

Reactividad de los persulfuros biológicos

Lic. Dayana Benchoam Altman

Tesis de Doctorado

Presentada como uno de los requisitos para el título de Doctora en Química

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

Diciembre 2023 Montevideo, Uruguay

Reactividad de los persulfuros biológicos

Tribunal

Dra. Sara Bari Dra. Cecilia Giacomini

Dra. Andrea Villarino

Dra. Beatriz Alvarez, Directora

Dr. Ernesto Cuevasanta, Director

Agradecimientos

A Beatriz Alvarez y Ernesto Cuevasanta por sus enseñanzas, tiempo y dedicación durante todos estos años. Es un privilegio haber sido su estudiante.

A Matías Möller por toda la ayuda y consejos invaluables en momentos claves.

A Gerardo Ferrer-Sueta por las enriquecedoras discusiones.

A Jonathan Semelak, Ari Zeida, Madia Trujillo, Darío Estrin y Juan Grassano por los aportes computacionales, discusiones muy enriquecedoras y su gran impulso para estudiar la reacción de GSSH con H₂O₂. En especial a Jonathan por todas las horas de trabajo juntos y por contagiar su entusiasmo por la ciencia.

A Mauricio Mastrogiovanni por los experimentos de masa y buena disposición siempre. A Adriana Cassina por su ayuda con el oxímetro. A Stephanie Portillo por la variante de peroxirredoxina 5.

A Ruma Banerjee por haberme recibido tan cálidamente en su laboratorio en Michigan. A Joseph Roman por su ayuda con la SQR, a Aaron Landry por la purificación de la SQR y a todo el laboratorio por la buena onda y ayuda durante mi estadía.

A Mariana Bonilla, Marcelo Comini, Natalia Oddone, Victoria Gutiérrez y Juan José Ríos por las discusiones sobre los biosensores y MST. En especial a Mariana por siempre estar a disposición y facilitarnos los experimentos con la expresión de proteínas.

A Nicolas Rouhier, Jérémy Couturier y Anna Moseler por los intercambios y discusiones sobre los biosensores.

A todas las personas de los laboratorios de Enzimología y Fisicoquímica Biológica con los que compartí en algún momento del doctorado. Gracias por todos los momentos, consejos y hacer del trabajo un lugar tan cálido. En especial a Martina Steglich y Florencia Orrico por escucharme y apoyarme siempre. A mi familia por su paciencia y apoyo incondicional.

A la Comisión Académica de Posgrado, a PEDECIBA-Química y a CSIC por el financiamiento de mi posgrado. A la American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB) por la beca PROLAB que me permitió realizar la pasantía en Michigan.

Reactividad de los persulfuros biológicos

Dayana Benchoam

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

2023

Directora: Dra. Beatriz Alvarez

Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Director: Dr. Ernesto Cuevasanta

Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Laboratorio de Enzimología y Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Los persulfuros (RSSH) cumplen roles fundamentales en procesos de biosíntesis, catabolismo y señalización. Derivan de los tioles (RSH) y se han propuesto como transductores de la señalización celular mediada por el sulfuro de hidrógeno (H_2S). Los persulfuros poseen una química muy versátil; son especies ácidas y actúan como nucleófilos en su forma aniónica (RSS⁻) y como electrófilos cuando están protonados (RSSH). No obstante, propiedades químicas de los persulfuros están escasamente las caracterizadas. Este trabajo buscó contribuir a la comprensión de sus funciones biológicas mediante el estudio de sus propiedades básicas. Específicamente, se propuso estudiar la acidez y reactividad de persulfuros con relevancia biológica, tanto de bajo peso molecular como proteicos. Se observó que los persulfuros de bajo peso molecular no pueden ser aislados en medio acuoso debido a su alta reactividad. La incubación de disulfuros

en medio alcalino llevó a la formación de persulfuros, y aunque no resultó conveniente para prepararlos en el laboratorio, puso de manifiesto sesgos que pueden ocurrir en el método de cianólisis fría, una técnica frecuentemente usada para cuantificar persulfuros. En cambio, las reacciones de disulfuros con concentraciones subestequiométricas de H₂S resultaron útiles para producir persulfuros de bajo peso molecular y fueron utilizadas para estudiar su acidez y reactividad. Se adaptaron métodos de HPLC basados en la derivatización con monobromobimano que permitieron cuantificar la concentración de persulfuro de glutatión generada por ambas estrategias. Se estudiaron seis persulfuros de bajo peso molecular, incluyendo los derivados de glutatión y cisteína. Los persulfuros resultaron ser más ácidos que los tioles correspondientes, con valores de pKa de 4.6 a 6.3, y presentaron mayor reactividad nucleofílica que la esperada para los tiolatos de igual basicidad, proporcionando evidencia del efecto alfa en los persulfuros (aumento de la nucleofilia debido a la presencia de un átomo adyacente con alta densidad electrónica). Adicionalmente, se trabajó con dos enzimas humanas de la vía de oxidación de H₂S que forman intermediarios persulfuros en su ciclo catlítico, la sulfuro quinona óxidorreductasa (SQR) y la rodanesa. Los resultados indican que la acidez de los persulfuros es modulada por los entornos proteicos, pues la SQR persulfurada tuvo un p K_a de 7.8 ± 0.2. Por su parte, la rodanesa persulfurada presentó un pK_a de 9.38 \pm 0.04, probablemente debido a un residuo crítico del sitio activo y no al persulfuro en sí mismo. Por último, se comenzó a evaluar la viabilidad de desarrollar biosensores basados en la reactividad de los persulfuros de la rodanesa y la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (MST), obteniendo resultados prometedores con la MST de Leishmania major. En suma, en este trabajo se sentaron fundamentos sólidos sobre los persulfuros, basados en principios termodinámicos y cinéticos, que se espera que contribuyan a la comprensión de sus roles biológicos.

Reactivity of biological persulfides

Dayana Benchoam

Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química

Universidad de la República

Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas

2023

Director: Beatriz Alvarez, PhD

Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Director: Ernesto Cuevasanta, PhD

Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Laboratorio de Enzimología y Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República

Persulfides (RSSH) play key roles in biosynthesis, catabolism and signaling. They derive from thiols (RSH) and are proposed to transduce the signaling effects of hydrogen sulfide (H_2S). Persulfides exhibit a very versatile chemistry; they are acidic species that act as nucleophiles in the anionic state (RSS⁻) and as electrophiles when protonated (RSSH). However, the biochemical properties of persulfides are poorly understood. This work seeks to contribute to the understanding of their biological functions by the study of their basic properties. Specifically, we aimed to study the acidity and reactivity of biologically relevant persulfides, both low molecular weight and protein persulfides. Low molecular weight persulfides could not be isolated in aqueous solution due to their high reactivity. The incubation of disulfides in alkali led to the formation of persulfides, and although it was not suitable for persulfide preparation in the laboratory, it revealed biases that may occur in the cold cyanolysis method, a technique often used to quantify

persulfides. In contrast, reactions of disulfides with substoichiometric concentrations of H₂S were useful for producing low molecular weight persulfides and were employed to study their acidity and reactivity. HPLC methods based on monobromobimane derivatization were adapted to quantify the concentration of glutathione persulfide produced by both aproaches. We studied six low molecular weight persulfides, including the derivatives of glutathione and cysteine. Persulfides were found to be more acidic than the corresponding thiols, with pK_a values ranging from 4.6 to 6.3, and exhibited greater nucleophilic reactivity than expected for thiolates of equal basicity, providing evidence for the alpha effect in persulfides (increased nucleophilicity due to the presence of an adjacent atom with high electron density). In addition, we investigated two human enzymes of the H₂S oxidation pathway that form catalytic persulfide intermediates, sulfide quinone oxidoreductase (SQOR) and thiosulfate sulfurtransferase (TST, rhodanese). The results indicate that the acidity of persulfides is modulated by protein environments, since persulfidated SQOR exhibited a pKa of 7.8 \pm 0.2. Persulfidated TST presented a pKa of 9.38 \pm 0.04, probably due to a critical active site residue rather than the persulfide itself. Finally, we started exploring the feasibility of developing biosensors based on the reactivity of the persulfides formed in rhodanese and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MST), obtaining promising results with MST of Leishmania major. In summary, this work laid solid foundations on persulfides based on thermodynamic and kinetic principles, which are expected to contribute to the understanding of their biological roles.

Índice

Agradecimientos	v			
Resumen en español vii				
Resumen en inglésix				
Lista de abreviaturas	xv			
1. Introducción	17			
1.1. Generalidades de los persulfuros	17			
1.2. Roles fisiológicos de los persulfuros	18			
1.2.1. Persulfuros como potenciales transductores de la señalización				
mediada por H_2S	18			
1.2.2. Persulfuros como intermediarios en biosíntesis	21			
1.2.3. Persulfuros como intermediarios en el catabolismo del H_2S	22			
1.3. Formación de persulfuros	23			
1.3.1. Reacciones que dependen directamente de H_2S	. 24			
1.3.2. Reacciones que dependen indirectamente de H_2S	. 28			
1.3.3. Reacciones independientes de H_2S	32			
1.4. Propiedades químicas de los persulfuros	. 36			
1.4.1. Acidez	36			
1.4.2. Nucleofilia	38			
1.4.3. Oxidación	42			
1.4.4. Electrofilia	48			
1.4.5. Desproporcionación	52			
1.4.6. Interacción con metales y metaloproteínas	53			
1.5. Métodos de detección	54			
1.5.1. Absorbancia	55			
1.5.2. Cianólisis fría	55			
1.5.3. Reacción con triarilfosfinas	56			
1.5.4. Reducción y liberación de H_2S	57			
1.5.5. Reacción con FDNB	57			
1.5.6. Agentes alquilantes y espectrometría de masas	58			
1.5.7. Sondas fluorogénicas	60			
1.5.8. Métodos para estudios proteómicos de persulfuros	62			

1.6. Mode	los de persulfuros utilizados en este trabajo70
1.6.1.	Persulfuros de bajo peso molecular70
1.6.2.	Persulfuros proteicos
1.7. Aplica	aciones de la química de los persulfuros para el desarrollo de
biosensore	s86
2. Objetivos	
2.1. Objet	ivo general
2.2. Objet	ivos específicos
2.2.1.	Propiedades bioquímicas de los persulfuros de bajo peso
molecu	ılar
2.2.2.	Propiedades bioquímicas de los persulfuros proteicos
2.2.3.	Aplicaciones de la reactividad de los persulfuros
3. Resultado	os y discusión91
3.1. Artícu	llo 1. Los disulfuros forman persulfuros a pH alcalino, lo que
puede gen	erar sobreestimaciones en el método de la cianólisis fría91
3.1.1.	Antecedentes del artículo91
3.1.2.	Resultados y discusión93
3.1.3.	Conclusiones95
3.1.4.	Contribución personal en el artículo96
3.2. Artícu	llo 2. Acidez y reactividad nucleofílica de GSSH
3.2.1.	Resultados y discusión97
3.2.2.	Conclusiones102
3.2.3.	Contribución personal en el artículo 102
3.3. Artícu	llo 3. Acidez de los persulfuros y su modulación por los entornos
proteicos e	en la SQR y la rodanesa 103
3.3.1.	Resultados y discusión 103
3.3.2.	Conclusiones110
3.3.3.	Contribución personal en el manuscrito110
3.4. Oxida	ción de roGFP2 por azufretransferasas 111
3.4.1.	Objetivos
3.4.2.	Materiales y métodos 112
3.4.3.	Resultados y discusión115
3.4.4.	Conclusiones y perspectivas

4. Discusión global, conclusiones y perspectivas129
Anexos
Anexo I. Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method
Anexo II. Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide 155
Anexo III. Acidity of persulfides and its modulation by the protein environments in sulfide quinone oxidoreductase and thiosulfate sulfurtransferase
Anexo IV. Autorización de coautores para realizar una tesis por compendio de artículos
Anexo V. Actividades adicionales durante el desarrollo de la tesis 211
Bibliografía

Lista de abreviaturas

3-MP	3-mercaptopiruvato
β-MeSSH	persulfuro de β -mercaptoetanol
B-S-B	producto de derivatización de H ₂ S con mBrB
CBS	cistationina β-sintasa
CoA	coenzima A
CoQ	coenzima Q
CSE	cistationina γ-liasa o cistationasa
СТ	transferencia de carga
CysOMeSSH	persulfuro de cisteína metiléster
CysSSH	persulfuro de cisteína
CystSSH	persulfuro de cisteamina
DATS	dialiltrisulfuro
DHG	derivado dehidroalanina de glutatión
DMSO	dimetilsulfóxido
DNTF	2,4-dinitrotiofenol
DTDPy	4,4'-ditiodipiridina
DTNB	5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico)
dtpa	ácido dietilentriaminopentaacético
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
EtSSH	etanopersulfuro
FAD	flavín adenín dinucleótido
FDNB	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno
FRET	transferencia de energía de resonancia de Förster
GR	glutatión reductasa
GS-B	producto de derivatización de GSH con mBrB
GSH	glutatión
GSNO	nitrosoglutatión
GSS-B	producto de derivatización de GSSH con mBrB
GSSG	glutatión disulfuro
GSSH	persulfuro de glutatión
GSSSG	glutatión dialquiltrisulfuro

GSSSH	glutatión hidrotrisulfuro
H_2S	sulfuro de hidrógeno
H_2S_2	disulfuro de hidrógeno
HcySSH	persulfuro de homocisteína
HEK293	células embrionarias humanas de riñón
HisTag	etiqueta de cola de histidinas
HPE-IAM	β-(4-hidroxifenil)etil iodoacetamida
I3MT-3	inhibidor de MSTs de mamíferos
IAA	ácido iodoacético
IAM	iodoacetamida
IMAC	cromatografía de afinidad con metal inmovilizado
k ind	constante de velocidad de segundo orden independiente de pH
$k_{ m obs}$	constante de velocidad exponencial observada de primer orden
<i>К</i> рн	constante de velocidad de segundo orden a un determinado pH
<i>Lm</i> MST	MST de <i>Leishmania major</i>
mBrB	monobromobimano
MCPD	S-metoxicarbonil penicilamina disulfuro
MCP-SSH	persulfuro de N-metoxicarbonil penicilamina
MMTS	S-metilmetanotiosulfonato
MSBT	metilsulfonilbenzotiazol
MST	3-mercaptopiruvato azufretransferasa
NEM	<i>N</i> -etilmaleimida
roGFP2	proteína fluorescente verde sensible al estado redox
RSH	tiol
RSS⁻	persulfuro anión
RSSH	hidropersulfuro
SQR	sulfuro quinona óxidorreductasa
TCEP	tris(2-carboxietil)fosfina
TEV	una proteasa del virus de grabado del tabaco
Trx	tiorredoxina
TrxR	tiorredoxina reductasa
TrxSSH	tiorredoxina persulfuro
Tum1	MST de levaduras

1. Introducción

1.1. Generalidades de los persulfuros

Los persulfuros son especies con el grupo químico RSSH. Son compuestos con azufre sulfano, recibiendo este nombre los azufres que se encuentran unidos a dos azufres o a un azufre y a un protón ionizable [1]. Formalmente, los azufres del persulfuro tienen un estado de oxidación de -1. Al ionizarse en medio acuoso generan la especie RSS⁻. Desde el punto de vista químico, los persulfuros son especies ácidas que pueden actuar preferentemente como nucleófilos en su forma aniónica (RSS⁻) y como electrófilos cuando están protonados (RSSH). Los nombres recomendados por la IUPAC son hidrurodisulfuro, disulfanilo y ditiohidroperóxido. En este texto, el término "persulfuro" hace referencia a la mezcla en equilibrio de hidropersulfuro (RSSH) y persulfuro aniónico (RSS⁻) en solución acuosa, a menos que se especifique lo contrario.

Desde una perspectiva bioquímica, los persulfuros están estrechamente relacionados con los tioles (RSH) y el sulfuro de hidrógeno (H₂S). Se generan en vías dependientes e independientes de H₂S, alcanzando concentraciones del orden de micromolar en tejidos de mamíferos [2–4]. Se forman en compuestos de bajo peso molecular, así como también en proteínas. La persulfuración forma parte de las modificaciones postraduccionales oxidativas que pueden sufrir los tioles de las cisteínas proteicas (Figura 1).

En cuanto a la relevancia metabólica, los persulfuros desempeñan un rol crucial en una amplia gama de procesos, abarcando desde biosíntesis de compuestos con azufre hasta señalización celular y catabolismo. Participan en la biosíntesis de centros ferrosulfurados y otros cofactores, se postulan como candidatos para la transducción de la señalización celular mediada por H_2S y constituyen intermediarios en la oxidación mitocondrial del H_2S . Incluso, se ha sugerido considerar a los persulfuros como "la moneda corriente" de azufre reactivo celular [5,6].

En los últimos tiempos, el interés por los persulfuros ha crecido enormemente. Esto se ve reflejado en el aumento de publicaciones sobre

nuevos métodos de cuantificación, síntesis de moléculas dadoras de persulfuros y estudios celulares, entre otros. De hecho, durante el período de tiempo en el que se desarrolló de esta tesis, se publicaron alrededor de 500 artículos sobre persulfuros según "Pubmed" (usando "persulfide" como palabra clave de la búsqueda), por lo que el conocimiento de la comunidad científica sobre los persulfuros ha ido evolucionando. Sin embargo, los avances en la comprensión de las propiedades fundamentales de los persulfuros son menores, pese a ser de vital importancia para desarrollar métodos de cuantificación, interpretar experimentos que los involucren y entender los procesos bioquímicos en los que participan.



Figura 1. Modificaciones postraduccionales oxidativas de cisteínas. Los tioles (RSH) pueden ser oxidados a ácidos sulfénicos (RSOH), disulfuros (por ejemplo, disulfuros mixtos con glutatión, RSSG), nitrosotioles (RSNO) y persulfuros (RSSH). A su vez, estas especies pueden continuar oxidándose para generar modificaciones adicionales. *Figura adaptada de* [7].

1.2. Roles fisiológicos de los persulfuros

1.2.1. Persulfuros como potenciales transductores de la señalización mediada por H₂S

El interés por los persulfuros en las últimas décadas surge de la hipótesis de que podrían constituir intermediarios en la señalización iniciada por el H₂S en modelos animales. El H₂S es una molécula análoga al agua, pero con

azufre en lugar de oxígeno. Tiene un olor particular similar a huevo en descomposición, a temperatura ambiente se encuentra en estado gaseoso y es relativamente soluble en agua. Se ioniza a HS⁻ y S²⁻, encontrándose a pH 7.4 como H₂S (28 %) y HS⁻ (72 %). Este último puede actuar como nucleófilo [8]. En este texto, "H₂S" refiere a la mezcla en equilibrio de H₂S y HS⁻ en solución acuosa, a menos que se aclare lo opuesto.

El azufre del H₂S se encuentra en su estado más reducido, con número de oxidación -2. La oxidación del H₂S puede generar diversos productos con números de oxidación hasta +6, incluyendo los persulfuros con número de oxidación -1. Otros productos de oxidación son el sulfato (SO₄^{2–}), sulfito (SO₃^{2–}), tiosulfato (S₂O₃^{2–}), polisulfuros orgánicos e inorgánicos (RS_nSSR, RS_nSS⁻, HS_nS⁻, n ≥ 1) y azufre elemental (S₈), entre otros (Figura 2).



Figura 2. Deprotonación de H₂S, oxidación por uno y dos electrones, y números de oxidación del azufre en distintas especies. *Figura adaptada de* [9].

Las primeras referencias al H_2S datan del siglo III, donde se lo describe con los términos "agua divina" o "agua de azufre". No hay más menciones en la literatura hasta el siglo XVI, donde comenzaron a haber referencias a vapores de azufre. En 1713, Ramazzini publicó un libro sobre enfermedades relacionadas a los oficios, donde describió al H_2S como un gas tóxico, y unas décadas después, los gases que emanaban de las alcantarillas de París causaron una serie de accidentes. En 1777, Scheele publicó la síntesis química de H_2S por primera vez, pero no fue hasta 1796 que Berthollet analizó el gas en cuestión, determinando que se trataba de "sulfuro de hidrógeno" o "hidrógeno azufrado" [10,11]. Desde ese entonces, la mayoría de los estudios se han enfocado en investigar sus efectos patológicos. La toxicidad se debe a su capacidad para inhibir la respiración celular mediante la inhibición de la citocromo *c* oxidasa mitocondrial [11–14]. Es tal su toxicidad, que el H_2S se ha asociado a eventos de extinción masiva en la evolución de la vida en la Tierra [15].

En 1989, un grupo de investigadores estaba haciendo estudios de toxicidad de H₂S cuando se toparon con una sorpresa: detectaron H₂S en los cerebros de ratas control que no habían sido expuestas a H₂S. Esta fue la primera evidencia de síntesis endógena de H₂S y llevó a que se sugiriera que el H₂S podría estar cumpliendo un rol fisiológico [16]. Poco tiempo después se constató la síntesis endógena de H₂S en humanos y bovinos [17,18]. Para 1996, Abe y Kimura evidenciaron una función para el H₂S por primera vez, le adjudicaron un rol de neuromodulador en el sistema nervioso [19], y en 1997 se le asignó una función vasorrelajadora en el músculo liso vascular [20]. Desde entonces, se han reportado un sinfín de efectos fisiológicos con potenciales beneficios para la salud que están redefiniendo el rol del H₂S. Entre estos, se encuentran interacciones con canales catiónicos en el sistema nervioso, atenuación del daño miocárdico por isquemia-reperfusión, promoción de la angiogénesis, inducción de respuestas pro/antiinflamatorias y efectos antioxidantes [8].

Las vías moleculares por las cuales el H_2S ejerce efectos fisiológicos no están claras. Una de las posibilidades es por reacciones del H_2S con centros metálicos, ya sea por coordinación, reducción o modificación covalente de grupos prostéticos. Por otro lado, se han propuesto reacciones directas del

20

 H_2S con especies oxidantes de oxígeno y nitrógeno. No obstante, las reacciones del H_2S con los oxidantes fisiológicos no son lo suficientemente rápidas como para competir con otros reductores fisiológicos [7,8,21]. Para calcular las velocidades se deben multiplicar las constantes cinéticas de las reacciones por la concentración de los reactivos, y a pesar de que el H_2S reaccione con oxidantes con constantes cinéticas comparables a las de los tioles [22], las concentraciones de otros reductores fisiológicos [23] son varios órdenes de magnitud mayores que la del H_2S tisular, que es de 4-55 nM. Si bien los primeros estudios de H_2S endógeno reportaban concentraciones de 30-100 μ M, más recientemente y con técnicas más sensibles, se observó que los niveles eran mucho menores de lo que se creía [24–27].

En 2009, el grupo de Snyder propuso a los persulfuros como los transductores de las señales del H_2S [28]. Las primeras investigaciones sobre persulfuros fueron en la década del sesenta, previas al descubrimiento de que el H_2S se forma endógenamente. Estos trabajos pioneros realizaron aportes cualitativos sobre las propiedades químicas de los persulfuros, lograron su síntesis química y reportaron su inestabilidad en solución acuosa [29–32]. Además, se constató que podían reaccionar con nucleófilos y electrófilos, y se desarrollaron métodos para cuantificarlos [1].

Con la postulación de los persulfuros como moléculas señalizadoras, los reportes sobre persulfuros aumentaron exponencialmente. Los trabajos de los últimos años proponen que la modificación de una cisteína proteica a la forma persulfuro podría generar cambios en su función o proteger al tiol de una oxidación irreversible. Por ejemplo, el transporte de H₂O₂ por acuaporina-8 es modulado por la persulfuración de una de sus cisteínas [33]. Además, recientemente se ha sugerido que los persulfuros juegan un papel protector contra la muerte celular por ferroptosis [34–36]. Los mecanismos de protección propuestos se discuten en 1.4.3.

