.<sup>[4]</sup>

Stärkere Vergrößerungen (100 $\times$ ) gaben uns Aufschlüsse über die intrazelluläre Signalverteilung (Abbildung 4D). Die perinukleare Lokalisation des Signals lässt auf das Vorhandensein des Signals in den Mitochondrien und/oder im Endoplasmatischen Retikulum (ER) schließen. Da das Signal in den mit Methanol fixierten Zellen weniger diffus war, verwendeten wir sie für Kollokalisationsstudien. Mitochondriale und ER-Marker zeigten, dass der Großteil des detektierten Persulfids innerhalb dieser beiden Organellen lokalisiert ist, vornehmlich im ER (Abbildung S5 in den Hintergrundinformationen).

Zusammengenommen bieten diese Daten eine neue, selektive Methode zur Detektion von Persulfidbildung an Proteinen. Unsere Befunde zeigen, dass kohlenstoffbasierte Nukleophile wie Cyanacetat nicht mit herkömmlichen Disulfiden in Proteinen reagieren, wohl aber mit chemisch hochaktivierten Disulfidspezies. Es wurden einige Erkenntnisse über die physiolo-

gischen Mechanismen hinter der Protein-Persulfidbildung vorgestellt, die nahelegen, dass die Metallzentren-vermittelte Oxidation von H<sub>2</sub>S der vorherrschende Mechanismus sein könnte, zusammen mit der Reaktion von H<sub>2</sub>S mit Cysteinresten, die zu Sulfensäuren oxidiert sind.

Unabhängig davon, welchem endgültigen Zweck die Reaktion jeweils dienen mag, lassen die Daten darauf schließen, dass es sich bei der Persulfidbildung in der Tat um eine Form der posttranslationalen Modifikation des Säugetierproteoms handeln könnte. Detaillierte mechanistische Studien der P-SSH-Bildung und der funktionalen Auswirkungen, die diese Modifikation auf spezifische Targets hat, bilden die Grundlage für die Weiterführung dieser Forschung.

Eingegangen am 6. Juli 2013,  
veränderte Fassung am 7. Oktober 2013  
Online veröffentlicht am 29. November 2013

**Stichwörter:** Persulfidbildung · Schwefelwasserstoff · Signaltransduktion · Tag-Switch · Thiole

- [1] a) L. Li, P. Rose, P. K. Moore, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2011**, *51*, 169–187; b) O. Kabil, R. Banerjee, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21903–21907; c) C. Szabó, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2007**, *6*, 917–935.
- [2] a) K. Abe, H. Kimura, *J. Neurosci.* **1996**, *16*, 1066–1071; b) W. Zhao, J. Zhang, Y. Lu, R. Wang, *EMBO J.* **2001**, *20*, 6008–6016; c) G. Yang, L. Wu, B. Jiang, W. Yang, J. Qi, K. Cao, Q. Meng, A. K. Mustafa, W. Mu, S. Zhang, S. H. Snyder, R. Wang, *Science*