1.2.2. Persulfuros como intermediarios en biosíntesis

Los persulfuros desempeñan un papel fundamental en la biosíntesis de compuestos azufrados, aportando azufre para la formación de centros

ferrosulfurados, tionucleósidos y diversos cofactores, como molibdopterina, tiamina, biotina y ácido lipoico [5,37]. Estos mecanismos involucran la participación de cisteína desulfurasas (IscS en procariotas, Nfs1 en levaduras, NFS1 en mamíferos). Estas enzimas son dependientes de piridoxal-5'-fosfato y utilizan cisteína para formar persulfuros intermediarios sobre sus cisteínas catalíticas. Los persulfuros son luego transferidos a diferentes receptores dependiendo de la molécula a sintetizar. Pueden ser transferidos a proteínas de andamiaje (IscU en procariotas, Isu1/Isu2 en levaduras, ISCU en mamíferos), que con la asistencia de otras proteínas generan los centros ferrosulfurados; a ARNt azufretransferasas, para reaccionar con ARNt y formar tionucleósidos; o a carboxilatos proteicos, produciendo tiocarboxilatos que terminen formando tiamina 0 molibdopterina [5,37,38]. La síntesis de biotina y de ácido lipoico requiere de persulfuros indirectamente, ya que depende de la síntesis de los centros ferrosulfurados [5,37].

1.2.3. Persulfuros como intermediarios en el catabolismo del H₂S

La oxidación del H₂S constituye el principal sistema de detoxificación de H₂S y ocurre fundamentalmente en la mitocondria. En esta ruta catabólica se liberan electrones a la cadena respiratoria mitocondrial y se forma tiosulfato y sulfato, los cuales pueden ser excretados en la orina. El sulfato también puede ser utilizado para formar ésteres de sulfato [39,40]. La vía de oxidación de H₂S implica la participación de persulfuros como intermediarios, tanto de bajo peso molecular como el persulfuro de glutatión (GSSH), como de persulfuros proteicos, formados en la sulfuro quinona óxidorreductasa (SQR) y en la rodanesa. Las enzimas persulfuro dioxigenasa y sulfito oxidasa también participan en la oxidación del H_2S , aunque no forman persulfuros proteicos intermediarios. Si bien hay un consenso en los intermediarios y enzimas involucradas en esta vía [41-44], hay controversias respecto a qué sustratos utilizan algunas de las enzimas y, por lo tanto, el orden en que actúan.

Las dos vías propuestas plantean que la SQR transfiere el azufre de H_2S a un sustrato aceptor y los electrones a la coenzima Q (CoQ, ubiquinona),

22

pero difieren en la identidad del sustrato aceptor. Una de las propuestas indica al glutatión (GSH) como sustrato aceptor (Figura 3A) [43,44], mientras que la otra propone al sulfito (Figura 3B) [42,45]. El producto de la reacción de la SQR condiciona el sentido de la reacción que cataliza la rodanesa, ya que es capaz de formar GSH y tiosulfato a expensas de sulfito y GSSH (Figura 3A), o viceversa (Figura 3B). Ambas propuestas coinciden en que la persulfuro dioxigenasa consume GSSH junto con dioxígeno para formar GSH y sulfito, y en que la sulfito oxidasa utiliza sulfito para generar sulfato (Figura 3A,B) [46,47].



Figura 3. Propuestas para la vía de oxidación mitocondrial del H₂S. En el primer paso, la SQR cataliza la transferencia del azufre de H₂S a un aceptor de azufre (GSH en *A*, sulfito en *B*) y cede los electrones a la cadena de transporte mitocondrial mediante la coenzima Q (CoQ). La rodanesa (TST) transfiere el azufre sulfano del producto de la SQR (GSSH en *A*, tiosulfato en *B*) a un aceptor (sulfito en *A*, GSH en *B*) para generar un producto adicional (tiosulfato en *A*, GSSH en *B*). Ambas alternativas proponen que la persulfuro dioxigenasa (PDO) utiliza el GSSH y dioxígeno para generar sulfato como producto final. Según *A*, el tiosulfato también constituye un producto final. *En algunas reacciones se omitieron protones o electrones para simplificar.*

1.3. Formación de persulfuros

Se han identificado varias rutas para la formación endógena de persulfuros. Algunas de ellas dependen de H_2S mientras que otras no. Los niveles de persulfuros endógenos medidos han ido cambiando conforme se desarrollan nuevos métodos de detección y cuantificación (detalles en 1.5). Por ejemplo, el estudio que propuso la persulfuración *in vivo* por primera vez, planteó que hasta el 25 % (~1 mM) de las proteínas hepáticas de ratón estaban persulfuradas [28], y para cuando comenzó esta tesis, se estimaba un nivel de >100 μ M de GSSH [48]. Con el desarrollo de mejores métodos en los últimos años, se han obtenido resultados más confiables. En células endoteliales aórticas bovinas se detectaron ~2 μ M de persulfuros totales [2], mientras que en tejido hepático de ratón se midieron niveles de ~7 μ M de GSSH, ~2 μ M de persulfuro de cisteína (CysSSH) y ~37 μ M de persulfuros proteicos [3]. Además, se ha propuesto que el 0.15 % (~6 μ M) de las proteínas en cultivos de células embrionarias humanas de riñón (HEK293) se encuentran persulfuradas [4].

Por otro lado, dada la compleja química de los persulfuros (detallada en 1.4), la obtención de persulfuros en el laboratorio no es trivial. Los mecanismos implicados *in vivo* han servido de inspiración para desarrollar estrategias para sintetizar persulfuros *in vitro*. Asimismo, se han desarrollado metodologías adicionales que, aunque carezcan de relevancia biológica, son útiles para preparar persulfuros en el laboratorio. Frecuentemente, la preparación de persulfuros adicionales en los preparados.

A continuación, se describen las reacciones de formación de persulfuros junto a la relevancia biológica y sus aplicaciones en el laboratorio.

1.3.1. Reacciones que dependen directamente de H₂S

El H₂S, más precisamente el HS⁻, es capaz de atacar nucleofílicamente a derivados oxidados de tioles para formar persulfuros y productos adicionales. Estos mecanismos han sido invocados para explicar las posibles vías de señalización del H₂S y pasos catalíticos en su catabolismo. Cabe destacar que el H₂S no puede reaccionar con tioles en ausencia de oxidantes; ambos contienen azufre en su estado más reducido y la termodinámica de formación de persulfuro a partir de H₂S y tiol es muy desfavorable [8].

Disulfuros

La reacción de H_2S con un disulfuro (RSSR) da lugar a un persulfuro y un tiol (Ec. 1).

Ec. 1 RSSR + HS⁻ \rightleftharpoons RSSH + RS⁻

Esta reacción fue originalmente planteada para el primer paso de la vía de oxidación mitocondrial del H₂S. Se postuló que la reacción del H₂S con un disulfuro de la SQR produciría un persulfuro en una de las cisteínas y un tiol en la otra [42]. Recientemente, se planteó un mecanismo alternativo para la SQR humana debido a que las estructuras cristalográficas revelaron que las cisteínas críticas forman un trisulfuro en lugar de un disulfuro [49]. Sin embargo, la reacción del H₂S con un disulfuro sigue siendo el mecanismo propuesto para la enzima ortóloga de algunas bacterias como *Acidithiobacillus caldus* [50]. Las reacciones de disulfuros de bajo peso molecular con H₂S tienen constantes de velocidad relativamente lentas, similares a las reacciones celulares de disulfuros, probablemente no contribuyan significativamente a los niveles de persulfuros endógenos.

Estas reacciones son comúnmente utilizadas para preparar persulfuros en el laboratorio, tanto proteicos como de bajo peso molecular. Para formar persulfuros en proteínas se genera un disulfuro mixto de la cisteína de una proteína con un tiol de bajo peso molecular, y luego se expone a concentraciones equimolares de H₂S. La idea es obtener el persulfuro de la proteína, pero también se podría formar el persulfuro a nivel del tiol de bajo peso molecular; dependerá de la acidez de los grupos salientes, favoreciendo la salida del de menor pK_a , y de los impedimentos estéricos. Esta metodología ha permitido generar persulfuros en la glutatión peroxidasa 3 [52], papaína [52,53] y albúmina [51].

Asimismo, es una práctica frecuente preparar GSSH (Ec. 2) o CysSSH (Ec. 3) a partir de H_2S y los disulfuros simétricos correspondientes, GSSG o cistina, respectivamente [52–56].

Ec. 2
$$GSSG + HS^- \rightleftharpoons GSSH + GS^-$$

25

Ec. 3 CysSSCys + $HS^- \rightleftharpoons CysSSH + CysS^-$

A pesar de que las reacciones de H₂S y disulfuros de bajo peso molecular parezcan sencillas, gracias a algunos estudios en la literatura y a resultados obtenidos en este trabajo, hoy en día se sabe que dan como resultado mezclas complejas. Para empezar, son reacciones reversibles [4,51-53,57,58]. A su vez, mientras trabajos tempranos asumían formación estequiométrica de persulfuro y tiol [52–54], estudios posteriores sugirieron que se generan múltiples equilibrios [57] y se forman diversas especies [58], por lo que la concentración de persulfuro no debería ser estimada a partir de la concentración inicial de los reactivos ni de la concentración del tiol generado. No obstante, estas reacciones no se habían caracterizado exhaustivamente. Nuestro grupo comenzó a estudiar su cinética antes del comienzo de esta tesis. Se vio que ocurren por mecanismos concertados S_N2 . Siguiendo el consumo de H_2S , se obtuvieron valores para las constantes cinéticas de las reacciones directas entre H₂S y varios disulfuros de bajo peso molecular, por ejemplo, 0.16 M⁻¹ s⁻¹ para GSSG y 0.6 M⁻¹ s⁻¹ para cistina (pH 7.4, 25 °C) [51]. Estos valores demuestran que las reacciones son lentas, posiblemente no siendo relevantes desde el punto de vista fisiológico. Si bien un trabajo de hace décadas estudió tanto la reacción directa como la reversa de cistina con H₂S, esos experimentos se hicieron a pH 10 [59], por lo que es probable que la cinética se viera afectada por tener las especies completamente deprotonadas y por la eliminación del disulfuro en medio alcalino (ver 1.3.3).

Ácidos sulfénicos

La reacción de H₂S con un ácido sulfénico (RSOH) produce un persulfuro e hidróxido (Ec. 4).

Ec. 4 RSOH + HS⁻
$$\rightarrow$$
 RSSH + HO⁻

La formación de persulfuros proteicos a partir de proteínas sulfeniladas y H_2S se ha postulado como una estrategia de protección celular para rescatar a las proteínas antes de que sufran sobreoxidación de las cisteínas a los estados de ácidos sulfínico (RSO₂H) y sulfónico (RSO₃H), que constituyen modificaciones irreversibles [2,60,61].

Estas reacciones pueden ser usadas para preparar persulfuros proteicos *in vitro*. Por lo general, se incuba la proteína reducida con concentraciones equimolares de un oxidante, como H_2O_2 , y de H_2S . Esta estrategia se ha utilizado para formar un persulfuro en la albúmina [51,62] y en la peroxirredoxina de *M. tuberculosis* AhpE [63]. El principal obstáculo de la estrategia radica en que los ácidos sulfénicos suelen ser inestables. Por ejemplo, llevó a la sobreoxidación de una variante de tiorredoxina (Trx) con una sola cisteína en lugar de formar el persulfuro [64].

Trisulfuros

El ataque del H₂S a un trisulfuro puede generar dos persulfuros (Ec. 5).

Ec. 5 RSSSR' + HS⁻
$$\rightleftharpoons$$
 RSSH + R'SS⁻

Este mecanismo se propuso para la SQR humana tras la observación de que las dos cisteínas de su sitio activo se encuentran formando un trisulfuro. Se propone que el trisulfuro es atacado por H₂S para formar dos persulfuros sobre la proteína [49,65,66].

Nitrosotioles

Los nitrosotioles (RSNO) son especies muy reactivas y son capaces de reaccionar con H₂S [67,68]. El ataque de H₂S al azufre del nitrosotiol, con liberación de nitroxilo, se ha propuesto como una de las vías de formación de persulfuros (Ec. 6) [9,12]. Sin embargo, esta reacción es termodinámicamente desfavorable en comparación con el ataque del H₂S al nitrógeno del nitrosotiol, que produciría tiol y ácido tionitroso (HSNO, Ec. 7) [68]. También se ha propuesto la formación de pertionitrito (SSNO⁻) [69]. En una caracterización exhaustiva de los productos de la reacción de nitrosoglutatión (GSNO) con H₂S se detectó GSSH, pero se sugirió que se estaba formando a partir de derivados sulfénicos en lugar de formarse por reacción directa [70]. No obstante, las interacciones entre nitrosotioles y H₂S son controversiales y distintos grupos han obtenido resultados contradictorios [71]. A su vez, determinados contextos proteicos alteran la termodinámica de estas reacciones [72–74] y eventualmente se podría

favorecer el ataque de H_2S sobre el azufre de los nitrosotioles [8], pero aún no hay evidencia de generación de persulfuros por este mecanismo.

Ec. 6 RSNO + HS⁻ \rightleftharpoons RSS⁻ + HNO Ec. 7 RSNO + HS⁻ \rightleftharpoons RS⁻ + HSNO

1.3.2. Reacciones que dependen indirectamente de H₂S

Hay vías de formación de persulfuros que involucran al H_2S indirectamente. Estos mecanismos utilizan el azufre de productos de oxidación del H_2S para formar persulfuros. Procesos de este tipo intervienen en pasos catabólicos del H_2S y vías de señalización, generando intermediarios persulfuros en enzimas o modificaciones postraduccionales de proteínas.

Reacción de tioles y azufres sulfanos ionizables

Los productos oxidados del H_2S que contienen un azufre sulfano ionizable (azufre unido a un azufre y a un hidrógeno) son capaces de ceder el azufre sulfano a un tiolato para formar el persulfuro derivado del tiol y un producto adicional. Los compuestos con azufre sulfano ionizable que pueden reaccionar con los tioles incluyen el tiosulfato (Ec. 8), los polisulfuros de hidrógeno (Ec. 9), los persulfuros (Ec. 10) y los alquilhidropolisulfuros (Ec. 11). En el caso de la reacción con un persulfuro, la reacción se denomina transpersulfuración (ver 1.4.4).

> Ec. 8 $SSO_3^{2-} + RS^- \rightleftharpoons RSS^- + SO_3^{2-}$ Ec. 9 $HS_nSH + RS^- \rightleftharpoons RSSH + HS_n^-, n \ge 1$ Ec. 10 $RSSH + R'S^- \rightleftarrows R'SSH + RS^-$ Ec. 11 $RS_nSSH + R'S^- \rightleftarrows R'SSH + RS_nS^-, n \ge 1$

Estos mecanismos tienen relevancia en la síntesis de cofactores azufrados y en la vía mitocondrial de consumo del H_2S [8,37]. Por ejemplo, algunas de estas reacciones están implicadas en los mecanismos catalíticos de la rodanesa, una tiosulfato azufretransferasa, y la 3-mercaptopiruvato azufretransferasa (MST), que abstraen el azufre de una molécula dadora para transferirlo a una aceptora mediante la formación de las enzimas persulfuradas como intermediarios (Figura 4). El tiolato del sitio activo de la rodanesa puede extraer el azufre sulfano del tiosulfato o de GSSH para formar rodanesa persulfuro y sulfito (Ec. 8) o GSH (Ec. 10), respectivamente. A su vez, el persulfuro de la rodanesa puede ser transferido a un tiol aceptor, como a GSH para generar GSSH (Ec. 10). Por su parte, la MST persulfuro puede donar el sulfano a aceptores tiofílicos proteicos, como Trx, o de bajo peso molecular, como cisteína para formar CysSSH (Ec. 10) [8,75,76].



Figura 4. Mecanismo mínimo de rodanesa y MST. En el primer paso, el tiol del sitio activo abstrae el azufre de una molécula dadora (DS) para formar un persulfuro en la enzima y liberar el primer producto (D) (*a*). En el segundo paso, el azufre sulfano del persulfuro es transferido a una molécula aceptora (A⁻) para regenerar la enzima reducida y formar el segundo producto (ASH) (*b*).

Estas vías de formación pueden ser aprovechadas para generar persulfuros en el laboratorio. La MST ha sido utilizada para formar persulfuro en una Trx (TrxSSH) [64], mientras que el GSSH puede ser preparado enzimáticamente con rodanesa a expensas de tiosulfato y GSH. A su vez, se puede preparar el persulfuro de rodanesa por exposición de la enzima reducida a tiosulfato en ausencia de aceptor. Alternativamente, se puede utilizar bencenotiosulfonato [77] o *p*-toluenotiosulfonato en lugar de tiosulfato [45].

La reacción de tioles con disulfuro de hidrógeno (H_2S_2) , generado por la disolución de sales como Na_2S_2 , es comúnmente usada para preparar persulfuros, y ha servido para preparar CysSSH y TrxSSH [64]. Por otro

lado, se han utilizado sales de polisulfuros inorgánicos como fuente de sulfanos para formar persulfuros en células [4,34,78]. No obstante, estas sales deben usarse con cautela, ya que son inestables en medio acuoso y los stocks pueden convertirse en una mezcla de especies rápidamente [79]. En relación con los polisulfuros inorgánicos (HS_nSH , HS_n^- , S_n^{2-} , $n \ge 2$), se resalta que éstos pueden reaccionar entre sí, con H_2S y con azufre elemental, cambiando la longitud de la cadena. Además, pueden estar en equilibrio con pequeñas cantidades de especies radicalares, como la especie de color azul S_3^{*-} [80].

Reducción de dialquilpolisulfuros

La reducción de dialquilpolisulfuros (RS_nSSR, n \geq 1), ya sea por tioles u otras moléculas, puede generar persulfuros (Ec. 12). Por ejemplo, la reacción de un dialquiltrisulfuro y un tiol puede producir un persulfuro y un disulfuro (Ec. 13). Cabe destacar que el persulfuro que se forma en esta reacción deriva del dialquilpolisulfuro, a diferencia de la reacción de los tioles con los azufres sulfanos ionizables donde el persulfuro resultante deriva del tiol. La reacción de un tiol y un dialquiltrisulfuro no necesariamente forma persulfuro, pues el ataque sobre el azufre sulfano generaría un intercambio tiol-trisulfuro (Ec. 14) [64].

Ec. 12 RSSS_nR + Nu⁻ \rightleftharpoons RSS⁻ + NuS_nR, n ≥ 1 Ec. 13 RSSSR + R'S⁻ \rightleftharpoons RSS⁻ + R'SSR Ec. 14 RSSSR + R'S⁻ \rightleftharpoons RSSSR' + RS⁻

La formación de persulfuros por esta vía se observa en la reacción de GSH con el derivado de ajo dialiltrisulfuro (DATS), que genera el persulfuro derivado de DATS (Figura 5A) [81]. Asimismo, la glutatión reductasa (GR), cuya función principal es catalizar la reducción de glutatión disulfuro (GSSG) a GSH a expensas de NADPH, también es capaz de usar los electrones del NADPH para reducir dialquiltrisulfuro de glutatión (GSSG) (y polisulfuros superiores) para formar GSSH (Figura 5B) [4,34,48,82]. No obstante, dados los niveles de GSSG y GSSSG *in vivo* [23] y las cinéticas de ambas

reacciones [82], la reducción de GSSSG por GR no parecería ser relevante fisiológicamente.



Figura 5. Reducción de dialquilpolisulfuros y formación de persulfuros. A) Reacción de DATS con GSH. B) Reducción de GSSSG por GR y NADPH.

La reducción de dialquilpolisulfuros puede ser aprovechada en el laboratorio para preparar persulfuros. Por ejemplo, para preparar GSSH a partir de GSSSG y NADPH en presencia de GR. Incluso, algunos dialquilpolisulfuros como el DATS o el dialquiltrisulfuro de cisteína se han usado como fuente de persulfuros en cultivos celulares [34,58,78,83].

Procesos radicalares

La oxidación por un electrón de H₂S genera el radical sulfhidrilo (HS[•]), que puede formar persulfuros tras reaccionar con tioles y dioxígeno (Ec. 15, Ec. 16) [8,62].

Ec. 15 $HS^{\bullet} + RS^{-} \rightarrow RSSH^{\bullet-}$

Ec. 16 RSSH^{•-} + $O_2 \rightarrow RSSH + O_2^{\bullet-}$

Estas reacciones se plantean para el radical sulfhidrilo que se presume que se genera en la reducción de citocromo *c* por H₂S. El supuesto radical podría reaccionar con proteínas para dar proteínas persulfuradas y superóxido $(O_2^{\bullet-})$. Alternativamente, el radical sulfhidrilo podría ser atrapado por oxígeno generando el radical HSO₂• para terminar dando sulfito y tiosulfato [84].

La formación de persulfuro por esta vía se ha visto en el laboratorio, pues la exposición de GAPDH a H₂S con una porfirina férrica como fuente de radical sulfhidrilo, dio lugar a GAPDH persulfurada [62].

Existen otros procesos radicalarios que podrían generar persulfuros, como la reacción del radical tiílo (RS[•]) con el radical sulfhidrilo (Ec. 17) o con H₂S dando el anión radical persulfuro (RSSH^{•–}) (Ec. 18, Ec. 16), pero no es probable que ocurran *in vivo* por la corta vida media y las bajas concentraciones que alcanzan estos radicales [8].

Ec. 17 $HS^{\bullet} + RS^{\bullet} \rightarrow RSSH$ Ec. 18 $RS^{\bullet} + HS^{-} \rightarrow RSSH^{\bullet-}$

1.3.3. Reacciones independientes de H₂S

Existen enzimas capaces de sintetizar persulfuros en mecanismos que no dependen de H_2S ni de sus derivados de oxidación, sino que utilizan tioles como fuente de azufre. Estas vías están vinculadas a procesos biosintéticos en los que es necesario adicionar átomos de azufre para formar cofactores. También existen actividades catalíticas capaces de formar persulfuros a partir de disulfuros de bajo peso molecular. A su vez, hay procesos químicos que generan persulfuros que pueden ser aplicados en el laboratorio sin necesitar de H_2S ni de sus productos de oxidación.

Eliminación de tioles

Como se mencionó previamente, las cisteína desulfurasas tienen un rol importante en la síntesis de centros ferrosulfurados, tionucleósidos, molibdopterina y otros cofactores. Con la asistencia de piridoxal-5'-fosfato, extraen el azufre de la cisteína para liberar alanina y formar un persulfuro proteico intermediario (Figura 6A), que será luego transferido a una proteína aceptora [37,85,86]. Por su parte, la MST abstrae el azufre del producto de transaminación de cisteína, el 3-mercaptopiruvato (3-MP), generando la enzima persulfurada y liberando piruvato (Figura 6B). Por lo tanto, para preparar persulfuros sobre estas enzimas *in vitro* bastaría con incubar las enzimas reducidas con el correspondiente dador de azufre [87]. Un grupo de investigación ha sugerido que las cisteinil-ARNt sintetasas podrían transferir azufre entre cisteínas para formar CysSSH y catalizar la unión de CysSSH y polisulfuros de cisteína al ARNt. Esto significaría que la persulfuración de proteínas ocurriría principalmente a nivel de la traducción en lugar de constituir una modificación postraduccional de las cisteínas [56]. No obstante, los autores no han caracterizado esta actividad enzimática *in vitro* y no se ha comprobado la presencia del cofactor propuesto, piridoxal-5'-fosfato. Estos estudios no son del todo concluyentes y tienen puntos débiles, como falta de controles e inconsistencias entre resultados. A su vez, no ha sido verificado por otros grupos de investigación.



Figura 6. Formación de persulfuros proteicos por eliminación de tioles. A) Abstracción del azufre de cisteína por cisteína desulfurasas. **B)** Abstracción del azufre de 3-MP por MST.

Eliminación de disulfuros

Las enzimas de la vía de la transulfuración, cistationina β -sintasa (CBS) y cistationina γ -liasa (CSE), catalizan la α,β -eliminación de cistina para formar CysSSH (Figura 7A). La CSE además cataliza la síntesis del persulfuro de homocisteína (HcySSH) por la α,γ -eliminación de homocistina (Figura 7B) [48,88,89]. Considerando las bajas concentraciones de cistina y homocistina en el citosol, no se considera que estas reacciones sean significativas a nivel fisiológico en condiciones normales [88]. No obstante, ambas enzimas tienen influencia indirecta en los niveles fisiológicos de

persulfuros, ya que además de las reacciones canónicas, catalizan reacciones secundarias formadoras de H₂S. Por otra parte, se han reportado enzimas de plantas y bacterias con actividad cistina liasa que formarían CysSSH, pero su implicancia biológica aún no está elucidada [90–92].

La eliminación de disulfuros con la concomitante formación de persulfuros también puede ser iniciada por una base fuerte (Figura 7C). La exposición de disulfuros peptídicos o proteicos a pH alcalino genera un persulfuro y un derivado de dehidroalanina por β -eliminación [93–97]. Si bien las condiciones de esta reacción no parecen tener relevancia biológica, ciertos entornos proteicos podrían promoverla. Por ejemplo, este mecanismo se ha postulado para explicar cómo una proteína del ojo humano, la β A4 cristalina, forma dehidroalanina. En este caso, una lisina sería la responsable de abstraer el protón (del carbono β respecto al azufre) de la cistina [98].



Figura 7. Formación de persulfuros por eliminación de disulfuros. A) α , β -eliminación de cistina catalizada por cistationina β -sintasa (CBS) y cistationina γ -liasa (CSE). **B)** α , γ -eliminación de homocistina catalizada por CSE. **C)** β -eliminación de disulfuros en medio alcalino.

Las reacciones de eliminación parecerían una manera relativamente fácil de sintetizar persulfuros *in vitro*. Además, presentarían varias ventajas: no implican H₂S ni polisulfuros de hidrógeno y no se generan tioles como coproductos que podrían interferir en ensayos posteriores, aunque forman, en simultáneo, derivados electrófilos. En el laboratorio se podría formar

CysSSH y/o HcySSH enzimáticamente a partir de los disulfuros correspondientes y CBS y/o CSE (Figura 7A,B). La principal limitación de este método es la obtención de las enzimas puras y activas. En caso de querer prescindir de enzimas, se podrían incubar disulfuros en medio alcalino (Figura 7C). La insulina [93,95] y GSSG [95,97] en NaOH han demostrado formar persulfuros. A su vez, la incubación de tioles con 9-fluorenilmetil carboxipiridinil disulfuro genera un disulfuro mixto que, tras ser sometido a una base, produce el persulfuro correspondiente al tiol original [99]. Esta estrategia puede ser usada para formar persulfuros en tioles proteicos y de bajo peso molecular. Cabe destacar que el pH alcalino es una condición extrema que podría afectar la integridad de las proteínas, por lo que esta técnica debe ser usada con cautela.

Otras estrategias inspiradas en la química orgánica

Los trabajos más antiguos reportan formación de persulfuros por síntesis en solventes orgánicos [8,21,100–102], lo cual posee la ventaja de aumentar su estabilidad o la de sus precursores. Los persulfuros se pueden preparar por hidrólisis ácida de un acildisulfuro (Figura 8A) o a partir de un metoxicarbonildisulfuro por el desplazamiento de alcóxido (Figura 8B). En los últimos años, estas reacciones han servido para obtener persulfuros que pudieran ser estudiados en solventes orgánicos, así como para desarrollar precursores que, al ser incubados en medio acuoso, generan persulfuros [35,103–108]. Entre estas estrategias se destaca la síntesis del persulfuro de *N*-metoxicarbonil penicilamina (MCP-SSH, abreviado frecuentemente NAP-SSH por analogía con el nitrosotiol SNAP) al colocar *S*-metoxicarbonil penicilamina disulfuro (MCPD) en solución acuosa (Figura 8C) [106].



Figura 8. Formación de persulfuros a expensas de carbonildisulfuros. A) Hidrólisis ácida de un acildisulfuro. **B)** Desplazamiento de alcóxido a partir de un metoxicarbonildisulfuro. **C)** Síntesis de MCP-SSH a partir de MCPD.

1.4. Propiedades químicas de los persulfuros

Los persulfuros tienen una química muy versátil que es explotada en los mecanismos catalíticos de varias enzimas. Comparten algunas propiedades con los tioles y con los disulfuros, por lo que son comparados frecuentemente. Los persulfuros presentan acidez, alcanzando equilibrios entre las especies protonadas y deprotonadas en solución acuosa. Actúan como nucleófilos, especialmente cuando están deprotonados (RSS⁻) y como electrófilos cuando están protonados (RSSH). El carácter dual hace que los persulfuros aislados reaccionen consigo mismos en procesos de desproporcionación y decaigan en medio acuoso.

1.4.1. Acidez

Los persulfuros son especies ácidas que se ionizan en solución acuosa para dar el persulfuro aniónico correspondiente (Ec. 19).

Ec. 19 RSSH
$$\rightleftharpoons$$
 RSS⁻ + H⁺

Se predice que los persulfuros son más ácidos que los tioles análogos. Esta predicción se debe a que el enlace S-H es más débil en los persulfuros que en los tioles según los cálculos de energías de disociación de enlace para
ambos compuestos, así como experimentos de infrarrojo, Raman y RMN [8,102–104,109,110]. Sin embargo, hay muy pocos datos de constantes de disociación disponibles en la literatura. Para cuando comenzó esta tesis, había una sola determinación experimental de pK_a de persulfuro de bajo peso molecular: el del 2-(3-aminopropil-amino)etano persulfuro. Su p K_a fue determinado por la reacción con un radical alquilo y resultó de 6.2, 1.4 unidades menor que el p K_a del tiol correspondiente de 7.6 [111]. En el 2017, a partir de la reacción con radicales peroxilo, se determinó un p K_a de 7 para el cumilpersulfuro [110], mientras que se espera un $pK_a > 10$ para el cumiltiol en base a datos para tioles similares [112]. En el 2019 se publicó un artículo que reportaba un pK_a de 6.9 para el GSSH, determinado mediante una metodología denominada espectroscopía de resonancia sincrónica [113]. Sin embargo, la metodología propuesta presentó serios problemas de especificidad que los llevó a obtener resultados de dudosa confiabilidad. Con intención de evitar la propagación de resultados erróneos, nuestro grupo realizó un esfuerzo para demostrar con experimentos originales los inconvenientes de la técnica utilizada, resultando en la publicación de un comentario en la misma revista que el artículo original [114].

En resumen, las dos determinaciones experimentales confiables de pK_a corresponden a persulfuros sintéticos. En base a estudios computacionales, se hizo una estimación de pK_a de 4.34 para CysSSH [51], que da un indicio de que el persulfuro probablemente sea más ácido que la cisteína, que posee un pK_a de 8.29 [115]. Una mayor acidez implicaría que, a pH fisiológico, hubiese mayor disponibilidad de las especies aniónicas de persulfuros que de tioles. Además, considerando que en las reacciones de sustitución se favorece la salida de los grupos de menor pK_a , se esperaría que las reacciones de nucleófilos y trisulfuros que forman persulfuros (Ec. 20) fueran más rápidas que las de los nucleófilos con disulfuros donde se generan tioles (Ec. 21).

Ec. 20 RSSSR + Nu⁻ \rightleftharpoons RSNu + RSS⁻ Ec. 21 RSSR + Nu⁻ \rightleftharpoons RSNu + RS⁻

En cuanto a la acidez de persulfuros proteicos, los reportes son muy limitados. Estudios realizados en la década del setenta con rodanesa bovina han asociado valores de p K_a de 5.9 y 9.4 para la forma persulfuro y de 7.8 y 9.9 para la forma tiol [116,117], aunque no está establecido a qué residuos corresponden. Si bien estos datos aportan información valiosa para comprender la catálisis enzimática, han pasado desapercibidos en la literatura actual. De hecho, las publicaciones de los últimos años sostienen que no se dispone de datos de acidez de persulfuros proteicos y, en base a los escasos reportes de persulfuros de bajo peso molecular, a menudo sugieren que probablemente tengan p K_a s más bajos que los tioles análogos. Incluso, se ha desarrollado un método para detectar persulfuros proteicos basado en esta hipótesis (se detalla más adelante) [118]. Por el contrario, es de esperar que la acidez de los persulfuros proteicos sea modulada por los entornos proteicos particulares, similar a lo que sucede con los tioles y otros grupos funcionales. Efectivamente, se ha observado que un pH relativamente bajo afecta a las reactividades de algunos persulfuros proteicos de forma variable, resultando en un aumento de la reactividad en algunas proteínas y una disminución en otras [118]. En conclusión, no se deberían hacer generalizaciones ni extrapolar las observaciones de acidez de los persulfuros de bajo peso molecular a los persulfuros proteicos.

1.4.2. Nucleofilia

La nucleofilia de los persulfuros se atribuye mayoritariamente a la especie deprotonada (RSS⁻). Dicha especie es capaz de atacar a electrófilos (E⁺) para formar derivados disulfuro (Ec. 22).

Ec. 22
$$RSS^- + E^+ \rightarrow RSSE$$

Por ejemplo, la derivatización de persulfuros con agentes alquilantes como monobromobimano (mBrB), iodoacetamida (IAM) y *N*-etilmaleimida (NEM), da lugar a disulfuros mixtos [52,53,64,119]. Los disulfuros, polisulfuros, peróxidos y centros metálicos constituyen algunos de los blancos de ataque nucleofílico de los persulfuros. *In vivo*, esta propiedad sería aprovechada en el mecanismo catalítico de la SQR humana, pues se ha postulado que uno de los dos persulfuros que se forman en el sitio activo ataca al cofactor

flavín adenín dinucleótido (FAD) de la enzima (detalles más adelante) [49,65].

Se ha propuesto que los persulfuros son mejores nucleófilos que los tioles [53,120]. Algunas evidencias que apoyan esta hipótesis son las reacciones de 4,4'-ditiodipiridina (DTDPy) con los persulfuros formados en albúmina o en la peroxirredoxina *Mt*AhpE, que resultaron más rápidas que las de los tioles proteicos correspondientes al mismo pH [51,63]. Asimismo, los arilpersulfuros tuvieron una nucleofilia mayor que los ariltiolatos en las reacciones con haluros de alquilo en solventes orgánicos [121].

La nucleofilia acentuada de los persulfuros puede racionalizarse por el efecto alfa [51,53,120–122]. El efecto alfa fue inicialmente definido como el incremento en la nucleofilia debido a la presencia de un átomo con alta densidad electrónica adyacente al átomo nucleofílico [123-125]. Es decir que, en los persulfuros, el aumento de la nucleofilia respecto a los tioles estaría dado por la presencia del azufre interno que contiene dos pares de electrones desapareados. No obstante, esta definición es ambigua, ya que el nucleófilo alfa podría ser comparado tanto con un análogo estructural (ej. HOO⁻ con HO⁻, NH₂-NH₂ con NH₃, RSS⁻ con RS⁻) como con un nucleófilo de igual basicidad (*ej.* un persulfuro y un tiol con igual pK_a). Dado que un nucleófilo alfa no es necesariamente más reactivo que su análogo estructural [126], la definición más adecuada estaría dada por la desviación positiva de los gráficos de Brønsted. De hecho, el efecto alfa fue puesto de manifiesto inicialmente con gráficos de Brønsted. En estos gráficos se correlaciona una propiedad cinética, el logaritmo de la constante de velocidad de la especie aniónica, con una propiedad termodinámica, la basicidad (pK_a del ácido conjugado), y se suele visualizar cómo la nucleofilia aumenta con la basicidad (Figura 9) [124,127]. Además, para que esta definición sea válida, las reacciones del electrófilo con el nucleófilo alfa y con el de referencia deben ocurrir por mecanismos similares [128]. El origen del efecto alfa no se comprende del todo. Posibles explicaciones incluyen la estabilización del estado de transición, la desestabilización del estado fundamental y diferencias en la solvatación [127].



Figura 9. Gráfico de Brønsted para las reacciones de nucleófilos con *p***-nitrofenilacetato.** Logaritmo de las constantes cinéticas independientes de pH (de segundo orden) de las reacciones entre *p*-nitrofenilacetato y distintos nucleófilos en función del pK_a del ácido conjugado del nucleófilo. Los nucleófilos alfa (círculos y línea roja) se desvían de la tendencia de los nucleófilos de referencia (cuadrados y línea negra). La distancia entre dos puntos de igual pK_a refleja la magnitud del efecto alfa. La tendencia de los nucleófilos con azufre como átomo nucleofílico (triángulos vacíos y línea gris punteada) se encuentra entre las tendencias de los nucleófilos alfa y los de referencia. Las reacciones de los nucleófilos de referencia de los nucleófilos alfa y los de referencia. Las reacciones de los nucleófilos de referencia debido a la presencia de esferas de solvatación significativas. *Figura tomada de* [130] *que a su vez fue adaptada de* [125].

El efecto alfa se ha estudiado para distintas familias de compuestos, como nucleófilos centrados en nitrógeno u oxígeno (Figura 9) [125,129], pero hasta la fecha no se ha estudiado para los compuestos con azufre. Si bien la presencia de azufre como átomo nucleofílico parece aumentar la reactividad (Figura 9, línea punteada), no existe una comparación sistemática de las reactividades entre compuestos de referencia que contienen azufre y compuestos alfa con azufre, ya sea con el azufre actuando como átomo nucleofílico o como el átomo con alta densidad electrónica adyacente al nucleofílico. Los datos disponibles que indican una mayor reactividad de los persulfuros en comparación con los tioles se basan en comparaciones de reacciones entre análogos estructurales (*ej.* CysSSH versus CysSH) [48,51,63]. Entonces, para determinar la magnitud del efecto alfa de manera precisa, sería necesario comparar las reacciones de un electrófilo con un persulfuro y con un tiol que tengan el mismo pK_a .

A pH fisiológico, es de esperar que los persulfuros tengan mayor reactividad nucleofílica que los tioles por la combinación de dos factores: nucleofilia intrínseca acentuada (efecto alfa) y mayor disponibilidad de las especies aniónicas (menor p K_a por ser más ácidos).

Reacciones con disulfuros

El ataque de persulfuros a disulfuros genera dialquiltrisulfuros y tioles (Ec. 23). Por ejemplo, la incubación del dador de persulfuro MCPD con GSSG produjo el trisulfuro mixto. A su vez, la exposición de GSSG a H_2S , que forma persulfuro (ver Ec. 1 y Ec. 2), generó GSH y GSSSG [58,119]. En la misma línea, en mezclas de hidroxietil disulfuro (HED) y NaHS se detectó el tiol y el trisulfuro correspondientes [58,119]. También se han estudiado las reacciones de persulfuros proteicos con disulfuros sintéticos de bajo peso molecular, como DTDPy o el ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico) (DTNB o Reactivo de Ellman) [51,52,63].

Ec. 23 $RSS^- + R'SSR' \rightarrow RSSSR' + R'S^-$

Reacciones con nitrosotioles

A pesar de que los persulfuros no sean capaces de reaccionar directamente con el óxido nítrico, sí pueden experimentar reacciones de transnitrosación, es decir, la transferencia del grupo nitrosonio (NO⁺) desde una especie nitrosada hacia los persulfuros. La reacción de nitrosotioles con persulfuros formaría nitrosopersulfuros y, en principio, se podría presumir reversible por analogía a la reacción con tioles (Ec. 24). Sin embargo, dada la estabilidad del radical pertiílo y del óxido nítrico, el enlace S-N de los nitrosopersulfuros sufre homólisis espontánea y genera los dos radicales (Ec. 25), consistente con los fracasos para obtener nitrosopersulfuros descritos anteriormente. Teniendo en cuenta ambas reacciones, la reacción de un persulfuro con un nitrosotiol produciría radical pertiílo, óxido nítrico y tiol (Ec. 26). A su vez, es esperable que el radical pertiílo se dimerice para formar el tetrasulfuro correspondiente (ver más adelante) [131–133].

> Ec. 24 $RSS^- + R'SNO \Rightarrow RSSNO + R'S^-$ Ec. 25 $RSSNO \rightarrow RSS^{\bullet} + {}^{\bullet}NO$ Ec. 26 $RSS^- + R'SNO \rightarrow RSS^{\bullet} + {}^{\bullet}NO + R'S^-$

Estas reacciones explican la formación de dialquiltetrasulfuro de glutatión (GSSSSG) en mezclas con GSSH y GSNO [34], así como la liberación de óxido nítrico cuando GSNO fue expuesto a dadores de persulfuros, lo cual no sucedió tras ser expuesto a tioles [131,132]. Se ha sugerido que la interacción entre persulfuros y nitrosotioles podría tener una relevancia fisiopatológica, ya que podría contribuir a la degradación de nitrosotioles *in vivo* [133,134].

1.4.3. Oxidación

Los persulfuros pueden ser oxidados por oxidantes de uno y dos electrones y, de hecho, se postula que son mejores reductores que los tioles. A su vez, se ha asignado a los persulfuros un rol de protector celular frente al estrés oxidativo y a la muerte celular por ferroptosis.

Oxidación por dos electrones

La oxidación de persulfuros por oxidantes típicos de dos electrones, como H_2O_2 y peroxinitrito (ONOOH/ONOO⁻), produce ácido pertiosulfénico (RSSOH) en una reacción análoga a la formación de ácido sulfénico a partir de tiol. La reacción de etanopersulfuro (EtSSH) con H_2O_2 fue estudiada computacionalmente y sugiere la formación de EtSSOH [135]. Asimismo, la oxidación de residuos de CysSSH a CysSSOH se observó en el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) tras la activación de la NADPH oxidasa [135] y en la peroxirredoxina 2 al tratar las células con H_2O_2 [3].

Ante un exceso de oxidante, los ácidos pertiosulfénicos pueden generar los ácidos pertiosulfínicos (RSSO₂H) pertiosulfónicos V $(RSSO_3H)$ correspondientes [8,135]. Estas modificaciones se detectaron in vitro en papaína, albúmina, glutatión peroxidasa 3, peroxirredoxina 2 y la proteína tirosina fosfatasa 1B [51,52,3,62]. En tejidos de ratón, se encontraron niveles similares de ácidos pertiosulfónicos que de persulfuros, sugiriendo que estas especies se forman endógenamente [3]. A su vez, la formación de los ácidos pertiosulfónicos podría estar mediada en parte por sulfito [136]. A diferencia de la sobreoxidación de tioles a los ácidos sulfínico y sulfónico, que son modificaciones generalmente irreversibles, los ácidos pertiosulfínicos y pertiosulfónicos pueden ser reducidos por tioles de bajo molecular o reductores celulares, como Trx y el sistema peso glutarredoxina, restaurando el tiol original (Figura 10). Esto ha llevado a proponer a la persulfuración de un tiol proteico como un mecanismo de protección celular para evitar un daño irreversible en situaciones de estrés oxidativo [2,3,60,79,122,137,138,133]. La estrategia para proteger a los tioles proteicos celulares de una sobreoxidación irreversible en un contexto oxidante consiste en la reacción de proteínas parcialmente oxidadas (sulfeniladas) con H₂S, que da lugar a la formación de persulfuros (Figura 10k; ver Ec. 4) [60,61].

Se postula que los persulfuros podrían ser reductores de dos electrones mejores y más rápidos que los tioles (consistente con el efecto alfa y con la mayor disponibilidad de la especie aniónica). Esto coincide con lo observado para la reacción de albúmina con peroxinitrito, que posee una constante cinética 4.4 veces más rápida cuando la proteína está como persulfuro que cuando se encuentra como tiol [51]. Cálculos computacionales predijeron que la formación de EtSSOH a partir de EtSSH es más favorable que la formación de EtSOH a partir de EtSH [135]. A su vez, en determinadas condiciones, el GSH no reaccionó con H_2O_2 mientras que el GSSH sí lo hizo [48]. Si bien hay una constante cinética reportada para la reacción de GSSH y H_2O_2 , los datos no son sólidos, ya que fue determinada en el estudio con la técnica inespecífica de espectroscopía de resonancia sincrónica [113] que nuestro grupo desestimó [114].

43



Figura 10. La persulfuración como mecanismo de protección celular de tioles frente a un estrés oxidativo. En un contexto oxidativo, los tioles (RSH) proteicos se pueden oxidar a los ácidos sulfénico (RSOH) (*a*), sulfínico (RSO₂H) (*b*) y sulfónico (RSO₃H) (*c*), siendo las últimas dos modificaciones irreversibles. La formación de un persulfuro (RSSH) mediante la reacción del tiol con un dador de azufre (DS) (*d*) puede proteger al tiol de ser oxidado irreversiblemente. En un contexto oxidativo, el persulfuro puede generar los ácidos pertiosulfénico (RSSOH) (*e*), pertiosulfínico (RSSO₂H) (*f*) y pertiosulfónico (RSSO₃H) (*g*). Estos pueden reaccionar con otros tioles (R'SH) para dar disulfuros mixtos (RSSR') (*h*, *i*, *j*), que mediante intercambios tiol-disulfuro puede reaccionar con H₂S para formar el persulfuro (*l*), a partir del cual se podrá regenerar el tiol original (*d*, *e-k*).

Debido al entorno proteico, en ciertas enzimas particulares, los persulfuros podrían ser reductores más lentos que los tioles. Por ejemplo, en las reacciones de la peroxirredoxina *Mt*AhpE con H_2O_2 y peroxinitrito, se observaron constantes cinéticas varios órdenes de magnitud mayores para el tiol que para el persulfuro. Esto se puede explicar por la geometría del sitio activo, que favorece la catálisis con estos sustratos específicos cuando la enzima se encuentra en el estado de tiol y que se ve distorsionada en la presencia del azufre extra [63].

Adicionalmente, se ha evidenciado que los persulfuros reaccionan con el nitroxilo (HNO). Por analogía con la reacción de los tioles, se esperaba observar derivados sulfenilsulfinamidas (RSS(O)NH₂). En cambio, la reacción produjo dialquilpolisulfuros con y sin nitrógeno [139].

Oxidación por un electrón

Los persulfuros también pueden reaccionar con oxidantes de un electrón, como radicales libres (representados por A[•] en Ec. 27 y Ec. 28) o iones metálicos de transición, para formar radicales pertiílo (RSS[•]). Las reacciones con radicales libres pueden ocurrir a través de mecanismos de transferencia de hidrógeno (Ec. 27) o de electrones (Ec. 28) [101]. Contrariamente, un trabajo computacional propuso que las reacciones del radical hidroxilo (HO[•]) con un conjunto de persulfuros podrían ocurrir por ruptura del enlace S-S, en este caso no se formarían radicales pertiílo [140]. Los cationes metálicos, como los iones férricos, también pueden oxidar a los persulfuros generando radicales pertiílo (Ec. 29) [141]. La interacción de los persulfuros con metales se profundiza más adelante.

Ec. 27 RSSH + A• \rightarrow RSS• + AH Ec. 28 RSS⁻ + A• \rightarrow RSS• + A⁻ Ec. 29 RSSH + Fe³⁺ \rightarrow RSS• + H+ + Fe²⁺

Los persulfuros son mejores reductores por un electrón que los tioles y el H_2S . Esto se puede atribuir a varios factores [101,110,131]. En primer lugar, al potencial de reducción; el de los persulfuros es menor que el de los tioles y el del H_2S , por lo que pueden ser oxidados por oxidantes más débiles ($E^{\circ'}(RSS^{\circ}/RSS^{-}) = 0.68 \text{ V}, E^{\circ'}(RS^{\circ}, H^+/RSH) = 0.96 \text{ V}, E^{\circ'}(S^{\circ-}, H^+/HS^{-}) = 0.91 \text{ V}$ [142]). En segundo lugar, la energía de disociación del enlace S-H es menor para los persulfuros (70 kcal/mol) que para los tioles (87 kcal/mol) y el H_2S (92 kcal/mol) [109,110,143]. A su vez, las reacciones de oxidantes de un electrón con persulfuros son más rápidas que las reacciones con tioles [101,110]. Por último, el producto de oxidación de los persulfuros es más estable que el producto de los tioles (radical tiílo, RS[•]) y de H_2S (radical sulfhidrilo, $HS^{\bullet}/S^{\bullet-}$), debido a que el electrón desapareado en el radical pertiílo se encuentra delocalizado entre los dos átomos de azufre [101,111].