- 2008, 322, 587–590; d) A. K. Mustafa, G. Sikka, S. K. Gazi, J. Steppan, S. M. Jung, A. K. Bhunia, V. M. Barodka, F. K. Gazi, R. K. Barrow, R. Wang, L. M. Amzel, D. E. Berkowitz, S. H. Snyder, *Circ. Res.* **2011**, 109, 1259–1268; e) J. W. Elrod, J. W. Calvert, J. Morrison, J. E. Doeller, D. W. Kraus, L. Tao, X. Jiao, R. Scalia, L. Kiss, C. Szabo, H. Kimura, C. W. Chow, D. J. Lefer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, 104, 15560–15565.
- [3] C. E. Paulsen, K. S. Carroll, *Chem. Rev.* **2013**, 113, 4633–4679.
- [4] J. Pan, K. S. Carroll, *ACS Chem. Biol.* **2013**, 8, 1110–1116.
- [5] a) A. K. Mustafa, M. M. Gadalla, N. Sen, S. Kim, W. Mu, S. K. Gazi, R. K. Barrow, G. Yang, R. Wang, S. H. Snyder, *Sci. Signaling* **2009**, 2, ra72; b) N. Sen, B. D. Paul, M. M. Gadalla, A. K. Mustafa, T. Sen, R. Xu, S. Kim, S. H. Snyder, *Mol. Cell* **2012**, 45, 13–24; c) N. Krishnan, C. Fu, D. J. Pappin, N. K. Tonks, *Sci. Signaling* **2011**, 4, ra86; d) M. S. Vandiver, B. D. Paul, R. Xu, S. Karuppagounder, F. Rao, A. M. Snowman, H. S. Ko, Y. I. Lee, V. L. Dawson, T. M. Dawson, N. Sen, S. H. Snyder, *Nat. Commun.* **2013**, DOI: 10.1038/ncomms2623; e) B. D. Paul, S. H. Snyder, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2012**, 13, 499–507; f) G. Yang, K. Zhao, Y. Ju, S. Mani, Q. Cao, S. Puukila, N. Khaper, L. Wu, R. Wang, *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, 15, 1906–1919; g) R. Greiner, Z. Pálkás, K. Bäsell, D. Becher, H. Antelmann, P. Nagy, T. P. Dick, *Antioxid. Redox Signaling* **2013**, DOI: 10.1089/ars.2012.5041.
- [6] a) J. Lane, M. T. Z. Spence, *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*, 11. Aufl., Life Technologies, Inc., Eugene, **2010**, Kap. 2, S. 97–116; b) G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, 2. Aufl., Elsevier, Amsterdam, **2008**.
- [7] D. Zhang, N. O. Devarie-Baez, Q. Li, J. R. Lancaster, Jr., M. Xian, *Org. Lett.* **2012**, 14, 3396–3399.
- [8] J. Pan, M. Xian, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 352–354.
- [9] N. E. Heimer, L. Field, R. A. Neal, *J. Org. Chem.* **1981**, 46, 1374–1377.
- [10] S. Carballal, R. Radi, M. C. Kirk, S. Barnes, B. A. Freeman, B. Alvarez, *Biochemistry* **2003**, 42, 9906–9914.
- [11] a) I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, R. Colombo, A. Milzani, *Free Radical Biol. Med.* **2007**, 43, 883–898; b) Z. Cai, L. J. Yan, *J. Biochem. Pharmacol. Res.* **2013**, 1, 15–26; c) I. Dalle-Donne, A. Milzani, N. Gagliano, R. Colombo, D. Giustarini, R. Rossi, *Antioxid. Redox Signaling* **2008**, 10, 445–473.
- [12] „Removal of Hydrogen Sulphide (H<sub>2</sub>S): Catalytic oxidation of sulphide species“: I. Ivanovic-Burmazovic, M. R. Filipovic, *WO* 2012/175630, **2012**.
- [13] D. Cavallini, G. Federici, E. Barboni, *Eur. J. Biochem.* **1970**, 14, 169–174.
- [14] M. R. Filipovic, J. L. Miljkovic, T. Nauser, M. Royzen, K. Klos, T. Shubina, W. H. Koppenol, S. J. Lippard, I. Ivanovic-Burmazovic, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, 134, 12016–12027.
- [15] Q. K. Timerghazin, M. R. Talipov, *J. Phys. Chem. Lett.* **2013**, 4, 1034–1038.
- [16] a) W. Flores-Santana, D. J. Salmon, S. Donzelli, C. H. Switzer, D. Basudhar, L. Ridnour, R. Cheng, S. A. Glynn, N. Paolucci, J. M. Fukuto, K. M. Miranda, D. A. Wink, *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, 13, 1659–1674; b) J. M. Fukuto, S. J. Carrington, *Antioxid. Redox Signaling* **2011**, 13, 1649–1657; c) J. M. Fukuto, C. H. Switzer, K. M. Miranda, D. A. Wink, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2005**, 45, 335–355.
- [17] J. W. Pavlik, B. C. Noll, A. G. Oliver, C. E. Schulz, W. R. Scheidt, *Inorg. Chem.* **2010**, 49, 1017–1026.
- [18] K. M. Miranda, A. S. Dutton, L. A. Ridnour, C. A. Foreman, P. Ford, N. Paolucci, T. Katori, C. G. Tocchetti, D. Mancardi, D. D. Thomas, M. G. Espey, K. N. Houk, J. M. Fukuto, D. A. Wink, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 722–731.
- [19] J. L. Miljkovic, I. Kenkell, I. Ivanovic-Burmazovic, M. R. Filipovic, *Angew. Chem.* **2013**, DOI: 10.1002/ange.201305669; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, DOI: 10.1002/anie.201305669.
- [20] a) T. Liu, C. K. Daniels, S. Cao, *Pharmacol. Ther.* **2012**, 136, 354–374; b) Y. Miyata, J. N. Rauch, U. K. Jinwal, A. D. Thompson, S. Srinivasan, C. A. Dickey, J. E. Gestwicki, *Chem. Biol.* **2012**, 19, 1391–1399.
- [21] a) N. Shibuya, Y. Mikami, Y. Kimura, N. Nagahara, H. Kimura, *J. Biochem.* **2009**, 146, 623–626; b) K. Módis, K. Coletta, K. Erdélyi, A. Papapetropoulos, C. Szabo, *FASEB J.* **2013**, 27, 601–611.