La reducción por un electrón mediada por persulfuros se ha evidenciado en varias oportunidades. Por ejemplo, los persulfuros son capaces de reducir los iones férricos del ferricianuro [131], el citocromo *c* férrico [53,106,144]

y la metamioglobina [131]. Los persulfuros también reducen a radicales centrados en carbono, como los radicales alquilo (R•); centrados en oxígeno, como los radicales alcoxilo (RO•), radicales peroxilo (ROO•) y radicales nitróxido (R₂NO•); y en azufre, como los radicales tiílo [101,110,111,131,145]. Estas reacciones son muy rápidas ($10^{6}-10^{10}$ M⁻¹ s⁻¹), llegando a tener constantes de velocidad 1-4 órdenes de magnitud mayores que las de los tioles [110]. También se ha evidenciado la generación de óxido nítrico (•NO) a partir de persulfuros orgánicos y nitrito (NO_2^-) mediante la formación de radicales derivados de los persulfuros [146].

La principal vía de descomposición del radical pertiílo es la dimerización al dialquiltetrasulfuro correspondiente (RSSSSR) (Ec. 30) [101,145,147,148].

Ec. 30 2 RSS• \rightarrow RSSSSR

Las reacciones de dimerización de los radicales pertiílo tienen constantes de velocidad cercanas al límite de difusión, de 1-6 × 10⁹ M⁻¹ s⁻¹ (Ec. 30) [101,145,147]. De hecho, cuando se descompuso un dialquiltetrasulfuro fotolíticamente, el radical pertiílo generado se volvió a dimerizar rápidamente [145]. Análogamente, las reacciones de GSSH con citocromo *c* férrico o con radicales generaron el dialquiltetrasulfuro de glutatión (GSSSSG) [34]. La eficiencia de la dimerización podría explicar cómo ocurren algunas reacciones termodinámicamente desfavorables en las que se forman radicales pertiílo, como las reacciones de TEMPOL con CH₃SSH [131], del MCP-SSH con citocromo *c* férrico [106,142] y de persulfuros con O_2 [149,150].

Las velocidades de dimerización de los radicales pertiílo también explican por qué estas especies prácticamente no reaccionan con otras moléculas. Una alternativa a la dimerización, por analogía con los tioles, es la reacción con persulfuros deprotonados para formar un intermediario anión radical tetrasulfuro (RSSSSR^{•–}) (Ec. 31). Este intermediario podría reaccionar con dioxígeno para dar radical superóxido y tetrasulfuro (Ec. 32), aunque dicho intermediario no se ha observado experimentalmente [151]. Análogamente, los radicales pertiílo podrían reaccionar con tioles para producir aniones radicales trisulfuros (RSSSR^{•–}) [101].

Ec. 31 RSS[•] + RSS⁻ \rightarrow RSSSSR^{•-}

Ec. 32 RSSSSR^{•–} + $O_2 \rightarrow RSSSSR + O_2^{•–}$

Estudios relativamente recientes demostraron que los radicales pertiílo no reaccionan con dioxígeno [131,145], a pesar de que los primeros estudios propusieran que reaccionaban formando radicales pertioperoxilo (RSSOO*) [147], en reacciones análogas a la formación de radicales tioperoxilo (RSOO*) a partir de radicales tiílo y dioxígeno [152–155]. A su vez, se investigó la posibilidad de que los radicales pertiílo reaccionaran con óxido nítrico para formar nitrosopersulfuros (RSSNO) en reacciones análogas a las de los radicales tiílo para dar nitrosotioles (RSNO) [156]. Sin embargo, no parecerían reaccionar. Los intentos de formación de nitrosopersulfuros por esta vía terminaron en formación de óxido nítrico y tetrasulfuro [131], indicando que el radical pertiílo se había dimerizado en lugar de haber reaccionado con el ácido nítrico. Incluso, parece improbable que las especies nitrosopersulfuros existan a temperatura ambiente [131,146].

Adicionalmente, se ha planteado la posibilidad de que el ascorbato (vitamina C), el a-tocoferol (vitamina E) y reductasas pudieran reaccionar con los radicales pertiílo para reciclar los persulfuros [133]. En este sentido, se determinó una constante cinética de 4.1×10^6 M⁻¹ s⁻¹ para la reacción de un radical pertiílo con ascorbato [147]. Considerando que las velocidades de reacción dependen de las constantes cinéticas y de las concentraciones de los reactivos, esto podría suceder en contextos biológicos con bajas concentraciones de radical pertiílo donde se desfavorece su dimerización. No obstante, se necesita más investigación para determinar la relevancia fisiológica de estas reacciones.

Los tetrasulfuros resultantes de la dimerización de los radicales pertiílo podrían descomponerse por intercambio con tioles para formar persulfuros, disulfuros, tioles, H₂S y azufre elemental [8,36]. Independientemente del destino del tetrasulfuro, se puede concluir que los persulfuros pueden actuar como un sumidero de radicales para terminar la propagación radicalaria en procesos en cadena.

La relevancia biológica de la oxidación por un electrón de los persulfuros quedó de manifiesto con la reciente propuesta de que los persulfuros podrían ayudar a combatir la ferroptosis [34–36]. El término "ferroptosis" fue acuñado en 2012 para describir un mecanismo de muerte celular distinto a la apoptosis y la necrosis, que se caracteriza por una peroxidación lipídica excesiva dependiente de hierro (Figura 11) [157]. Se propone que los persulfuros pueden atrapar a los radicales lipoperóxido con constantes de velocidad de 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ para formar radicales pertiílo que posteriormente dimerizan a tetrasulfuros (Figura 11) [35]. Este mecanismo inhibiría la propagación radicalaria lipídica contribuyendo a detener la ferroptosis [34–36]. La ferroptosis también puede ser inhibida por la glutatión peroxidasa 4 mediante reacciones con lipoperóxidos (ROOH, no radicales) y GSH [36,157,158].



Figura 11. Mecanismo simplificado de la ferroptosis y su inhibición por persulfuros. Inhibición por persulfuros de la peroxidación lipídica excesiva dependiente de hierro que sucede en la ferroptosis. En la iniciación (Inic), un lípido insaturado (L-H) reacciona con un lípido alcoxil radical (LO[•]) o algún otro oxidante de un electrón iniciador; se produce un lípido radical (L[•]) que, a expensas de O₂, forma un lípido peroxil radical (LOO[•]). En la propagación (Prop), el LOO[•] reacciona con otro L-H; se produce otro L[•] y un lípido peróxido (LOOH), que forma otro LO[•] utilizando iones ferrosos iniciando nuevamente la cadena radicalaria. En la inhibición (Inh) por persulfuros, éstos reaccionan con LOO[•] generando radicales pertiílo (RSS[•]), que tras dimerizar, forman tetrasulfuros (RSSSSR).

1.4.4. Electrofilia

A diferencia de los tioles y el H_2S , que en general se comportan solo como nucleófilos, los persulfuros también presentan reactividad electrofílica. Por lo tanto, la modificación de un tiol a un persulfuro genera una propiedad que estaba ausente en el tiol original. La electrofilia se atribuye a los persulfuros protonados [150], aunque ciertos persulfuros proteicos podrían actuar como electrófilos en su estado deprotonado [159].

Ambos átomos de azufre constituyen centros electrofílicos susceptibles al ataque de nucleófilos. Un estudio computacional utilizando metanopersulfuro reveló la viabilidad del ataque de un nucleófilo a cualquiera de los átomos de azufre, con una leve preferencia por el azufre terminal [150]. El sitio de ataque depende del impedimento estérico (los persulfuros con sustituyentes voluminosos son más propensos a ser atacados en el azufre externo [103,104,160]) y del p K_a del grupo saliente (favoreciendo la salida del que tenga menor pK_a). El ataque de un nucleófilo en el azufre interno genera H₂S y un derivado del persulfuro y del nucleófilo (Figura 12a), mientras que el ataque en el azufre externo produce un tiol y un derivado del nucleófilo con azufre (Figura 12c). Las reacciones de nucleófilos con persulfuros de bajo peso molecular favorecerían la formación de H₂S ($pK_a = 6.98$ [161]) frente a la generación del tiol de bajo peso molecular (por ejemplo, $pK_{a, Cys} = 8.29$, $pK_{a, GSH} = 8.94$ [115]). Sin embargo, en un entorno proteico donde se pueden encontrar cisteínas con pK_{as} muy bajos, se podría favorecer la formación del tiol. Por ejemplo, en el ciclo catalítico de la MST humana, el sustrato nucleofílico ataca al azufre externo del persulfuro proteico intermediario y se regenera la enzima tiol. El sitio activo impide estéricamente el ataque sobre el azufre interno y aumenta la electrofilia del azufre externo [159]. En este caso, la enzima tiol $(pK_a \text{ de } 5.2 \text{ [87]})$ constituye un mejor grupo saliente que el H₂S $(pK_a = 6.98 \text{ m})$ [161]).

Cuando el nucleófilo es un tiolato y ataca al azufre interno, se produce un disulfuro además de formarse H_2S (Figura 12*b*) [52,104,106], es decir, la reacción reversa de una de las vías de formación de persulfuros (Ec. 1). No hay datos cinéticos para las reacciones entre persulfuros de bajo peso molecular y tioles de bajo peso molecular a pH fisiológico. Sin embargo, es de esperar que estas reacciones no sean extraordinariamente rápidas, basado en experimentos donde el H_2S fue consumido casi que completamente por disulfuros de bajo peso molecular, lo cual no hubiera ocurrido si la reacción reversa (RSSH y RS⁻) fuera significativa [51].

49



Figura 12. Acidez y reactividad de los persulfuros. En solución acuosa, los persulfuros protonados (RSSH) y deprotonados (RSS⁻) se encuentran en equilibrio rápido. Las especies protonadas poseen dos centros electrofílicos, uno en cada azufre. El ataque en el azufre interno genera HS⁻ (*a*); cuando el nucleófilo es un tiolato, además se produce un disulfuro (*b*). El ataque nucleofílico en el azufre externo produce RS⁻ (*c*); cuando el nucleófilo es un tiolato, se forma un nuevo persulfuro a nivel del tiol atacante en una reacción de transpersulfuración (*d*). Los persulfuros aniónicos se comportan como nucleófilos y reaccionan con electrófilos formando derivados disulfuros (*e*); cuando el electrófilo es un disulfuro, se forma un dialquiltrisulfuro y un tiolato (*f*).

En el contexto de un tiol o persulfuro proteico, la formación de un disulfuro y H_2S a partir de tiol y persulfuro *in vivo* podría ser factible. A la Trx y al par GSH/glutarredoxina, que forman parte de los sistemas reductores celulares por excelencia, se les ha atribuido el rol de depersulfurasa, ya que pueden reducir persulfuros proteicos y de bajo peso molecular restaurando los tioles originales [2–4]. Si bien el mecanismo de decaimiento de persulfuros por estas vías aún no ha sido completamente elucidado, se propone que implica la formación de un persulfuro sobre la óxidorreductasa y su posterior reacción con un tiol de la misma proteína para dar la proteína disulfuro y H_2S [2–4]. Este mecanismo (Figura 12*b*) también se ha sugerido para la

activación de Nrf2 por Keap1; cuando un tiol proteico ataca el persulfuro de Keap1/Nrf2, se formaría H₂S y un disulfuro mixto entre la proteína atacante y Keap1 que llevaría a liberar y activar Nrf2 [162]. A su vez, el GSH puede atacar al persulfuro derivado de DATS para dar H₂S (ver Figura 5A). De hecho, a los derivados organosulfurados del ajo se los considera dadores de H₂S [81,163].

Por otro lado, cuando un tiolato ataca el azufre externo, se forma un tiol al nivel del persulfuro original y un nuevo persulfuro en el tiol atacante (Figura 12*d*). Esta es la reacción de transpersulfuración mencionada anteriormente. El azufre externo puede ser atacado por otros nucleófilos diferentes a los tioles, como cianuro, sulfito [160,164], aminas [165], hidróxido [166] y fosfinas terciarias [104,167]. La reacción con cianuro produce tiocianato (SCN⁻) (Ec. 33), y es la base del método de cianólisis fría comúnmente utilizado para cuantificar persulfuros y otros compuestos con azufre sulfano (detallado en 1.5.2) [1]. Por su parte, la reacción con sulfito produce tiosulfato (Ec. 34) [41,42], la reacción reversa de la formación de persulfuro a partir de tiosulfato (ver Ec. 8).

Ec. 33 RSSH + CN⁻ \rightarrow RSH + SCN⁻ Ec. 34 RSSH + SO₃²⁻ \rightleftharpoons RS⁻ + HSSO₃⁻

Las reacciones de persulfuros actuando como electrófilos están involucradas en diversos procesos metabólicos. Los persulfuros formados en las cisteína desulfurasas, como las que participan en la biosíntesis de centros ferrosulfurados, transfieren el azufre sulfano a tioles en proteínas andamio [168,169]. En las vías de catabolismo del H₂S, el ataque de un tiolato, sulfito o cianuro en el azufre externo de los persulfuros formados en las enzimas SQR, MST o rodanesa, regenera el tiol de las enzimas y forma un persulfuro, tiosulfato o tiocianato, respectivamente [41–43,75,170–172]. Recientemente, se ha adjudicado un rol persulfurasa de proteínas a la MST en el estado persulfuro, por su presunta capacidad para persulfurar varios tioles proteicos en reacciones de transpersulfuración (ver 1.6.2) [173].

Debido a los bajos p K_a s que se predicen para los persulfuros, se prevé que la proporción de persulfuros protonados (con carácter electrofílico) a pH

fisiológico sea mínima. No obstante, hay varios ejemplos de persulfuros que desempeñan roles electrofílicos *in vivo*. Esta aparente paradoja resalta la imperativa necesidad de conocer las propiedades básicas de los persulfuros para lograr una comprensión más profunda de las implicancias biológicas.

1.4.5. Desproporcionación

El carácter nucleofílico y electrofílico de los persulfuros implica que una solución de persulfuros pueda sufrir una reacción de desproporcionación causando un decaimiento espontáneo. El ataque de un persulfuro al azufre interno de otro persulfuro produciría H₂S y el dialquiltrisulfuro (Ec. 35), mientras que el ataque al azufre externo generaría tiol e hidrotrisulfuro (Ec. 36). El sitio de ataque y por lo tanto los productos que se formen, dependerán del impedimento estérico y de la acidez de los grupos salientes. A su vez, los polisulfuros pueden seguir reaccionando entre sí cambiando la longitud de la cadena hasta formar azufre elemental [80,103,166].

Ec. 35 $RSSH + RSS^{-} \Rightarrow RSSSR + HS^{-}$

Ec. 36
$$RSSH + RSS^- \rightleftharpoons RSSSH + RS^-$$

En un estudio en el que se analizaron los productos generados por cistina y la enzima CSE, que forman CysSSH (ver 1.3.3), se detectaron concentraciones significativas del dialquiltri y pentasulfuro correspondientes (CysSSSCys y CysSSSSCys, respectivamente) y en menor medida, del dialquiltetrasulfuro (CysSSSSCys) [88]. Esto llevó a los autores a concluir que el CysSSH decae principalmente por la Ec. 35 en una escala de tiempo de minutos [88]. Esto es coherente con que el H₂S constituya un mejor grupo saliente que la cisteína ($pK_{a H2S} = 6.98$ [161]; $pK_{a Cys} = 8.29$ [115]). No obstante, es importante considerar que, además de la reacción con otro persulfuro, el persulfuro formado enzimáticamente pudo haber reaccionado con la cistina remanente formando polisulfuros (ver Ec. 23). Esta consideración es bien relevante, pues el GSSH en presencia de exceso de GSSG genera el trisulfuro correspondiente [58,119].

Si bien está aceptado que los persulfuros de bajo peso molecular son inestables en solución acuosa, no está claro por cuál vía decaen

52

fenómeno preferentemente. Para comprender mejor el de desproporcionación de los persulfuros, sería conveniente estudiarlos en ausencia de otras especies. En este sentido, el MCP-SSH, que se forma una vez que el precursor MCPD es incubado en medio acuoso (ver Figura 8C), decayó con una vida media de 2.7 min (pH 7.4 y 23 °C) produciendo el tiol análogo, sugiriendo que decae según la Ec. 36 [2,106]. Como parte de esta tesis, se intentó aislar el GSSH a través de varios y distintos mecanismos, pero no se tuvo éxito. En todos los intentos se detectó la presencia de otras especies consistente con el decaimiento en medio acuoso (ver 3.1). En conclusión, es indispensable considerar la inestabilidad de persulfuros de bajo peso molecular al momento de formar y cuantificar persulfuros. El escenario con persulfuros formados en proteínas es distinto, ya que los entornos proteicos podrían protegerlos del decaimiento espontáneo o dirigir la reactividad hacia blancos específicos.

La química de las reacciones entre persulfuros es explotada en los reguladores bacterianos sensores de persulfuros regulan que la transcripción mediante la formación de dialquilpolisulfuros intramoleculares, como SgrR de R. capsulatus, BigR de A. baumanii y HlyU de V. cholerae. Uno de los mecanismos que se proponen para la formación de los dialquilpolisulfuros involucra la reacción entre GSSH y los persulfuros formados en los reguladores para formar los trisulfuros mixtos correspondientes y H₂S [174–178].

1.4.6. Interacción con metales y metaloproteínas

Al igual que los tiolatos, los persulfuros pueden formar complejos con metales. Se han caracterizado complejos de persulfuros con iones de cobre, iridio, platino, titanio, tungsteno, hierro, rutenio y zinc en los que el azufre terminal establece enlaces de coordinación [138,179]. Estas interacciones podrían proporcionar protección contra la toxicidad de metales pesados, como en el caso de compuestos tóxicos de mercurio y cadmio, donde la presencia de persulfuros *in vivo* llevó a la formación de compuestos menos tóxicos [180–182]. Aunque los complejos formados con metaloproteínas se conocen en menor medida que los de bajo peso molecular, se ha demostrado que los centros metálicos de varias proteínas interactúan con

persulfuros mediante coordinación y/o reducción [138,179,183]. Considerando que ambos átomos de azufre de los persulfuros son electrofílicos, un nucleófilo podría atacar al complejo metal-persulfuro en tres sitios, en el metal y en ambos átomos de azufre, ampliando los posibles mecanismos de reacción en comparación con un complejo metal-tiol, que solo puede ser atacado en el centro metálico [184].

Los persulfuros pueden reaccionar con proteínas que contienen hierro, tanto en hemo como no hémico. Algunos ejemplos son: a) el citocromo *c* férrico, el GSSH lo reduce al estado ferroso (Ec. 29) [53,106,144]; b) la persulfuro dioxigenasa, el GSSH se une directamente al hierro ferroso del sitio activo desplazando una molécula de agua [46,47]; c) la microperoxidasa-11 en el estado *N*-acetilada, el CysSSH o el MCP-SSH coordinan su forma férrica [183]; y d) la mioglobina férrica, el CysSSH, GSSH o el MCP-SSH la reducen, dando mioglobina oxigenada o desoxigenada dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno [183]. Existen ejemplos adicionales de proteínas con hierro, incluyendo bacterianas [185–187], que reaccionan con persulfuros. También hay ejemplos con otros iones metálicos, se sugiere que el complejo Cys-SS-Mo de la nitrito reductasa NapAB bacteriana se forma mediante la reacción de un residuo CysSSH y el molibdeno [138,188].

1.5. Métodos de detección

Las propiedades fisicoquímicas de los persulfuros hacen que su detección sea un gran desafío. Por un lado, la inestabilidad de los persulfuros de bajo peso molecular en medio acuoso impide obtener preparados puros. Esto implica tener que trabajar con mezclas de especies y no poder contar con estándares de concentración conocida. Por otro lado, los persulfuros comparten propiedades con las especies comúnmente presentes en los preparados y muestras biológicas, como la nucleofilia con los tioles y el H₂S, y la electrofilia con los disulfuros y los sulfénicos. En consecuencia, la mayoría de las técnicas de detección y cuantificación de persulfuros se basan en estrategias de derivatización, con el fin de que los productos que derivan de los persulfuros sean distintos de los derivados de las especies adicionales que puedan estar presentes. A su vez, la mayoría de los

métodos desarrollados se han centrado exclusivamente en persulfuros proteicos, especialmente con el objetivo de realizar estudios proteómicos. Si bien el campo de detección de persulfuros ha avanzado significativamente en los últimos años, aún se continúa trabajando para desarrollar métodos más específicos y sensibles. Algunas revisiones con comparaciones de los métodos disponibles pueden encontrarse en [8,21,189].

1.5.1. Absorbancia

La absorbancia de los persulfuros a 335-340 nm puede ser aprovechada para su detección y cuantificación [53,190,191]. Sin embargo, el bajo coeficiente de extinción de ~460 M⁻¹ cm⁻¹ a 335 nm [191] limita su uso en ensayos complejos. En términos generales, la utilización de la absorbancia directa de persulfuros como método de detección es poco común.

1.5.2. Cianólisis fría

El método de cianólisis fría se basa en la reacción electrofílica de los persulfuros con cianuro para formar tiocianato a temperatura ambiente. En primer lugar, los persulfuros son incubados durante 45 min con un exceso de cianuro a pH alcalino para favorecer la reacción. El tiocianato producido es expuesto a iones férricos para formar el complejo tiocianato férrico (Fe(SCN)²⁺), que tiene un color rojo característico y puede ser cuantificado inmediatamente después de su formación por absorbancia a 460 nm (Figura 13). Esta última reacción se realiza a pH ácido y en presencia de formaldehído para consumir el cianuro remanente [1].



Figura 13. Método de cianólisis fría

La cianólisis fría es una de las metodología más utilizadas en la literatura para cuantificar persulfuros, especialmente persulfuros de bajo peso molecular [46,47,54,55,173,176,192]. Sin embargo, la interpretación de los resultados con esta técnica requiere tener cierta cautela que muchas veces

está ausente en la literatura. Aunque más lentamente, el cianuro también puede reaccionar con otros compuestos con azufre sulfano para formar tiocianato, como polisulfuros, tiosulfonatos (RSO_2S^-), politionatos ($^-O_3S-S_n^ SO_3^-$) y azufre elemental [1,79,193]. Por lo tanto, al momento de diseñar y analizar un experimento de cianólisis fría es muy importante considerar que, dada la reactividad de los persulfuros, las muestras de persulfuros posiblemente contengan compuestos con azufre sulfano adicionales que también serán detectados. Por otro lado, por las condiciones extremas de incubación, este método no es adecuado para muestras *in vivo*.

1.5.3. Reacción con triarilfosfinas

La reacción de una triarilfosfina (R₃P) con un persulfuro produce el sulfuro de la fosfina (R₃P=S) [167] (Figura 14). Este último puede ser cuantificado por cromatografía de gases o espectrometría de masas usando un estándar interno marcado isotópicamente [194,195]. Considerando que este método se basa en la electrofilia del azufre externo de los persulfuros, la fosfina también puede reaccionar con otras especies con azufre sulfano. Por lo tanto, al igual que la cianólisis fría, este método detecta azufre sulfano en general y no persulfuros selectivamente. Este método ha permitido verificar la formación de persulfuros en solución [51], así como medir niveles de azufre sulfano en varios tejidos de ratón [195].



Figura 14. Reacción de triarilfosfinas con persulfuros. La reacción de trifenilfosfina (como ejemplo de fosfina) con un persulfuro genera el sulfuro de trifenilfosfina.

1.5.4. Reducción y liberación de H₂S

La reducción de un persulfuro genera el tiol correspondiente y H₂S. Para cuantificar persulfuros, es necesario reducir el persulfuro con agentes reductores, como ditiotreitol (DTT) o tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), y seguir la formación de H₂S como medida indirecta de la concentración del persulfuro (Ec. 37) [21]. El H₂S liberado puede ser cuantificado por algún método específico para H₂S, como el método de azul de metileno [196] o con la sonda fluorogénica 2-maleimidoetil-4-pirenilbutanoato (MEPB) [197].

Ec. 37 RSSH $\xrightarrow{\text{DTT/TCEP}}$ RSH + H₂S

Para evitar sobreestimaciones, es recomendable comparar las concentraciones de H_2S antes y después del paso de reducción, pues el decaimiento espontáneo de los persulfuros puede generar H_2S (ver Ec. 35). La presencia de otras especies que puedan dar H_2S tras su reducción también debe ser considerada, como los hidropolisulfuros. Adicionalmente, esta estrategia no es conveniente para medir persulfuros en presencia de altas concentraciones de H_2S , como en el caso de persulfuros que hayan sido formados a partir de un exceso de H_2S y derivados oxidados de tioles (ver 1.3.1).

1.5.5. Reacción con FDNB

La reacción con 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (FDNB) ha sido utilizada para cuantificar persulfuros proteicos y de bajo peso molecular [198,199]. Dicha reacción produce disulfuros de dinitrobenceno. Luego de remover el exceso del reactivo, los disulfuros derivados pueden ser reducidos con DTT para producir 2,4-dinitrotiofenol (DNTF), que puede ser cuantificado por absorbancia a pH alcalino (ϵ_{408} = 13800 M⁻¹ cm⁻¹) (Figura 15) [198]. De esta manera, la concentración de DNTF representaría la del persulfuro en la ensayo muestra original. No obstante, este presenta algunos inconvenientes. Los disulfuros de dinitrobenceno presentan reactividad frente a los persulfuros, produciendo trisulfuros y DNTF (Figura 15) [189]. Esta reacción paralela generaría una subestimación de la concentración de persulfuros, ya que se genera una molécula de DNTF por una ruta que consume dos de persulfuro. Contrariamente, podría haber falsos positivos como resultado de las reacciones de FDNB con hidropolisulfuros (posiblemente presentes en mezclas con persulfuros de bajo peso molecular), pues la reducción de los derivados correspondientes libera DNTF [189].



Figura 15. Reacción con FDNB para detectar persulfuros

1.5.6. Agentes alquilantes y espectrometría de masas

Dada la inestabilidad de los persulfuros, la detección directa de persulfuros por espectrometría de masas no es usual, aunque hay algunos ejemplos [2,28,200]. Una estrategia para sobrellevar esta limitación consiste en la alquilación de los persulfuros y el análisis por espectrometría de masas de los productos derivatizados. Esta técnica es comúnmente utilizada tanto para persulfuros de baio peso molecular como proteicos [48,52,53,58,64,81,119,201]. En el caso de muestras proteicas, se puede incluir un paso de digestión luego de la alquilación para analizar los péptidos [201]. También se ha adicionado un paso de cromatografía de fase reversa previo al análisis por espectrometría de masas [48,52,81,119,201].

El ataque nucleofílico de un persulfuro a un agente alquilante forma el disulfuro mixto correspondiente (Figura 16A). Dentro de los alquilantes más usados se encuentran el mBrB, NEM, IAM, β -(4-hidroxifenil)etil iodoacetamida (HPE-IAM), *N-t*-butil-iodocetamida (*N-t*-butil-IAM) y ácido

58

iodoacético (IAA). Otros reactivos usados, que son capaces de generar derivados trisulfuro al reaccionar con persulfuros, son el S-metil metanotiosulfonato (MMTS) y el S-4-bromobencil metanotiosulfonato (BBTMS). Un trabajo publicado en 2019 comparó la detección de persulfuros con mBrB, HPE-IAM y NEM en mezclas que contenían persulfuros de bajo peso molecular [119]. Este estudio concluyó que los niveles de detección variaban con el tiempo de incubación y la concentración del alguilante, incitando a utilizar condiciones de alquilación rápidas y la realización de los controles correspondientes según el diseño experimental. Por ejemplo, se debe tener en cuenta que la reacción de alguilación con NEM es reversible [202,203]. Por otro lado, con el fin de determinar los alquilantes más adecuados, un trabajo reciente comparó sistemáticamente la estabilidad de persulfuros proteicos derivatizados. En dicho trabajo se recomienda el uso de mBrB y de N-t-butil-IAM (los productos de derivatización resultaron altamente estables), mientras que se desaconseja el uso de IAA y HPE-IAM (sus derivados decayeron parcialmente) y se desestimula el uso de NEM (sus productos decayeron completamente). El decaimiento se adjudicó a la tautomerización de los productos derivatizados para formar tiosulfóxidos, que se favorece por la presencia de un grupo carbonilo en la posición β respecto al disulfuro, pero se atenúa cuando el alguilante es voluminoso, como mBrB y N-t-butil-IAM [64]. Es importante aclarar que esta comparación entre agentes alquilantes fue publicada en 2022, por lo que no se contó con esta información durante la mayor parte de esta tesis.

Considerando que la estrategia de alquilación y posterior análisis por espectrometría de masas se basa en el carácter nucleofílico de los persulfuros, hay que tener en cuenta que otras especies nucleofílicas, como los tioles y el H₂S, también pueden ser alquiladas [115,204]. Sin embargo, los productos de derivatización son distintos y pueden ser diferenciados en la etapa de espectrometría de masas (Figura 16B,C).

Si bien la alquilación y análisis por espectrometría de masas constituye un método preciso de detección de persulfuros, el hecho de no contar con estándares de persulfuros dificulta que sirva como un método de cuantificación. Para que la detección sea cuantitativa se puede recurrir a pasos adicionales. Por ejemplo, la reducción del persulfuro derivatizado con

59

agentes reductores genera cantidades estequiométricas del tiol original, a diferencia del tiol derivatizado que no puede ser reducido (Figura 16A,B) [51,52,114].



Figura 16. Alquilación de persulfuros, tioles y H₂S. Reacciones con mBrB como ejemplo de agente alquilante. **A)** El ataque de un persulfuro a mBrB genera un disulfuro mixto que su vez puede reaccionar con un agente reductor para dar los tioles correspondientes. **B)** El ataque de un tiolato a mBrB produce un derivado tioéter que no puede reaccionar con reductores. **C)** El H₂S puede reaccionar con dos moléculas de mBrB para formar bis-S-bimano.

1.5.7. Sondas fluorogénicas

El grupo de Xian ha desarrollado una serie de sondas fluorogénicas a las que denominó SSP (por la sigla de "sulfane sulfur probe") que permiten cuantificar azufre sulfano siguiendo fluorescencia [205–208]. Las sondas contienen un tiofenol, un conector éster y un fluoróforo con un grupo hidroxilo unido al éster. Hasta el momento han creado cuatro versiones: SSP1, SSP2, SSP4 y SSP5 (Figura 17A). El método se basa en el ataque del tiofenol de las sondas al azufre sulfano para generar un persulfuro

intermediario capaz de atacar el éster y liberar el fluoróforo (Figura 17A). Estas sondas han mostrado tal sensibilidad que actualmente están disponibles comercialmente. El acceso a las sondas SSP está siendo aprovechado por otros grupos de investigación, que las están usando para distintos experimentos, incluyendo experimentos con células *in vivo* [189].



Figura 17. Sondas fluorogénicas para detectar persulfuros. A) Estructuras de las sondas SSP y su mecanismo de reacción general. **B)** Mecanismo de reacción de SSip-1.

Las sondas SSP reaccionan con azufre sulfano irreversiblemente y, por lo tanto, no pueden ser utilizadas para visualizar la dinámica intracelular del pool del mismo. Por esta razón, el grupo de Urano desarrolló una sonda fluorogénica que se regenera a la que denominó SSip-1 (Figura 17B). Además, desarrolló una versión modificada, SSip-1 DA, que posee mejor permeabilidad de membrana [209]. Estas sondas consisten en fluoresceína unida a 2-tiorrodamina B mediante un conector ciclohexilo. La fluorescencia de la fluoresceína se encuentra apagada debido al fenómeno de FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster). El ataque a un azufre sulfano genera un persulfuro intermediario en la rodamina que espirocicla inhibiendo el FRET y generando una señal de fluorescencia intensa (Figura 17B). La inhibición del FRET puede ser revertida por tioles como GSH. Esta sonda ha sido utilizada en diversos estudios biológicos incluyendo la estimación de niveles de persulfuro en tejidos en hipoxia [189,209,210]. Se han desarrollado sondas adicionales para detectar persulfuros y azufres sulfanos que tienen como base la inhibición del FRET [211,212].

1.5.8. Métodos para estudios proteómicos de persulfuros

El hecho de conocer cuáles proteínas se persulfuran es muy importante, ya que da indicios de la participación de los persulfuros en los distintos procesos fisiológicos y podría contribuir al entendimiento de los roles de los persulfuros. Se han desarrollado varias estrategias con el fin de realizar estudios proteómicos de proteínas persulfuradas. Estos métodos se basan en el carácter nucleofílico de los persulfuros y comienzan con el bloqueo de los persulfuros y tioles de las cisteínas proteicas. En los pasos siguientes, se busca distinguir los productos que provienen de los persulfuros (disulfuros) de los que provienen de los tioles (tioéteres). Con el creciente interés por los persulfuros en los últimos años, hubo varios grupos de investigación trabajando en simultáneo en el desarrollo de metodologías para su detección. Consecuentemente, algunos de los métodos propuestos presentan estrategias similares.

Cambio de biotina modificado

El trabajo del grupo de Snyder de 2009 que propuso persulfuración *in vivo* por primera vez, propuso un método con el que estimó que hasta el 25 % de las proteínas hepáticas de ratón estaban persulfuradas [28]. El método

se basaba en marcar a los persulfuros con biotina y luego detectar los péptidos biotinilados con anticuerpos anti-biotina o extraerlos con perlas de agarosa con estreptavidina. Para detectar únicamente a los persulfuros, el método proponía bloquear a los tioles con MMTS asumiendo que los persulfuros no reaccionaban [28]. No obstante, pocos años después, en 2013, se comprobó que el MMTS y los persulfuros sí reaccionan, atribuyendo los resultados obtenidos anteriormente a una alquilación incompleta [52]. A pesar de que este método ya no se usa, este estudio marcó un antes y después en la relevancia de los persulfuros y en la búsqueda de métodos de detección.

Ensayo de maleimida

El grupo de Snyder propuso otro método de detección en 2012 [213]. Implica la exposición de las proteínas a la maleimida roja (NEM unido al fluoróforo Alexa Fluor 680), la reducción con DTT y la visualización de las proteínas en geles de acrilamida. En el primer paso, tanto los persulfuros como los tioles quedan marcados. Tras la reducción, las marcas de los persulfuros se pierden, pero las de los tioles permanecen. Luego, los persulfuros son detectados por la pérdida de fluorescencia en geles (Figura 18) [213]. La mayor limitación de esta metodología radica en que el cambio de fluorescencia podría ser difícil de percibir. Una estrategia alternativa es el uso de una maleimida unida a un péptido de 2 kDa en lugar de la maleimida roja. En este caso, un cambio en la migración electroforética luego de reducir las proteínas sería indicativa de la presencia de persulfuros [214]. El ensayo de maleimida permitió plantear la persulfuración postraduccional en NF-κB [213].



Figura 18. Ensayo de maleimida roja para detectar persulfuros

Reacción con IAA

Este método fue publicado por el grupo de Tonks en 2011 [200]. Consiste en tres pasos; la alquilación de persulfuros y tioles con IAA, la reducción de los disulfuros mixtos provenientes de los persulfuros con DTT y la reacción de los tioles resultantes con IAM unida a biotina (Figura 19). Esto resulta en conjugados de biotina donde originalmente había persulfuros que pueden ser detectados por espectrometría de masas. La estrategia fue usada para identificar la inactivación mediada por H₂S de la proteína tirosina fosfatasa 1B (PTP1B) en condiciones de estrés [200]. Este método puede dar falsos positivos, pues la etapa inicial de alquilación debe ser exhaustiva y el DTT también puede reducir los disulfuros naturales de las proteínas [189].



Figura 19. Reacción con IAA para detectar persulfuros

ProPerDP

El método ProPerDP ("Protein Persulfide Detection Protocol"), fue publicado en 2016 por el grupo de Nagy [4]. Este método usa iodoacetil-PEG₂-biotina para marcar a los persulfuros y los tioles. Los conjugados resultantes son capturados con perlas magnéticas recubiertas de estreptavidina. Al agregar un reductor a las muestras, los disulfuros derivados de los persulfuros son liberados mientras que los tioéteres derivados de los tioles permanecen unidos a las perlas. Las proteínas liberadas, que corresponden a las proteínas que contenían persulfuros originalmente, pueden ser cuantificadas por SDS-PAGE o identificadas por espectrometría de masas. Los tioéteres derivados de los tioles también pueden ser detectados por SDS-PAGE tras la liberación de las perlas por ebullición en SDS (Figura 20). Esta metodología fue utilizada para estimar que el 0.15 % de las proteínas de las células HEK293 se encuentran persulfuradas [4].



Figura 20. Método ProPerDP para detectar persulfuros proteicos

Esta metodología presenta algunos inconvenientes. Por un lado, no distingue entre persulfuros y polisulfuros, pudiendo resultar en falsos positivos. Por otro lado, los disulfuros intermoleculares también podrían llevar a una sobreestimación de persulfuros, ya que, si están expuestos y son reducidos, los tioles resultantes se confunden con los tioles provenientes del tratamiento de los persulfuros. Según controles hechos por los autores, suponen que esta sobreestimación de persulfuros es mínima. Por último, si bien el paso de reducción libera a los disulfuros provenientes de los persulfuros de la estreptavidina, en el caso de que la proteína original tuviera persulfuros y tioles, la misma podría quedar retenida a la estreptavidina aún después del paso de reducción por los tioéteres, resultando en falsos negativos. Para combatir las barreras metodológicas, los autores sugieren agregar un paso de digestión luego del paso de alquilación y un análisis por espectrometría de masas de los péptidos que se liberan de la estreptavidina tras la reducción, pero ellos no lo implementaron [4].

BTA

El grupo de Filipovic por un lado [51] y el grupo de Hatzoglou por otro [215], implementaron métodos muy similares entre ellos y similares al ProPerDP. Los artículos con estas estrategias fueron publicados a mitad y fines de 2015, respectivamente, por lo que los experimentos fueron contemporáneos a los de la publicación del ProPerDP [4]. La publicación de Hatzoglou denominó al método BTA ("Biotin Thiol Assay") [215], mientras que la de Filipovic no le asignó un nombre [51]. Este ensayo usa NEM-

biotina [51] (o maleimida-PEG₂-biotina [215]) como alquilante. El método prosigue de la misma manera que el ProPerDP pero incluye la digestión con tripsina previa a la captura de los productos biotinilados con estreptavidina [51] (o con avidina [215]). Este paso evita los falsos positivos de proteínas que contienen tanto tioles como persulfuros biotinilados. Tras el paso de reducción, el método analiza los residuos provenientes de los persulfuros por espectrometría de masas (Figura 21). Este método permitió identificar ~1000 cisteínas persulfuradas pertenecientes a ~820 proteínas que no habían sido identificadas previamente [215].



Figura 21. Ensayo BTA con maleimida-biotina para detectar persulfuros

qPerS-SID

Unos meses después de la publicación del método ProPerDP, el grupo de Longen publicó un método similar a los dos anteriores al que denominó qPerS-SID ("quantitative PerSulfide Site IDentification") [216]. El método comienza con el tratamiento con ácido tricloroacético (TCA) con el fin de protonar los tiolatos y detener las reacciones redox. Los tioles y persulfuros son bloqueados con iodoacetil-PEG₂-biotina, al igual que ProPerDP, pero, antes de la captura con estreptavidina, son digeridos con tripsina, al igual que en el BTA. A diferencia de los métodos anteriores, donde los tioles provenientes de los persulfuros eran directamente analizados, en el qPerS-SID son derivatizados con IAM antes de ser analizados con el objetivo de mejorar la detección por LC-MS/MS. Por otro lado, los residuos que permanecen unidos a la estreptavidina son liberados con ebullición en acetonitrilo (Figura 22). Para que el método fuera cuantitativo, fue combinado con SILAC, el marcado de aminoácidos en cultivos celulares con isótopos estables. Con este método se demostró que los dadores de H₂S difieren en sus eficacias para persulfurar proteínas en células [216].



Figura 22. Método qPerS-SID para detectar persulfuros

Cambio de etiqueta

El ensayo de cambio de etiqueta ("tag-switch") fue desarrollado por los grupos de Xian y Filipovic [2,62]. En el primer paso, las proteínas son sometidas a tratamiento con metilsulfonilbenzotiazol (MSBT) [217] de manera de que queden bloqueados los persulfuros y los tioles formando disulfuros y tioéteres, respectivamente. En el segundo paso, las muestras se hacen reaccionar con un cianoacetato (nucleófilo suave) conjugado a una molécula reportera que atacará a los disulfuros generados a partir de los persulfuros (Figura 23). Dada la alta reactividad de los disulfuros que contienen benzotiazol con ciertos nucleófilos centrados en carbono, se espera que este método sea selectivo para los disulfuros mixtos derivados de los persulfuros, aunque ciertos disulfuros nativos especialmente reactivos u otros electrófilos también podrían reaccionar con el cianoacetato y dar falsos positivos. El método original fue publicado en 2014 y utilizaba biotina como molécula reportera [62]. En 2016, se publicó una versión mejorada con derivados fluorescentes de cianoacetato (CN-BOT y CN-Cy3) como molécula reportera, permitiendo la detección de persulfuros por la fluorescencia en geles y por microscopía [2]. Se ha propuesto que este método no sería útil para hacer ensayos *in vivo* debido a la falta de permeabilidad del MSBT por las membranas lipídicas [4]. El ensayo de cambio de etiqueta ha servido para asignar un rol de depersulfurasa a la Trx [2].



Figura 23. Ensayo de cambio de etiqueta para detectar persulfuros

Cambio de dimedona

En busca de una versión mejorada de la estrategia de cambio de etiqueta, el grupo de Filipovic propuso el método de cambio de dimedona ("dimedone switch") en 2019 [60]. En un primer paso, los persulfuros, tioles y derivados sulfénicos reaccionan con 4-cloro-7-nitrobenzofurazán (NBF-CI). En segundo lugar, se adiciona una sonda de dimedona para que reaccione selectivamente con los derivados de los persulfuros (Figura 24). Luego, los persulfuros pueden ser detectados con anticuerpos anti-dimedona o espectrometría de masas. Dependiendo de cuál sea la molécula reportera de la sonda dimedona, estrategias adicionales pueden ser empleadas, como SDS-PAGE o microscopía de fluorescencia en caso de contar con una sonda fluorescente. Este método presenta la ventaja de poder ser utilizado *in vivo*. El uso de este método permitió detectar persulfuros proteicos de diversos organismos y llevó a obtener resultados que apoyan la hipótesis de la persulfuración como un mecanismo de protección celular ante la sobreoxidación de tioles [60].



Figura 24. Método de cambio de dimedona para detectar persulfuros

QTRP a pH bajo

En 2020, el grupo de Yang adaptó el método QTRP ("Quantitative Thiol Reactivity Profiling"), originalmente desarrollado para análisis proteómicos de tioles, para que fuera selectivo para detectar persulfuros [118]. Esta estrategia asume que los persulfuros proteicos tienen p*K*_as más bajos que los tioles. A diferencia del método original, que se realiza a pH fisiológico, las muestras se incuban a pH 5 para permitir la alquilación de persulfuros y minimizar la de los tioles. De esta forma, sólo reaccionarían los grupos muy ácidos que permanezcan deprotonados. La alquilación se realiza con 2-iodo-*N*-(prop-2-in-1-il) acetamida (IPM) y luego, las proteínas son digeridas con tripsina. Los péptidos marcados se hacen reaccionar con conjugados de azida-biotina clivables por UV, livianos y pesados, mediante una química de clic por cicloadición asistida por cobre. Finalmente, los péptidos biotinilados son capturados con estreptavidina y liberados mediante luz UV para ser analizados por LC-MS/MS (Figura 25).



Figura 25. Método QTRP a pH bajo para detectar persulfuros

Un punto débil de esta técnica es suponer que los persulfuros poseen valores de pK_a más bajos que los tioles, ya que no hay estudios robustos de la acidez de persulfuros proteicos. Por otro lado, la ventaja de este método es que los péptidos liberados conservan el azufre extra proveniente del persulfuro original, lo que permite la confirmación de la cisteína modificada. El método QTRP a pH bajo demostró que el pH puede afectar la reactividad de los persulfuros proteicos, tanto aumentándola como disminuyéndola, dependiendo de la proteína. A su vez, con este método se identificaron 1547 residuos de cisteína persulfurados correspondientes a 994 proteínas [118].

1.6. Modelos de persulfuros utilizados en este trabajo

La presente tesis se centró en la investigación de las propiedades de ciertos persulfuros biológicos. Los mismos fueron seleccionados en función de su relevancia fisiológica, tanto en su forma persulfuro como tiol, considerando además la viabilidad de llevar a cabo experimentos para su estudio. Los persulfuros elegidos como modelos de estudio abarcan persulfuros formados en compuestos de bajo peso molecular y en proteínas, y se describen a continuación.

1.6.1. Persulfuros de bajo peso molecular

Los persulfuros formados en tioles de bajo peso molecular presentan bajas restricciones estéricas e interacciones intramoleculares con grupos cargados o polares, en contraposición a los persulfuros formados en proteínas. Esto minimiza la influencia de grupos químicos cercanos y, por lo tanto, los convierte en buenos modelos para estudiar las propiedades fundamentales generales de los persulfuros, que puedan luego servir de punto de comparación con persulfuros proteicos.

Dada la inestabilidad en solución acuosa de los persulfuros de bajo peso molecular, debido a que tienen reactividad nucleofílica y electrofílica, tanto la preparación de persulfuros en el laboratorio como su detección presentan desafíos. Como se explicó previamente, para prepararlos se debe recurrir a reacciones formadoras de persulfuros, enzimas que los produzcan o compuestos dadores de persulfuros (ver 1.3). Para detectarlos, se suele recurrir a métodos que implican la derivatización con agentes alquilantes (como se explicó en 1.5.6).

El GSSH y el CysSSH posiblemente sean los persulfuros de bajo peso molecular de mayor abundancia fisiológica. Se encuentran en varios tipos celulares [218] y se ha sugerido que sus niveles pueden verse alterados en ciertas patologías, como en la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [219].

El GSSH es uno de los objetos de estudio centrales de esta tesis. Aunque en menor profundidad, también se estudiaron el CysSSH, el HcySSH y los persulfuros de cisteamina (CystSSH), β -mercaptoetanol (β -MeSSH) y cisteína metiléster (CysOMeSSH), que fueron elegidos por la disponibilidad de los disulfuros correspondientes para formarlos y por las variaciones en la acidez de los tioles correspondientes.

GSSH

El GSSH es el persulfuro que deriva del GSH, uno de los tioles celulares más abundantes y de mayor relevancia. Los niveles reportados de GSSH endógeno son relativamente altos, de \sim 7 μ M en tejido de hígado de ratón [3]. Uno de los roles más prominentes del GSSH es su participación como intermediario en la vía de oxidación mitocondrial del H_2S (ver Figura 3). Si bien hay dos mecanismos propuestos para la formación de GSSH en dicha ruta, ambos involucran la síntesis enzimática de GSSH a expensas de GSH y un dador de azufre. Uno de los mecanismos propone que es formado por la SQR utilizando H₂S como dador de azufre (ver Figura 3A) [43,44], mientras que la otra postula que es sintetizado por la rodanesa usando tiosulfato como dador de azufre (ver Figura 3B) [42,45]. En el primer caso, el GSSH formado podría ser consumido, en parte, por la rodanesa [43,44]. Ambos mecanismos coinciden en que el GSSH es consumido por la enzima persulfuro dioxigenasa para formar GSH y sulfito mediante la interacción del GSSH con el hierro ferroso de la enzima. Hasta ahora, el GSSH es el único sustrato propuesto para la persulfuro dioxigenasa [46,47]. En humanos, las mutaciones en esta enzima producen encefalopatía etilmalónica, una patología asociada a alteraciones severas en la salud [54,220].

Adicionalmente, el GSSH puede reaccionar con el hierro presente en otras proteínas (ver 1.4.6).

Como se comentó previamente, el GSSH puede ser producido enzimáticamente por la enzima GR a partir de GSSSG y NADPH (Figura 5B), aunque no es probable que ocurra en un contexto fisiológico [34,48,82]. Por otro lado, hay indicios de que el GSSH es mejor nucleófilo que el GSH (ver 1.4.2) [48,53].

En el laboratorio, el GSSH es frecuentemente preparado a partir de GSSG y H_2S (Ec. 38) [52–54]. La velocidad de esta reacción es lenta, con una constante cinética de 0.16 M^{-1} s⁻¹ (pH 7.4, 25 °C), por lo que no es probable que ocurra *in vivo* [51]. En 2019 se reportó que al mezclar GSSG (en exceso estequiométrico) con H_2S , se establecen principalmente dos equilibrios que involucran cinco especies: GSSG, H_2S , GSSH, GSH y GSSSG (Ec. 38, Ec. 39) [58,119]. Estas reacciones estaban siendo estudiadas en el contexto de esta tesis. Cuando se publicaron los resultados referidos, los experimentos para caracterizar la reacción entre GSSG y H_2S en el marco de esta tesis estaban en la fase final. Si bien los resultados publicados se solapaban parcialmente con esta tesis, nuestra caracterización fue más exhaustiva, proporcionando constantes cinéticas para todas las reacciones involucradas. De esta manera, la formulación de los dos equilibrios sirvió para validar nuestros resultados y dieron pie a la realización de ciertos controles adicionales que no habíamos contemplado.

Ec. 38 GSSG + HS⁻ \rightleftharpoons GSSH + GS⁻ Ec. 39 GSSG + GSS⁻ \rightleftharpoons GSSSG + GS⁻

1.6.2. Persulfuros proteicos

La modificación de una cisteína proteica a la forma persulfuro constituye una modificación postraduccional y, como se fue describiendo a lo largo del texto, ocurre en varias proteínas involucradas en diversos procesos fisiológicos. También constituyen intermediarios en ciclos catalíticos de enzimas fundamentales del metabolismo. Los niveles de persulfuros proteicos endógenos se encuentran en el orden micromolar, por ejemplo,

72
~37 µM en tejido hepático de ratón [3]. Dada la relevancia y participación de los persulfuros en los distintos procesos, varios estudios se han enfocado principalmente en identificar las proteínas persulfuradas y determinar las vías metabólicas en las que participan mediante estudios proteómicos. No obstante, la caracterización de sus propiedades bioquímicas es escasa. Así como el entorno proteico puede afectar las propiedades de los tioles y otros grupos funcionales presentes en los residuos aminoacídicos, es de esperar que las propiedades de los persulfuros proteícos dependan de cada proteína y difieran de las de los persulfuros de bajo peso molecular.

En esta tesis se trabajó con enzimas que forman persulfuros proteicos intermediarios en sus mecanismos catalíticos. Algunos de estos persulfuros presentan la ventaja adicional de ser estables en solución acuosa, ya que se forman en cisteínas ubicadas en cavidades, permaneciendo protegidos del decaimiento espontáneo.

SQR

La enzima SQR (EC 1.8.5.8) pertenece a la superfamilia de las flavina disulfuro reductasas. Estas enzimas contienen una molécula de flavina como cofactor, como el flavín mononucleótido o FAD. Se caracterizan por transferir electrones entre el sustrato y la flavina mediante un aducto covalente transitorio dado por una cisteína unida en la posición C4a de la flavina [65,221]. La familia de estas enzimas está distribuida en los tres dominios de la biología [222], incluidos varios filos de arqueas y bacterias, y en la mayoría de los filos de eucariotas. Llamativamente, no están presentes en el reino vegetal, equinodermos y varios protistas. Las SQRs son proteínas ancladas a las membranas que catalizan el primer paso de la oxidación de H₂S (ver Figura 3). Las enzimas procariotas aprovechan el poder reductor del H₂S ambiental para producir energía. En las mitocondrias de los mamíferos son las encargadas de mantener el nivel de H₂S por debajo del umbral tóxico. Tanto la sobreexpresión como la supresión de la SQR alteran la susceptibilidad a la intoxicación respiratoria por H₂S [65]. Las deficiencias de SQR producen anomalías similares a las causadas por la enfermedad de Leigh [223]. Por otra parte, se está explorando la posibilidad de apuntar a la SQR como un potencial blanco terapéutico [224,225].

73

Las SQR de distintos organismos contienen dos cisteínas en el sitio activo que se encuentran separadas en la secuencia lineal de aminoácidos pero cercanas espacialmente [49,226–229]. Aunque las primeras estructuras de SQR reportadas, correspondientes a enzimas bacterianas, se obtuvieron hace más de una década [226–228], la estructura de la SQR humana fue reportada recién en el 2019 (Figura 26) [49,229]. A diferencia de las bacterianas, cuyos sitios activos están ubicados en cavidades y contienen disulfuros, el sitio activo de la SQR humana se encuentra parcialmente expuesto al solvente con las cisteínas formando un trisulfuro [49,229]. Si bien hay hipótesis propuestas de cómo se podría generar el trisulfuro *in vivo*, este aspecto continúa en investigación [65].



Figura 26. Estructura cristalográfica de la SQR humana. Se resalta el cofactor FAD y el trisulfuro formado por Cys₂₀₁ y Cys₃₇₉ (PDB 6OI5). *Figura realizada con el programa Mol** [230].

La SQR humana cataliza la transferencia del azufre del H₂S a un aceptor de bajo peso molecular con el concomitante traspaso de electrones a la CoQ₁₀. Por lo tanto, este mecanismo implica tres sustratos: H₂S como dador de azufre y electrones, un aceptor de azufre y CoQ₁₀ (Figura 27) [65]. El mecanismo propuesto [49] comienza con el ataque del H₂S al trisulfuro del sitio activo para formar dos persulfuros, en Cys₃₇₉ y en Cys₂₀₁. El persulfuro en Cys₃₇₉ queda expuesto al solvente, mientras que se presume que el persulfuro en Cys₂₀₁ forma un complejo de transferencia de carga (CT) transitorio con el cofactor FAD (Figura 27*a*). En el segundo paso, el aceptor

tiofílico ataca al persulfuro en Cys₃₇₉ para abstraer el azufre sulfano, formando el tiol de la cisteína y liberando un producto azufrado de bajo peso molecular. Simultáneamente, se presume que el complejo CT evoluciona hacia un aducto covalente C4a (Figura 27*b*). El tiolato en Cys₃₇₉ ataca al aducto para regenerar el trisulfuro y producir FAD reducido, FADH₂ (Figura 27*c*). El FADH₂ reduce a CoQ₁₀ completando el ciclo catalítico (Figura 27*d*). El CoQ₁₀ reducido luego entra en la cadena de transporte de electrones al nivel del complejo III, convirtiendo al H₂S en el primer sustrato reductor inorgánico identificado capaz de producir energía metabólica en humanos [39]. Los parámetros cinéticos de estas reacciones se muestran en la Tabla 1.



Figura 27. Mecanismo catalítico propuesto para la SQR humana. En el primer paso, el trisulfuro de cisteína del sitio activo es atacado nucleofílicamente por el H₂S para formar dos persulfuros en Cys₃₇₉ y en Cys₂₀₁. Este último queda formando un complejo de transferencia de carga (CT) transitorio con el cofactor FAD (*a*). Luego, un aceptor tiofílico (A⁻) ataca al Cys₃₇₉SSH para abstraer el azufre sulfano y generar el producto (ASH) y Cys₃₇₉SH. Se presume que el complejo CT evoluciona mientras tanto hacia un aducto C4a (*b*). El Cys₃₇₉SH ataca al azufre involucrado en el aducto, regenerando el trisulfuro y produciendo FADH₂ (*c*). Finalmente, FADH₂ reduce a la CoQ para formar CoQH₂ y restaurar la enzima completando el ciclo catalítico (*d*).

En cuanto al aceptor de azufre, el grupo de Banerjee ha propuesto al GSH como el sustrato fisiológico preferido [43,44], mientras que el grupo de Jorns ha propuesto al sulfito [42,45]. La hipótesis de Jorns se basa principalmente en que la constante de especificidad (k_{cat}/K_m) para el sulfito es ~200 veces mayor que para el GSH (Tabla 1). La contraparte argumenta que, a pesar de la mayor constante cinética para sulfito que para GSH, la velocidad neta de reacción con el sulfito es menor, ya que ésta también depende de concentración intracelular la del sustrato $(v = k_{cat}/K_m[aceptor][SQR])$, y en el caso del sulfito la concentración sería baja (0.2-4.87 μ M), incluso menor que el K_m^{sulfito} (Tabla 1) [65]. Por el contrario, la concentración intracelular de GSH es muy abundante (1-10 mM [232,233]), similar al K_m^{GSH} (Tabla 1). No obstante, la baja concentración de sulfito que Banerjee menciona [65] no es intracelular, sino que corresponde a niveles extracelulares [234,235]. De hecho, el grupo de Jorns detectó mayores niveles de sulfito en medios intracelulares de rata (9.2 μ M en hígado y 38 μ M en corazón) [236], aunque según Banerjee estos resultados son cuestionables [65]. De todas maneras, las simulaciones cinéticas computacionales realizadas por el grupo de Banerjee respaldaron al GSH como el aceptor, incluso utilizando la concentración de sulfito reportada por Jorns; con GSH 7 mM y sulfito 9.2 μ M se obtuvieron constantes observadas (k_{obs}) de 112 s⁻¹ para GSH y 23 s⁻¹ para sulfito [43,44]. Esto no quita que en ciertas patologías que llevan a elevadas concentraciones de sulfito, se podría favorecer su uso como aceptor de la SQR [65]. En resumen, la literatura actual está inclinada hacia el GSH como aceptor, pero los datos disponibles a la fecha no son del todo esclarecedores. Es importante destacar que la identidad del aceptor tiene implicancias en la secuencia de pasos de la vía de oxidación del H₂S, ya que el sustrato de la rodanesa (GSSH o tiosulfato) depende, en parte, de qué producto se genera en la reacción que cataliza la SQR (ver Figura 3).

Sustrato variable	Productos	<i>K</i> m (μΜ)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m (M⁻¹ s⁻¹)	Ref.				
Sustratos fijos y saturantes: sulfito y CoQ1									
H_2S	Tiosulfato, CoQ1H2	13	379	2.9 × 10 ⁷ ^a	[42]				
Sustratos fijos y saturantes: H ₂ S* y CoQ ₁									
Sulfito	Tiosulfato, CoQ_1H_2	260 174	650 368	$2.5 imes 10^{6 b}$ $2.1 imes 10^{6 a}$	[44] [42,44]				
Cianuro	Tiocianato, CoQ ₁ H ₂	650	330	$5.1 \times 10^{5 c}$	[42]				
Metanotiol	Metanopersulfuro, CoQ_1H_2	260	100	$3.9 \times 10^{5 b}$	[231]				
H_2S	H ₂ S ₂ , CoQ ₁ H ₂	230 315	84 65	$3.7 \times 10^{5 b}$ $2.1 \times 10^{5 d}$	[44] [42,44]				
CoA	CoA persulfuro, CoQ1H2	2300	69	$3.0 \times 10^{4 b}$	[49]				
GSH	GSSH, CoQ ₁ H ₂	8000 8000	128 89	$1.6 \times 10^{4 b}$ $1.1 \times 10^{4 b}$	[44] [44]				
Sustratos fijos y saturantes: H₂S y sulfito									
$C_0 O_1$	Tiosulfato CoO1Ha	10	364	$1.0 \times 10^{7}a$	[42]				

Tabla 1. Parámetros cinéticos de la SQR

CoQ ₁ Tiosulfato, CoQ ₁ H ₂	19	364	1.9 × 10 ⁷ a	[42]
--	----	-----	-------------------------	------

* Concentración de H₂S saturante para la reacción *a* de la Figura 27

^a SQR en solución, pH 7.4 o 7.5, 25 °C

^b SQR embebida en nanodiscos, pH 7.4, 25 °C

^c SQR en solución, pH 8.5, 25 °C

^d SQR en solución, pH 7.0, 25 °C

La SQR es muy promiscua, pudiendo reaccionar con varios sustratos adicionales, tanto a nivel de la semirreacción con el trisulfuro como a nivel del aceptor de azufre. El trisulfuro de la SQR puede ser atacado nucleofílicamente por sulfito (940 M⁻¹ s⁻¹), GSH (0.38 M⁻¹ s⁻¹), metanotiol (6.3 × 10^4 M⁻¹ s⁻¹) o coenzima A (CoA). Estas reacciones resultan en complejos inactivos con disulfuros mixtos de Cys₃₇₉SH y el nucleófilo (Figura 28A) [9,49,231].



Figura 28. Promiscuidad de la SQR a nivel de la reacción con el trisulfuro. A) El sulfito, GSH, metanotiol y CoA (representados por XS⁻) son capaces de reaccionar con el trisulfuro de la SQR, en lugar del H₂S, dando complejos inactivos. B) El cianuro puede atacar al trisulfuro formando un tiocianato orgánico que puede seguir reaccionando para restaurar el trisulfuro.

El trisulfuro también puede ser atacado por cianuro. En este caso, no se forma un complejo inactivo, sino que, en presencia de H_2S , se termina regenerando el trisulfuro de la enzima. El mecanismo propuesto implica la formación de un tiocianato orgánico que cicla tras el ataque de Cys₂₀₁SSH y reacciona con una segunda molécula de cianuro y otra de H_2S para restaurar el trisulfuro (Figura 28B) [66]. Si bien estas reacciones no son relevantes fisiológicamente, es importante conocerlas porque pueden afectar experimentos *in vitro*.

En relación con el aceptor de azufre, además del GSH y el sulfito, el Cys₃₇₉SSH puede ser atacado por cianuro, H_2S , metanotiol y CoA con distintos parámetros cinéticos (Tabla 1). Teniendo en cuenta la concentración de estas especies, no se espera que estos sustratos tengan relevancia biológica [231].

Rodanesa

La enzima rodanesa (EC 2.8.1.1), formalmente denominada tiosulfato azufretransferasa (TST) o tiosulfato:cianuro azufretransferasa, pertenece a la superfamilia de azufretransferasas. Como su nombre indica, es capaz de catalizar la transferencia de azufre desde el tiosulfato al cianuro, produciendo sulfito y tiocianato como productos. El nombre rodanesa proviene de la palabra "rhodanid", que significa tiocianato en alemán, y se le agregó la terminación "esa" para indicar que el tiocianato se formaba enzimáticamente. Fue sugerido en 1933 cuando se descubrió, previo a que se establecieran las reglas de nomenclatura de las enzimas [237]. El término rodanesa también refiere a un dominio de plegamiento presente en varias proteínas, que puede estar fusionado a otros dominios; por ejemplo, se encuentra en azufretransferasas, fosfatasas y arseniato reductasas [238,239].

La enzima rodanesa se encuentra presente en todos los organismos, desde bacterias hasta humanos. En mamíferos está localizada a nivel mitocondrial y las concentraciones más altas están en el hígado. En humanos particularmente, los riñones presentan la mayor actividad rodanesa, seguidos por el hígado, cerebro, pulmones, músculo y estómago. En las plantas, la enzima se encuentra en el citoplasma, mitocondria y cloroplastos [240,241].

Inicialmente, se sugirió que el rol principal de la rodanesa era la detoxificación del cianuro, ya que el tiocianato es mucho menos tóxico que el cianuro. De hecho, se ha observado que los niveles de expresión de la enzima en los distintos tejidos están correlacionados con los niveles de

78

exposición al cianuro. Sin embargo, en los últimos tiempos, se le han asignado roles fisiológicos adicionales, tanto actuando de manera independiente o en colaboración con otras proteínas. Entre estas funciones se incluye su participación en la restauración de centros ferrosulfurados y en la vía de oxidación mitocondrial del H_2S [41,241].

La rodanesa mejor caracterizada es la de hígado bovino. Posee dos dominios rodanesa conectados por un bucle. El sitio activo está ubicado en una hendidura y está formado por aminoácidos de ambos dominios, incluyendo una cisteína catalítica (Cys₂₄₈). La cisteína se encuentra dentro de un bucle conservado (CRKGVT) en el dominio C-terminal y puede estar como tiol o persulfuro. Ambas estructuras han sido cristalizadas, siendo mínimas las diferencias estructurales (Figura 29) [239,242–249]. El espectro de absorbancia y la intensidad de fluorescencia intrínseca de la enzima varían según el estado de la cisteína (tiol o persulfuro) [250-252]. Por otro lado, la rodanesa en el estado persulfuro presenta mayor estabilidad termodinámica que en el tiol [241,246]. Si bien en 2022 se resolvió la estructura cristalográfica de la rodanesa humana, aún no se publicó el artículo correspondiente. De todas formas, es probable que su estructura sea similar a la bovina, basado en que tienen un 90 % de identidad de secuencia [253] y en la estructura predicha con Alphafold (Q16762) [254,255].



Figura 29. Estructura tridimensional de la rodanesa bovina. La rodanesa bovina con la cisteína catalítica (Cys₂₄₈) en la forma persulfuro (PDB 1RHD). *Figura realizada con el programa Mol** [230].

Las azufretransferasas catalizan la transferencia de azufre de una molécula dadora a una molécula aceptora en un mecanismo ping-pong. En los ciclos catalíticos de las azufretransferasas, como la rodanesa y la MST, se forman persulfuros intermediarios a nivel de las enzimas (mecanismo mínimo en Figura 4). Entre las reacciones catalizadas por la rodanesa, la más estudiada es la que utiliza tiosulfato como dador y cianuro como aceptor. La reacción de las enzimas bovina y humana con estos sustratos (Figura 30) implica un paso y una especie adicionales respecto al mecanismo mínimo. Específicamente, la reacción entre el tiolato y el tiosulfato para formar el persulfuro ocurre en dos pasos mediante la formación de un complejo no covalente enzima-sustrato o complejo michaeliano (Figura 30*a*,*b*) [116,256]. A la enzima bovina tiol se le asociaron p K_a s de 7.8 y 9.9, aunque no se determinó a qué residuos correspondían, y al grupo tiol del complejo michaeliano con tiosulfato se le asignó un p K_a de 6.5, que varió levemente a 6.75 y 7.05 en los complejos con bencenosulfonato y butanosulfonato, respectivamente [116,117]. La reacción del persulfuro intermediario con el cianuro prosigue de la misma manera que en el mecanismo mínimo, en un solo paso (Figura 30c) [116,256]. A la enzima bovina persulfuro se le asociaron p K_a s de 5.9 y 9.4, no quedando claro a qué residuos correspondían [116,117]. Se observó una inhibición por tiosulfato a bajas concentraciones de cianuro en ambas variantes de rodanesa [116,256]. La enzima bovina además, resultó susceptible a la inhibición por tiocianato [257]. Contrariamente, a altas concentraciones de cianuro, la enzima humana puede ser activada [256]. Los parámetros cinéticos de estas reacciones se muestran en la Tabla 2. La elucidación del mecanismo, los parámetros cinéticos y valores de pK_a mencionados provienen de experimentos realizados en la década del setenta [116,117,256]. Lamentablemente, estos datos parecen haber quedado perdidos en el tiempo. De hecho, los parámetros cinéticos que se citan actualmente son muy distintos, particularmente en lo que respecta al cianuro, $k_{cat} = 910 \text{ s}^{-1}$, $K_{\rm m}^{\rm tiosulfato}$ = 39.5 mM, $K_{\rm m}^{\rm cianuro}$ = 29 mM para la rodanesa humana [170]. Estos valores surgen de experimentos donde no se tuvo en cuenta la inhibición por tiosulfato, que compite con el cianuro, y donde posiblemente el pH no estuviera bien controlado. La propagación de datos erróneos en la literatura puede causar inconvenientes. En efecto, afectó al diseño de

80

experimentos realizados en el contexto de esta tesis, que inicialmente no tenían en cuenta la inhibición por exceso de tiosulfato.



Figura 30. Mecanismo de la reacción del tiosulfato y el cianuro catalizada por la rodanesa. El tiolato de la cisteína del sitio activo (numeración enzima humana) ataca al azufre sulfano del tiosulfato generando un complejo michaeliano (*a*). El complejo evoluciona para generar un persulfuro en la cisteína del sitio activo y liberar sulfito (*b*). Para completar el ciclo catalítico, el cianuro ataca al persulfuro y se libera tiocianato (*c*).

Dador (DS)	Aceptor (A ⁻)	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m ^{DS} (mM)	<i>К_m^{A-}</i> (mM)	k _{cat} /K _m ^{DS} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k _{cat} /Km ^{A-} (M ⁻¹ s ⁻¹)	Ref.
Tiosulfato	Cianuro	307 167	18 45	0.51 1.8	1.7×10^4 3.7×10^3	$6.0 imes 10^{5 a}$ $9.5 imes 10^{4 b}$	[116] [256]
Tiosulfato	GSH	0.67	0.34	21.0	2.0×10^{3}	$3.2 \times 10^{1 c}$	[43]
Tiosulfato	Cisteína	7.4	0.35	20	2.1×10^{4}	$3.7 \times 10^{2 c}$	[43]
Tiosulfato	Homocisteína	8.7	0.3	21	2.9×10^{4}	$4.1 \times 10^{2 c}$	[43]
GSSH	Sulfito	389	0.45	0.06	8.6×10^{5}	6.5 × 10 ⁶ ^c	[43]

Tabla 2. Parámetros cinéticos de la rodanesa

^a Rodanesa bovina, pH 8.7, 40 °C

^b Rodanesa humana, pH 8.5, 0 °C

^c Rodanesa humana, pH 7.4, 25 °C

La rodanesa puede utilizar otros sustratos además del tiosulfato y cianuro. El GSSH constituye un dador alternativo de azufre, mientras que el sulfito y los tioles son posibles aceptores (Tabla 2) [41,43,45,241]. En el contexto de la vía de oxidación del H₂S, se ha planteado que la rodanesa cataliza la transferencia de azufre desde el GSSH hacia el sulfito (ver Figura 3A), así como desde el tiosulfato al GSH (ver Figura 3B). Los parámetros cinéticos determinados para ambas reacciones aportan elementos para la discusión (Tabla 2) [43]. Sin embargo, las condiciones en que estos valores fueron determinados son controversiales. Para la reacción de GSSH y sulfito se utilizaron mezclas de GSSG y NaHS como fuente de GSSH y la cianólisis fría como método para cuantificar la concentración de GSSH, probablemente resultando en sobreestimaciones de la concentración de GSSH (ver 1.5.2 y 1.6.1). A su vez, las reacciones de tiosulfato y GSH en las que se formaba GSSH presentaban varias limitaciones experimentales. Por ejemplo, las reacciones se siguieron por formación de H₂S utilizando el ensayo de acetato de plomo [258], pero no se hicieron los controles correspondientes para confirmar que el plomo no alterara la actividad. Aún más controversial, asumieron que el GSSH formado reaccionaba con el GSH presente formando cantidades estequiométricas de H₂S y que esta reacción no era la limitante del proceso, es decir, que era más rápida que la formación enzimática de GSSH (ver 1.3.1 y 1.4.4).

MST

La enzima MST (EC 2.8.1.2) pertenece a la superfamilia de las azufretransferasas y, como tal, cataliza la transferencia de azufre de una molécula dadora a una aceptora. Participa en el metabolismo de H₂S contribuyendo a una de las tres vías enzimáticas de formación de H₂S en mamíferos [8]. La MST se expresa en varios tipos de células y tejidos, encontrándose los mayores niveles en el hígado, intestino grueso y riñones [71,76,259,260]. En humanos, la deficiencia congénita de MST genera mercaptolactato-cisteína disulfiduria, una patología que se asocia con retardo mental y otras alteraciones, dejando en evidencia su relevancia [261–263].

Se han descrito dos isoformas humanas que se diferencian por 20 aminoácidos, MST1 que se ubica en el citosol y MST2 que se encuentra en el citosol y en la mitocondria [264]. Los parámetros cinéticos de ambas variantes son iguales [76]. La estructura posee dos dominios rodanesa unidos por un conector (Figura 31). El sitio activo se ubica en una hendidura entre los dos dominios y contiene residuos de ambos dominios. La cisteína catalítica se encuentra en el dominio C-terminal y durante el ciclo catalítico puede encontrarse como tiol o persulfuro [75,260].



Figura 31. Estructura cristalográfica de la MST humana. La MST humana con la cisteína catalítica (Cys₂₄₈) en la forma persulfuro fue cocristalizada con piruvato (PDB 4JGT). *Figura realizada con el programa Mol** [230].

Como se explicó previamente, el mecanismo mínimo es ping-pong e implica la formación del persulfuro intermediario en la cisteína catalítica (Cys₂₄₈, numeración humana) (ver Figura 4). A nivel fisiológico, el proceso más aceptado para la MST involucra al 3-MP como dador de azufre y a un tiol como aceptor del azufre, principalmente Trx y en menor medida cisteína [75,76,87,171,260,265–267]. En el primer paso del ciclo catalítico de la MST humana, la enzima en forma de tiolato (pK_a de 5.2 [87]) ataca al 3-MP para extraer el azufre y formar un complejo michaeliano intermediario en un proceso relativamente rápido (10^6 M⁻¹ s⁻¹ [87]) (Figura 32*a*). La evolución del complejo lleva a liberar piruvato y la enzima persulfurada. En presencia de buenos sustratos aceptores, la liberación de piruvato sería el paso limitante del ciclo catalítico (Figura 32b). El intermediario persulfuro es estable y ha sido cocristalizado con piruvato (Figura 31) [75]. Una vez liberado el piruvato, el persulfuro reacciona con el tiol aceptor en una reacción de transpersulfuración, regenerando la enzima reducida y produciendo un nuevo persulfuro, como TrxSSH o CysSSH (Figura 32c,f). El nuevo persulfuro puede reaccionar con un tiol produciendo el disulfuro correspondiente y H₂S en una reacción no catalizada enzimáticamente (Figura 32d,q). El mecanismo para la generación de H₂S con cisteína como aceptor de azufre es controversial, pues es de esperar que la reacción de

CysSSH con cisteína (u otro tiol de bajo peso molecular) (Figura 32,*g*) sea lenta (ver 1.4.4). El uso de la Trx como aceptor fisiológico sería más favorable, ya que el paso no enzimático es de primer orden (Figura 32*d*). La Trx oxidada puede ser reducida de nuevo al ditiol por la Trx reductasa a expensas de NADPH (Figura 32*e*). Este mecanismo es consistente con el rol de depersulfurasa propuesto para la Trx [2–4].



Figura 32. Mecanismo catalítico propuesto para la MST humana. En el primer paso, el tiolato de la cisteína del sitio activo (numeración enzima humana) abstrae el azufre del 3-MP y forma un complejo michaeliano (*a*). El complejo evoluciona liberando un persulfuro en la enzima y piruvato (*b*). El persulfuro puede ser atacado por uno de los tioles de la Trx para formar TrxSSH (*c*). El ataque de otro tiol de la Trx al persulfuro libera H₂S y genera un disulfuro intramolecular (*d*) que puede ser reducido de nuevo por la Trx reductasa (TrxR) en presencia de NADPH (*e*). Alternativamente, el persulfuro de la MST puede ser atacado por un tiol liberando H₂S y formando el disulfuro correspondiente (*g*).

La MST presenta cierta promiscuidad, pues puede utilizar moléculas adicionales como sustratos. Por ejemplo, el tiosulfato puede actuar como dador de azufre, aunque la especificidad de la MST por tiosulfato es baja [267,268]. El cianuro constituye un aceptor de azufre alternativo. Si bien esta reacción no es relevante fisiológicamente, es útil para medir actividad enzimática *in vitro*. Sin embargo, en ciertos contextos podría tener

relevancia biológica, como en la detoxificación del cianuro en glóbulos rojos, ya que no poseen rodanesa, y en el citosol de células que solo contienen rodanesa mitocondrial [260]. Adicionalmente, se ha planteado que la Mocs3, una azufretransferasa encargada de generar cofactores de molibdeno, también podría ser un aceptor fisiológico. En este caso, el persulfuro formado en la MST no terminaría liberando H₂S, sino que, mediante una reacción de transpersulfuración, sería transferido a otras proteínas [260]. En este sentido, recientemente se sugirió que la MST de levaduras (Tum1) podría generar persulfuros en varias proteínas por este mecanismo, lo que llevó a asignarle un rol proteína persulfurasa [173]. No obstante, es una hipótesis reciente que debe ser explorada más en profundidad.

A raíz de la detección de H_2S_2 en el cerebro, se planteó un mecanismo alternativo que pudiera explicar la síntesis de H_2S_2 , H_2S y persulfuros por MST. Este mecanismo propone que el persulfuro intermediario de la MST podría desulfurar una segunda molécula de 3-MP formando un hidrotrisulfuro en la cisteína catalítica. El trisulfuro sería transferido a la Trx y terminaría dando H_2S_2 y Trx disulfuro. El H_2S_2 podría generar H_2S por descomposición o por la reacción con tioles, que además formaría un persulfuro (Figura 33A) [269–271]. Si bien este mecanismo fue planteado hace relativamente pocos años, es frecuentemente ignorado en la literatura.

Otra posibilidad que ha pasado desapercibida en la literatura es que el 3-MP actúe como dador y aceptor de azufre, pues se ha observado que la MST en presencia solo de 3-MP, forma piruvato [272]. Esta reacción llevaría a la formación de 3-MP persulfuro. El mecanismo propuesto implica la formación de dos complejos intermediarios, uno binario, formado por MST y 3-MP, y otro terciario, formado por MST y dos moléculas de 3-MP (Figura 33B) [272]. Este mecanismo no es compatible con experimentos realizados en presencia de otros aceptores, ya que no propone la formación de MST persulfuro y no tiene un mecanismo ping-pong. Sin embargo, la noción que el 3-MP pudiera actuar como aceptor y formar 3-MP persulfuro es muy atractiva como mecanismo alternativo para explicar la persulfuración de proteínas por MST [173].

Adicionalmente, se ha reportado al piruvato como un inhibidor de la MST, siendo capaz de reaccionar con la enzima libre [273,274], y al mercaptoetanol como sustrato aceptor alternativo [272].



Figura 33. Mecanismos catalíticos alternativos propuestos para la MST humana. A) Mecanismo con formación de H_2S_2 . El ataque del tiolato de la cisteína del sitio activo al 3-MP genera piruvato y la enzima persulfurada (*a*). El persulfuro abstrae el azufre de una segunda molécula de 3-MP produciendo un hidrotrisulfuro proteico (*b*). El hidrotrisulfuro es transferido a uno de los tioles de la Trx (*c*). El ataque de otro tiol de la Trx al trisulfuro libera H_2S_2 produciendo la Trx oxidada (*d*) que puede ser reducida de nuevo por el sistema Trx/TrxR (*e*). El H_2S_2 puede reaccionar con tioles para dar H_2S y el persulfuro correspondiente (*f*). **B)** Mecanismo con 3-MP como dador y aceptor de azufre. La cisteína catalítica ataca al 3-MP generando un complejo michaeliano (*a*). El complejo reacciona con otra molécula de 3-MP formando un complejo ternario (*b*). Se liberan piruvato y 3-MP persulfuro regenerando la enzima (*c*).

En resumen, es evidente que el mecanismo de la MST aún no se comprende completamente, así como tampoco se comprenden sus roles fisiológicos.

1.7. Aplicaciones de la química de los persulfuros para el desarrollo de biosensores

La química de los persulfuros y específicamente de las enzimas que forman persulfuros intermediarios puede ser utilizada para el desarrollo de

biosensores basados en la proteína fluorescente verde sensible al estado redox (roGFP2). La roGFP2 contiene un cromóforo inaccesible al solvente que no es alterado por cambios de pH en el rango fisiológico y es capaz de emitir fluorescencia en la región visible del espectro (511 nm) [275]. La roGFP2 posee dos cisteínas que pueden estar reducidas como tiol u oxidadas formando un disulfuro. Los espectros de absorbancia y de excitación de fluorescencia de esta proteína varían según su estado redox [276], convirtiendo a la roGFP2 en una buena sonda para monitorear cambios redox tanto *in vitro* como en contextos celulares.

La fusión de roGFP2 (como módulo reportero) con otras proteínas (como módulos sensores) ha permitido el desarrollo de sensores específicos. Por ejemplo, se han usado tiol peroxidasas para detectar H₂O₂ [277,278], glutarredoxina para detectar cambios en la oxidación de GSH [279], micorredoxina-1 para micotiol [280] y triparredoxina para tripanotión [281]. Recientemente se observó que, en presencia de 3-MP, la roGFP2 puede ser oxidada por las MSTs de la planta *Arabidopsis thaliana* [282] o la MST de levaduras, Tum1 [173]. Se hipotetiza que la oxidación de la roGFP2 se debe a la transferencia del persulfuro de las MSTs a la roGFP2 y a su posterior oxidación (Figura 34) [173,282]. La oxidación de roGFP2 puede seguirse por cambios en la absorbancia y fluorescencia y, por lo tanto, una fusión de MST con roGFP2 podría servir como sensor de 3-MP.



Figura 34. Mecanismo propuesto para la oxidación de roGFP2 por azufretranferasas. La cisteína catalítica de la azufretransferasa (P) abstrae el azufre de su sustrato específico (Sus-S) para formar un persulfuro en la enzima (*a*). Uno de los tioles de la roGFP2 ataca al persulfuro de la azufretransferasa para generar un persulfuro en la roGFP2 y regenerar la enzima (*b*). El persulfuro formado en la roGFP2 reacciona con el tiol vecino para producir un disulfuro intramolecular y liberar H₂S (*c*).

Las MSTs de *Arabidopsis thaliana* no resultaron adecuadas para desarrollar biosensores basados en la oxidación de roGFP2, ya que interactúan con el GSH y el sistema Trx preferentemente, disminuyendo de forma dramática la transferencia del azufre hacia la roGFP2 y disminuyendo el rendimiento de la señal [282]. Por otro lado, se vio la misma respuesta en la oxidación de roGFP2 por 3-MP y Tum1 con las proteínas por separado o fusionadas [173], indicando que la proximidad forzada debido a la fusión no estaba generando una ventaja. A su vez, en dicho trabajo se observó que la MST es capaz de promover la persulfuración de una gran cantidad de proteínas, lo que llevó a que los autores propusieran un rol persulfurasa para la MST [173].

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Contribuir a la comprensión de la química biológica de los persulfuros.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Propiedades bioquímicas de los persulfuros de bajo peso molecular

Estudiar la acidez y la reactividad nucleofílica y electrofílica de persulfuros de bajo peso molecular.

2.2.2. Propiedades bioquímicas de los persulfuros proteicos

Estudiar la acidez y reactividad de persulfuros proteicos, particularmente los formados en la SQR y en la rodanesa.

2.2.3. Aplicaciones de la reactividad de los persulfuros

Evaluar la viabilidad de desarrollar biosensores basados en la reactividad de los persulfuros de rodanesa y de MST.

3. Resultados y discusión

3.1. Artículo 1. Los disulfuros forman persulfuros a pH alcalino, lo que puede generar sobreestimaciones en el método de la cianólisis fría

Artículo publicado en *Free. Radic. Biol. Med.* en 2023 <u>Benchoam D.</u>, Cuevasanta E., Semelak J.A., Mastrogiovanni M., Estrin D.A., Möller M.N., Alvarez B.

3.1.1. Antecedentes del artículo

Como se comentó previamente, a pesar de que la investigación relacionada a los persulfuros se ha intensificado en la última década, sus características químicas están escasamente estudiadas. Con el fin de estudiar las propiedades de los persulfuros de bajo peso molecular, el primer paso fue generar preparados de los mismos.

Debido a la relevancia biológica, se comenzó con la preparación del CysSSH con miras a caracterizar su reactividad. Para formar el CysSSH, se eligieron dos métodos que no involucran H₂S ni polisulfuros de hidrógeno. Las estrategias fueron diseñadas de forma de no agregar nucleófilos a las mezclas y no generar grandes cantidades de tiol, pensando en sus posibles interferencias en ensayos posteriores. En primer lugar, el CysSSH se sintetizó a partir de cistina y CBS humana (según la Figura 7A). La elección de utilizar CBS se basó en la experiencia acumulada en el laboratorio a lo largo de los años, así como en la mía, ya que la CBS fue el centro de estudio de mi Tesina de Grado. La CBS humana (carente del dominio regulador C-terminal) se expresó de forma recombinante a partir de una cepa BL21 (DE3) de Escherichia coli transformada con el plásmido pGEX4T1/hCBS Δ C143 que codifica para la CBS fusionada a la glutatión Stransferasa. Se purificó por cromatografía de afinidad con glutatión sefarosa y la etiqueta se removió con trombina. Para formar el CysSSH, se incubó cistina y CBS en amortiguador Tris 50 mM (pH 7.4, 37 °C) y se midió la concentración de azufre sulfano por el método de cianólisis fría (ver 1.5.2).

Se comparó el rendimiento a distintos tiempos, diferentes concentraciones de sustrato y enzima, y en presencia o ausencia de piridoxal-5'-fosfato, el cofactor catalítico de la CBS. Si bien se logró formar el CysSSH exitosamente, se obtuvo un rendimiento muy bajo, de 3-4 % respecto a la cistina inicial. Adicionalmente, el método de preparación presentó inconvenientes asociados a la baja solubilidad de la cistina (~500 µM a 25 °C).

El CysSSH sirvió para explorar la reactividad electrofílica de un persulfuro de bajo peso molecular frente a un tiol de bajo peso molecular. Se ultrafiltró la mezcla de cistina incubada con CBS y la fracción de bajo peso molecular conteniendo CysSSH (32 µM de azufres sulfanos) y la cistina remanente, se puso a reaccionar con un exceso de GSH. Se midió la concentración de H₂S por el método de azul de metileno [196]. A los 130 s, la reacción ya había llegado a completitud con un rendimiento de 100 % respecto a la concentración de persulfuro inicial (en realidad, de azufre sulfano cuantificado por cianólisis). Se hicieron controles para descartar concentraciones significativas de H₂S provenientes de la desproporcionación de CysSSH o de la reacción con otros componentes del ultrafiltrado. Los resultados sugirieron que el GSH ataca al azufre interno del persulfuro (formando el disulfuro mixto CysSSG y H₂S) en lugar de atacar al azufre externo (que formaría GSSH y cisteína), consistente con que el H_2S sea mejor grupo saliente que la cisteína. Adicionalmente, la reacción se intentó seguir por formación de sulfuro de plomo a partir de la reacción del H₂S formado con acetato de plomo, pero no se obtuvieron resultados reproducibles.

Considerando los inconvenientes para producir CysSSH usando CBS, se intentó preparar CysSSH por incubación de cistina en medio alcalino (ver Figura 7C), aprovechando que no depende de la actividad de una enzima. En este caso, además de las limitaciones experimentales relacionadas a la solubilidad de la cistina, los experimentos de cianólisis fría para medir la concentración de azufre sulfano y determinar el éxito de la preparación de CysSSH no fueron concluyentes.

92

Dadas las limitaciones para preparar CysSSH, se decidió trabajar con GSSH. En primer lugar, se confirmó la formación de GSSH a partir de GSSG incubado en medio alcalino y de mezclas de GSSG con H₂S mediante absorbancia a 335 nm, reducción y liberación de H₂S, reacción con DTNB y cianólisis. Luego, se intentó aislar el GSSH para eliminar posibles interferentes. Se exploraron varias técnicas, como extracción en fase sólida (SPE) con una columna Chromabond Drug II, HPLC con una columna Acclaim Mixed-Mode WAX-1, precipitación de H₂S con Zn²⁺, incubación con acetona para precipitar los derivados de glutatión sin precipitar H₂S, entre otras. Los múltiples fracasos dieron la pauta de que no es posible aislar persulfuros de bajo peso molecular en medio acuoso debido a su alta reactividad.

Dada la necesidad de usar mezclas de especies como fuentes de persulfuros de bajo peso molecular, dejamos de lado los intentos por aislarlos e hicimos un esfuerzo para caracterizar las mezclas. De forma análoga a la formación de CysSSH, se decidió preparar GSSH por incubación de GSSG en medio alcalino por la potencial ventaja de no formar cantidades significativas de GSH. Como se describió previamente, es de esperar que la reacción entre GSSG y HO⁻ ocurra por β -eliminación, resultando principalmente en la formación de GSSH y un derivado dehidroalanina de glutatión (DHG) [93–97].

La caracterización de la cinética y de los productos de la reacción entre GSSG y HO⁻ fueron publicados en la revista *Free Radic. Biol. Med.* en 2023 [283]. A continuación, se destacan los principales resultados de la publicación. El artículo y la información suplementaria se presentan en el Anexo I.

3.1.2. Resultados y discusión

Cinética de la formación de GSSH

En primer lugar, se caracterizó la cinética de la reacción entre GSSG y distintas concentraciones de HO⁻ en exceso por absorbancia UV-Visible (UV-Vis). Se registraron espectros en el tiempo y se ajustaron funciones exponenciales a los cursos temporales correspondientes a 335 nm,

indicativa de la presencia de persulfuros [53,190,191]. Las constantes observadas aumentaron linealmente con la concentración de HO⁻, resultando en una constante de segundo orden de (6.3 ± 0.8) × 10^{-3} M⁻¹ s⁻¹ a 25 °C (Figura 1 del Anexo I).

Para confirmar la formación de GSSH, una mezcla alcalina preincubada se expuso a un exceso de H_2O_2 y se registró el decrecimiento en la absorbancia a 335 nm. El GSSH se consumió con una constante de 8.7 ± 0.2 M⁻¹ s⁻¹ (Figura 2 del Anexo I), consistente con la reacción entre GSSH y H_2O_2 , cuya constante fue determinada en el marco de esta tesis y reportada en otro artículo publicado previamente (Anexo II). Si bien el experimento del Anexo I fue previo, la publicación fue posterior, permitiendo la comparación.

Adicionalmente, la reacción de GSSG con HO⁻ se siguió mediante la reacción con DTNB, que es capaz de reaccionar con azufres nucleofílicos (persulfuros, tioles e hidropolisulfuros). Este método permitió estimar una constante de segundo orden de (1.1 ± 0.2) × 10^{-2} M⁻¹ s⁻¹ (Figura 3 del Anexo I).

A su vez, se intentó seguir la formación de GSSH mediante la cuantificación del H_2S liberado al reducir la mezcla. Las medidas de H_2S en fase gaseosa confirmaron la formación de GSSH, pero no brindaron datos cuantitativos confiables (resultados no publicados).

Productos de la reacción de GSSG con HO-

Para determinar los productos generados por la reacción de GSSG y HO⁻, se realizaron experimentos de espectrometría de masas y HPLC a mezclas alcalinas derivatizadas con IAM o mBrB, respectivamente. Además de verificar la formación de GSSH y DHG, se evidenció la presencia de otras especies, específicamente GSH, GSSSG, glutatión hidrotrisulfuro (GSSSH) y tiosulfinato derivado de glutatión disulfuro (GS(O)SG) (Figura 4 del Anexo I). A su vez, se puso a punto un método de HPLC que permitió diferenciar el GSSH del GSH e incluso cuantificarlos. En contraposición a la hipótesis que este método no generaría GSH en forma significativa, se vieron concentraciones de GSH similares a las de GSSH, además de H₂S y, posiblemente, H₂S₂ (Figura 5 del Anexo I). La formación de productos

94

adicionales se atribuyó a reacciones secundarias del GSSH, principalmente con el GSSG remanente y consigo mismo (Esquema 3 del Anexo I).

Artefactos generados por la cianólisis fría

Considerando que el protocolo de la cianólisis fría es comúnmente utilizado para cuantificar persulfuros, se usó como un método adicional para estudiar la cinética de GSSG y HO⁻. Por lo tanto, se incubaron mezclas alcalinas y se tomaron alícuotas en el tiempo para cuantificar la concentración de sulfanos generados, considerando que el método mide azufres sulfanos en general y no persulfuros selectivamente. Los resultados nos alertaron sobre posibles artefactos que pueden ocurrir en el método de cianólisis fría, ya que el protocolo implica una etapa de incubación con cianuro a pH alcalino (detalles del método en 1.5.2) en la cual el GSSG remanente puede formar GSSH y otros sulfanos. Para evitar una sobreestimación de azufre sulfano, fue necesario igualar el tiempo de incubación a pH alcalino de todas las muestras, así como restar la contribución por formación artefactual de GSSH mediante un control de GSSG en agua realizado en las mismas condiciones. Considerando estas precauciones, el estudio cinético por cianólisis fría resultó en una constante de (4 \pm 1) \times 10⁻³ M⁻¹ s⁻¹ para la reacción de GSSG con HO⁻ (Figura 6 del Anexo I), consistente con los valores determinados por absorbancia y reacción con DTNB. Aunque parezca trivial, es importante remarcar que hay que ser especialmente cauto al momento de analizar resultados de cianólisis fría. Se han reportado artículos e incluso protocolos que incitan a cuantificar la concentración de CysSSH o GSSH presente en una mezcla por cianólisis fría, pudiendo inducir a conclusiones incorrectas.

3.1.3. Conclusiones

La reacción entre GSSG y HO⁻ forma GSSH y DHG mediante un mecanismo de β -eliminación con una constante cinética de ~10⁻³ M⁻¹ s⁻¹ a 25 °C. En estas condiciones, el GSSH formado sufre reacciones secundarias para formar especies adicionales que incluyen GSH, GSSSH, GSSSG y H₂S. Considerando que la concentración de GSH alcanzada es similar a la de GSSH y que la reacción no alcanza el equilibrio en ~2 h, no se recomienda preparar soluciones de referencia de GSSH mediante la incubación de GSSG en medio alcalino. Esta reacción tiene implicancias en la cianólisis fría, ya que ésta involucra una etapa de incubación de las muestras a pH alcalino, en la cual las muestras que contengan disulfuros pueden formar sulfanos artefactualmente, induciendo a una sobreestimación. Este sesgo puede ser corregido si tanto los experimentos como la interpretación de resultados se realizan con cautela. Asimismo, los resultados muestran la importancia de controlar el pH durante la práctica habitual de agregar NaOH a una solución de GSSG para favorecer su disolución.

3.1.4. Contribución personal en el artículo

Participación del diseño experimental, realización de experimentos y análisis de los datos obtenidos de los experimentos cinéticos de GSSG y HO⁻ por absorbancia UV-Vis (Figura 1 del Anexo I), por reacción con DTNB (Figura 3 y S4 del Anexo I) y por cianólisis fría (Figura 6 y S3 del Anexo I), así como de las reacciones de H₂O₂ con la mezcla alcalina (Figura 2 el Anexo I) o con GSH (Figura S1 del Anexo I) y de los experimentos de HPLC, incluyendo la puesta a punto del método para cuantificar GSSH (Figura 5 del Anexo I). Análisis de los resultados de espectrometría de masas (Figura 4 y S2 del Anexo I). Discusión de los resultados. Corredactora del artículo.

3.2. Artículo 2. Acidez y reactividad nucleofílica de GSSH

Artículo publicado en J. Biol. Chem. en 2020

<u>Benchoam D.</u>, Semelak J.A., Cuevasanta E., Mastrogiovanni M., Grassano J.S., Ferrer-Sueta G., Zeida A., Trujillo M., Möller M.N., Estrin D.A., Alvarez B.

En esta parte de la tesis se caracterizaron algunas de las propiedades del GSSH como modelo de persulfuro de bajo peso molecular, lo cual constituía uno de los objetivos principales del trabajo. Dado que el GSSH no puede ser aislado en solución acuosa y considerando los inconvenientes para prepararlo a partir de GSSG en medio alcalino (3.1), se utilizaron mezclas de GSSG y H_2S (en defecto estequiométrico) como fuente de GSSH. En primer lugar, se adaptó un método para cuantificar el GSSH formado en la

mezcla de especies, lo cual permitió profundizar en el estudio del equilibrio y de la cinética de la reacción formadora de GSSH. Finalmente, se evaluó la acidez del GSSH y su reactividad nucleofílica con tres electrófilos. Los resultados de esta parte del trabajo fueron publicados en la revista *J. Biol. Chem.* en 2020 [284]. En el siguiente texto se describen las principales secciones de dicho artículo. El artículo, junto con la información suplementaria, se proporcionan en el Anexo II.

3.2.1. Resultados y discusión

Cuantificación de GSSH

En primer lugar, se adaptó un método basado en la derivatización con mBrB seguido de HPLC, para cuantificar el GSSH presente en una mezcla de especies. Las mezclas de GSSG y H₂S, que contenían GSSH, fueron incubadas con un exceso de mBrB y se inyectaron en una columna de fase reversa acoplada a un HPLC con un detector de arreglo de diodos. Se registraron cromatogramas a 260 y 396 nm, y se identificaron los picos correspondientes a GSSG y a los productos derivatizados del tiol (GS-B), persulfuro (GSS-B) y H₂S (B-S-B) (Figura 1B del Anexo II). La asignación de picos fue verificada por espectrometría de masas (Figura 1C del Anexo II). Luego, se realizaron curvas de calibración con estándares de GSH y H₂S derivatizados a 396 nm y de GSSG a 260 nm. Para cuantificar GSSH, se utilizó la curva de GSH asumiendo que las absortividades de GS-B y GSS-B a 396 nm se debían a la porción bimano y eran similares. Cabe destacar que los experimentos fueron diseñados cuidadosamente para asegurar que las reacciones con mBrB fueran más rápidas que el reequilibrio de las especies en las mezclas y, por lo tanto, que el GSS-B detectado reflejara la concentración de GSSH en las mezclas (Figuras S1 y S2 del Anexo II).

Cinética y termodinámica de la reacción de GSSG con H₂S

La cinética de la reacción entre GSSG y H_2S , que produce GSSH y GSH reversiblemente (ver Ec. 38), se estudió en condiciones de pseudo-primer orden con GSSG en exceso, a pH fisiológico y 25 °C. Se puso a reaccionar GSSG (5-11 mM) con H_2S (0.5 mM) en fosfato de sodio (100 mM, pH 7.4) y

se fueron tomando alícuotas en el tiempo que fueron incubadas con mBrB (10 mM) en fosfato para detener la reacción. Las muestras derivatizadas fueron posteriormente analizadas por HPLC. Alternativamente, a mezclas de GSSG y H₂S preincubadas durante una hora, se les agregó GSH en exceso (2-12.5 mM) respecto al GSSH de la mezcla. De manera similar, la reacción fue detenida por incubación con mBrB y dilución en fosfato a distintos tiempos, y las muestras fueron analizadas por el método de HPLC.

Las mezclas alcanzaron el equilibrio en una escala de minutos. La concentración de GSSH fue siempre menor que la de GSH (Figura 2A del Anexo II), consistente con una reacción posterior más rápida entre GSSG y GSSH para formar GSH y GSSSG. Esto es congruente con lo publicado por otros grupos por la época en que se estaban realizando estos experimentos (ver Ec. 39) [58,119]. Se determinaron constantes cinéticas de 0.23 ± 0.02 y 1.11 \pm 0.06 M⁻¹ s⁻¹, para las reacciones directa (GSSG y H₂S) y reversa (GSSH y GSH), respectivamente (Figura 2A-C del Anexo II). También se determinó una constante de equilibrio de 0.194 ± 0.005 (Figura 2D del Anexo II). Cabe destacar que el valor de la constante cinética de la reacción directa es coherente con el previamente reportado, $0.16 \pm 0.01 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 7.4, 25 °C) [51]. A su vez, la constante de la reversa constituye el primer valor reportado a pH fisiológico para la reacción electrofílica de un persulfuro de bajo peso molecular con un tiol de bajo peso molecular. Su valor relativamente bajo implica que esta reacción probablemente no ocurra endógenamente, teniendo en cuenta, sobre todo, que estos persulfuros pueden actuar como sustratos de enzimas (como persulfuro dioxigenasa y rodanesa). Para la segunda reacción que ocurre en la mezcla, se estimaron constantes cinéticas de 1.6-2.3 M⁻¹ s⁻¹ para la reacción directa (GSSG y GSSH) y 3.1-9 M⁻¹ s⁻¹ para la reversa (GSSSG y GSH) (Figura 2 del Anexo II).

Acidez de GSSH y cinética de la reacción con mBrB

El p K_a de GSSH fue determinado por la dependencia con el pH de la reacción entre GSSH y mBrB, aprovechando que el mBrB genera productos fluorescentes, que no está cargado eléctricamente y que no acepta ni libera protones dentro del rango de pH estudiado. Las reacciones se realizaron en

un amortiguador de tres componentes para que la fuerza iónica fuera constante (I = 0.15 M) a los pHs estudiados [285]. Se siguieron por más de un método para darle robustez al resultado, por el método de velocidades iniciales y por el método integral en condiciones de pseudo-primer orden. Cada estrategia presenta distintas ventajas, el método de velocidades iniciales había servido anteriormente para determinar el p K_a del GSH [115,286], mientras que el método integral con mBrB en exceso elimina la necesidad de conocer la concentración exacta del GSSH.

Para determinar el p K_a del GSSH por el método de velocidades iniciales, se pusieron a reaccionar bajas concentraciones de mBrB y de la mezcla que contenía GSSH, a distintos pHs y 25 °C. Las pendientes iniciales de la fluorescencia aumentaron con el pH de acuerdo con una función sigmoidea, de la cual se obtuvo un p K_a de 5.50 ± 0.08 (Figura 3A del Anexo II). Se calculó que las contribuciones de GSH y H₂S al cambio de fluorescencia eran despreciables en estas condiciones (0.015 y 0.007 %, respectivamente, de la contribución de la reacción con GSSH a pH 6) [115,119,161,204,287].

Por otro lado, se determinó la constante cinética de segundo orden para la reacción de GSSH y mBrB a distintos pHs y 25 °C. Las reacciones de mBrB (en exceso estequiométrico) con las mezclas de GSSG y H₂S que contenían GSSH, se siguieron por fluorescencia en un espectrofluorímetro de flujo detenido. De los aumentos de fluorescencia se obtuvieron constantes exponenciales (k_{obs}) que fueron atribuidas a las reacciones del mBrB con GSSH (Figura 3B,C del Anexo II). Los aumentos lineales de las k_{obs} con la concentración de mBrB permitieron determinar las constantes aparentes de orden dos, k_{pH} (Figura 3D del Anexo II). Estas constantes tuvieron una dependencia sigmoidea con el pH que permitieron calcular un p K_a de 5.45 ± 0.03 (Figura 3E del Anexo II), similar al valor obtenido por el método de velocidades iniciales. El valor de este pK_a es 3.49 unidades menor que el pK_a del GSH [115]. Esto significa que la disponibilidad de las especies deprotonadas a pH 7.4 es de 2.8 % para el GSH y 99 % para el GSSH. Además, se determinó una constante cinética independiente del pH (k_{ind}) para la reacción de mBrB con GSSH de (9.0 \pm 0.2) \times 10³ M⁻¹ s⁻¹ (Figura 3E del Anexo II). La k_{ind} representa la constante de velocidad que se hubiese medido si todo el persulfuro estuviera ionizado. La constante resultó ser 44

veces más grande que la reportada para la reacción con GS⁻ [115]. A pH 7.4, la reacción del GSSH tiene una constante de velocidad aparente de $(7.02 \pm 0.04) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 1200 veces más grande que el GSH en las mismas condiciones.

Para entender las diferencias de acidez de los persulfuros respecto a la de los tioles, nuestros colaboradores de la Universidad de Buenos Aires hicieron análisis computacionales con metanotiol y metanopersulfuro. Los resultados sugirieron que la mayor acidez de los persulfuros se debe, principalmente, al enlace S-H más débil en los persulfuros (Tabla S1 del Anexo II).

Cinética de las reacciones de GSSH con electrófilos de relevancia biológica

Luego, se estudió la cinética de las reacciones de GSSH con electrófilos fisiológicos: peroxinitrito (ONOOH/ONOO⁻) y H_2O_2 . La reacción con peroxinitrito se siguió por absorbancia a 302 nm en el espectrofluorímetro de flujo detenido. Se estudió en condiciones de pseudo-primer orden, con GSSH y los otros componentes de la mezcla en exceso respecto al peroxinitrito (pH 7.23, 37 °C). Las k_{obs} obtenidas del decaimiento exponencial de peroxinitrito se correlacionaron linealmente con la concentración de GSSH (Figura 4A,B del Anexo II). Las contribuciones de las reacciones del GSH y H₂S presentes en las mezclas con el peroxinitrito fueron restadas del decaimiento total observado. De esta manera, se obtuvo una constante cinética de (1.25 ± 0.03) × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ para la reacción del GSSH y ONOOH, se calculó una k_{ind} de (4.7 ± 0.1) × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, que es 1.8 veces mayor que la de la reacción con GS⁻ [288,289].

El estudio de la reacción entre GSSH y H_2O_2 no fue trivial. Varios de los abordajes que se probaron presentaron inconvenientes causados por los componentes de la mezcla de GSSG y H_2S . Dentro de las técnicas evaluadas para seguir el consumo de H_2O_2 que no dieron resultados robustos se incluyen la formación de oxígeno en presencia de catalasa seguida por oxímetría, la reacción con Amplex Red o con Amplex UltraRed en presencia de la peroxidasa de rábano (HRP) y el método de FOX ("ferrous oxidationxylenol orange"). En este último, el Fe²⁺ es oxidado por H_2O_2 en medio ácido a Fe³⁺, que en presencia de naranja de xilenol forma un complejo coloreado que puede ser seguido por absorbancia [290].

Finalmente, la cinética de la reacción se siguió por la fluorescencia intrínseca de una variante de peroxirredoxina 5, en la cual el cambio en la emisión es proporcional a la concentración de H₂O₂ cuando la proteína está en exceso estequiométrico. La reacción se siguió por el consumo de H₂O₂ en presencia de la mezcla con GSSH en exceso. Luego de restar las contribuciones del GSH y H₂S al decaimiento de H₂O₂, se obtuvo una constante de 7.5 ± 0.6 M⁻¹ s⁻¹ para la reacción entre H₂O₂ y GSSH (pH 7.02, 25 °C) (Figura 4C del Anexo II). Considerando el p*K*_a de GSSH, se calculó una *k*_{ind} de 7.7 ± 0.6 M⁻¹ s⁻¹, que es 4 veces menor que con GS⁻ [115].

Estudios computacionales de las reacciones de persulfuros y tioles con electrófilos

Para complementar los resultados experimentales con datos computacionales, nuestros colegas de la Universidad de Buenos Aires realizaron simulaciones de las reacciones de metanotiol o metanopersulfuro con los electrófilos mBrB, peroxinitrito y H_2O_2 . Las simulaciones sugirieron que las reacciones de GSSH con los electrófilos ocurren por mecanismos de sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) (Figura 5 del Anexo II), similar al caso de los tioles. Además, mostraron que las diferencias de reactividad con respecto a los tioles se deben a las diferencias de las estructuras electrónicas y no a efectos del solvente (Figura S6 del Anexo II).

Efecto alfa en persulfuros

Como se explicó previamente, en los gráficos de Brønsted se correlaciona la capacidad nucleofílica con la basicidad para una cierta familia de compuestos. Estos gráficos permiten evidenciar un nucleófilo con efecto alfa, ya que su reactividad se desvía positivamente de la tendencia de los nucleófilos de referencia (ver Figura 9). A partir de las k_{ind} determinadas en este trabajo y de datos reportados para tioles de bajo peso molecular, se construyeron gráficos de Brønsted para las reacciones con cada electrófilo (Figura 6 del Anexo II). El efecto alfa, es decir, la nucleofilia de GSS⁻ con

respecto a la esperada para un tiolato con igual p K_a , tuvo una magnitud de 1670 para mBrB, 50 para peroxinitrito y 3.2 para H₂O₂ (Tabla 1 del Anexo II). La magnitud del efecto alfa para los electrófilos (mBrB > ONOOH > H₂O₂) siguió la tendencia de los β_{nuc} de las reacciones de los tiolatos (0.52 para mBrB, 0.42 para ONOOH y 0.27 para H₂O₂ [115,289,291]) y con la habilidad de los grupos salientes (HBr > HNO₂ > H₂O, p K_a s de -8.8, 3.35 y 14, respectivamente [292–294]).

3.2.2. Conclusiones

En este trabajo, se puso a punto un método de HPLC para cuantificar GSSH, GSH, GSSG y H₂S en una mezcla de especies. La incubación de un exceso de GSSG con H₂S genera GSH, GSSH y GSSSG en al menos dos reacciones reversibles. Para la reacción entre GSSG y H₂S, se determinó la constante de equilibrio y las constantes cinéticas de las reacciones directa y reversa. Se determinó el p K_a del GSSH (5.45 ± 0.03), constituyendo la primera determinación de p K_a de un persulfuro biológico. La mayor acidez de los persulfuros de bajo peso molecular respecto a los tioles análogos estructuralmente se adjudicó a que el enlace S-H en los persulfuros es más débil. Adicionalmente, se caracterizó la cinética de las reacciones de GSSH con mBrB, peroxinitrito y H₂O₂, constatando que el GSS⁻ presenta un efecto alfa para las reacciones con dichos electrófilos respecto a los tiolatos. Si bien el efecto alfa en compuestos con azufre se había sugerido, no se disponía de datos sólidos que lo confirmaran. Considerando los resultados obtenidos, se concluye que, a pH fisiológico, la mayor nucleofilia de los persulfuros de bajo peso molecular con respecto a los tioles se debe a la combinación de dos factores: mayor disponibilidad de la especie ionizada (debido al menor pK_a) y, dependiendo del electrófilo, al efecto alfa.

3.2.3. Contribución personal en el artículo

Realización y análisis de los experimentos para poner a punto el método de HPLC para cuantificar GSSH (Figura 1B, S1, S2 del Anexo II). Participación en el diseño y análisis de los experimentos de espectrometría de masas (Figura 1C del Anexo II). Participación en el diseño, realización y análisis de los experimentos cinéticos y termodinámicos con GSSG y H₂S (Figura 2, S3, Tabla S2 del Anexo II), de la determinación del pK_a de GSSH (Figura 3 del Anexo II) y de los estudios cinéticos con peroxinitrito y H_2O_2 (Figura 4, S4, S5 del Anexo II). Discusión de todos los resultados incluyendo la adaptación de los gráficos de Brønsted (Figura 6 del Anexo II). Corredactora del artículo.

3.3. Artículo 3. Acidez de los persulfuros y su modulación por los entornos proteicos en la SQR y la rodanesa

Manuscrito aceptado (condicional a revisiones menores) para ser publicado en *J. Biol. Chem.*

Benchoam D., Cuevasanta E., Roman J.V., Banerjee R., Alvarez B.

A la luz de los resultados exitosos obtenidos con GSSH, los estudios de acidez y reactividad con mBrB se extendieron hacia varios otros persulfuros de bajo peso molecular. Además, se investigó la modulación de la acidez de los persulfuros por los entornos proteicos. Como modelos proteicos se utilizaron las enzimas humanas SQR y rodanesa. Los experimentos con SQR fueron realizados en el marco de una pasantía en el Laboratorio de la Dra. Banerjee en la Universidad de Michigan. Con los resultados obtenidos se preparó un manuscrito que fue aceptado, condicional a revisiones menores, por la revista *J. Biol. Chem.* en noviembre de 2023. En el texto que sigue, se exponen las principales secciones del manuscrito. Adicionalmente, se comentan experimentos que no quedaron incluidos en el texto para publicar. El manuscrito completo incluyendo la información suplementaria puede encontrarse en el Anexo III.

3.3.1. Resultados y discusión

Acidez y reactividad de persulfuros de bajo peso molecular

Siguiendo un procedimiento similar al utilizado en los experimentos con GSSH (en 3.2.1), se determinaron el p K_a y la k_{ind} con mBrB de varios persulfuros de bajo peso molecular. Para preparar soluciones conteniendo los persulfuros, se mezclaron los disulfuros simétricos de bajo peso

molecular correspondientes y H₂S. Se trabajó con CysSSH, HcySSH y los persulfuros de cisteamina (CystSSH), β -mercaptoetanol (β -MeSSH), cisteína metiléster (CysOMeSSH) y penicilamina. La elección de los persulfuros fue en base a la disponibilidad comercial de los disulfuros y al valor de p K_a de los tioles correspondientes, de manera de abarcar un rango amplio.

De forma análoga al estudio con GSSH, las mezclas preincubadas de los disulfuros y H₂S se pusieron a reaccionar con un exceso de mBrB, en un amortiguador con fuerza iónica constante, a distintos pHs y 25 °C. Las reacciones se siguieron por fluorescencia en el espectrofluorímetro de flujo detenido. Los cursos temporales presentaron fases exponenciales que fueron atribuidas a la reacción entre el persulfuro correspondiente y el mBrB (Figura 2A del Anexo III) excepto para el persulfuro de penicilamina, cuyos registros exhibieron dos fases exponenciales de amplitudes similares y no se pudo discriminar cuál de las fases correspondía a la reacción con el persulfuro, por lo cual se excluyeron estos datos del análisis global. De las k_{obs} obtenidas para los restantes persulfuros, se determinaron las constantes de segundo orden a cada pH (Figura 2B del Anexo III). Éstas mostraron una dependencia sigmoidea con el pH, lo que permitió determinar el p K_a de cada persulfuro y su k_{ind} con mBrB (Figura 2C-F del Anexo III). En el caso de CysOMeSSH, se obtuvieron dos valores de pK_a , que fueron asignados al amoniopersulfuro y al aminopersulfuro (Figura 2G del Anexo III). Todos los persulfuros tuvieron valores parecidos de pK_a , 4.6-6.3, y de k_{ind} con mBrB, (3.2-9.0) × 10³ M⁻¹ s⁻¹. Asimismo, todos los persulfuros presentaron mayor acidez y reactividad que los tioles análogos estructuralmente (Tabla 1 del Anexo III).

La similitud de los valores de pK_a y de reactividad nucleofílica de los distintos persulfuros sugiere que los sustituyentes de los persulfuros tienen un efecto menor en sus propiedades en comparación con los tiolatos, que tienen rangos más amplios de valores de pK_a y de constantes cinéticas. Esto podría explicarse por la mayor distancia entre los grupos sustituyentes y el azufre nucleofílico en el caso de los persulfuros debido a la presencia del azufre interno. Adicionalmente, los persulfuros mostraron una reactividad nucleofílica más alta que la esperada para los tiolatos con los mismos pK_as y un menor β_{nuc} que los tiolatos, que se obtienen de los gráficos de Brønsted

104

(Tabla 1, Figura 7 del Anexo III). La mayor nucleofilia proporciona evidencia de un efecto alfa. Aunque el origen de este fenómeno no esté del todo comprendido, una explicación para el efecto en los persulfuros podría ser la mayor estabilización del carácter birradical del estado de transición [127]. No obstante, se requieren investigaciones adicionales para comprender la base de las diferencias observadas para los persulfuros y los tiolatos.

SQR

Como ejemplo de persulfuro proteico, se buscó estudiar la acidez del persulfuro que se forma en la Cys₃₇₉ de la SQR durante el ciclo catalítico (esquema en Figura 27 y Figura 1 del Anexo III). Para esto, se exploró la dependencia con el pH de la actividad de la enzima en estado estacionario. Se partió de SQR humana soluble que había sido expresada y purificada por el Dr. Landry del laboratorio de la Dra. Banerjee como en ocasiones anteriores [42,43]. La concentración se determinó por la absorbancia del cofactor FAD y la actividad enzimática se midió a través de la reducción de CoQ₁ por absorbancia [42].

En los ensayos de actividad, se utilizó sulfito o cianuro como aceptor de azufre y concentraciones saturantes de H₂S y CoQ₁, de manera de que la velocidad global estuviera limitada por la reacción entre el persulfuro y el aceptor. Los ensayos se realizaron en un amortiguador con fuerza iónica constante, a distintos pHs y 25 °C. A partir de los cursos temporales de absorbancia (Figura 3A,D del Anexo III), se calcularon los k_{cat}/K_m para ambos sustratos. Las gráficas de k_{cat}/K_m en función del pH tuvieron una forma de campana, consistente con la reacción de una especie deprotonada (sustrato aceptor, sulfito o cianuro) con una especie protonada (persulfuro de la SQR). De los ajustes a estas gráficas, se determinó un p K_a de 7.8 ± 0.2 para la enzima persulfuro (Figura 3C,E del Anexo III). La información estructural disponible (PDB 60IB) [49] apoya que este valor pueda ser asignado al persulfuro formado en la Cys₃₇₉, aunque no se descarta que pudiera corresponder a otro residuo aminoacídico. Los valores de k_{cat}/K_m independientes de pH resultaron de (2.9 \pm 0.2) \times 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ para la reacción con sulfito y de $(1.5 \pm 0.8) \times 10^6$ M⁻¹ s⁻¹ para la reacción con cianuro (Tabla 2 del Anexo III).

Adicionalmente, se intentó medir el p K_a de la SQR persulfuro utilizando H₂S o GSH como aceptores para el azufre. Estos experimentos fracasaron debido a limitaciones experimentales. En los experimentos con H₂S no se encontró una concentración que fuera saturante para la primera reacción de la SQR y menor que el K_m^{H2S} para la segunda reacción, a todos los pHs. Los ensayos con GSH requerían concentraciones en el rango milimolar, impidiendo realizar el experimento en las mismas condiciones que para cianuro y sulfito, ya que el pH o la fuerza iónica se verían comprometidos.

Además, se observó que el anión cloruro es un inhibidor competitivo reversible de la SQR ($K_i \sim 7.4 \text{ mM}$) (Figura S1D del Anexo III). Esto podría tener implicancias biológicas, especialmente teniendo en cuenta la concentración de cloruro en la matriz mitocondrial de ~4.2 mM [295].

Rodanesa

Como modelo de persulfuro proteico adicional se utilizó el formado en la rodanesa, que se genera en su mecanismo catalítico y es estable (Figura 1 del Anexo III). Aprovechando que la rodanesa bovina está disponible comercialmente, en primer lugar, se intentó determinar la acidez del persulfuro en la versión bovina, adquirida en Sigma Aldrich. Se intentó estudiar la reacción de la enzima en forma de tiol y en forma de persulfuro con mBrB, de manera de obtener resultados de persulfuros proteicos que pudieran ser comparados con los datos de los persulfuros de bajo peso molecular. Sin embargo, no se observó reacción. La falta de reactividad llevó a evaluar el estado de la enzima comercial. Se realizó un gel de electroforesis, que reveló una multiplicidad de bandas, y ensayos de actividad con tiosulfato y cianuro, que demostraron que estaba inactiva, llevando a no trabajar más con la enzima bovina comercial. Cabe mencionar que, cuando se realizaron estos experimentos, no teníamos conocimiento de unos artículos de la década del setenta en los que se estimaron pK_{as} para el persulfuro de la rodanesa bovina (ver 1.6.2) [116,117,256].

La rodanesa humana fue expresada por la Dra. Bonilla del Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos del Institut Pasteur de Montevideo (IPMont) a partir de un plásmido cedido por la Dra. Banerjee, que codifica para la enzima unida a una etiqueta de cola de histidinas (HisTag). La

enzima fue purificada según procedimientos anteriores [43]; se usó una columna de cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) con una resina de níquel para aislarla y trombina para remover la etiqueta de histidina. La concentración de rodanesa se estimó usando un coeficiente de extinción molar que fue calculado a partir de la secuencia aminoacídica [296]. Para medir la actividad enzimática, se utilizaron tiosulfato y cianuro como sustratos, y se siguió la concentración del tiocianato formado mediante la formación del complejo tiocianato férrico en un procedimiento similar al segundo paso del método de la cianólisis fría (ver Figura 13). La puesta a punto del ensayo de actividad presentó varias complicaciones. Hubo que tener en cuenta los problemas inherentes al método de cianólisis fría discutidos en el Anexo I. Adicionalmente, notamos que los protocolos reportados [43,170] presentan varias limitaciones experimentales, como amortiguadores no suficientemente concentrados como para amortiguar las concentraciones de cianuro utilizadas, utilización de concentraciones de sales de hierro que interfieren con la absorbancia del complejo, absorbancias finales que superan el límite del rango lineal, entre otros. Otros problemas a los que nos enfrentamos fueron, precipitación de las muestras, inhibición de la actividad por ciertos amortiguadores, decoloración del complejo en el tiempo, necesidad de usar stocks frescos de tiosulfato, cianuro y formaldehído, entre otros.

Una vez puesto a punto el protocolo de actividad, se midió la velocidad en estado estacionario de la formación de tiocianato, a diferentes pHs y 25 °C. Se utilizó tiosulfato en una concentración saturante (300 mM) y cianuro en una concentración menor al K_m , para que la velocidad global estuviera limitada por la reacción del persulfuro de la rodanesa con el cianuro. Dado el valor de $K_m^{cianuro}$ de 29 mM citado en la literatura actual [170], la actividad se midió inicialmente usando 5 mM de cianuro. No obstante, los controles realizados revelaron que la concentración de cianuro no correspondía a un escenario de concentración subsaturante. De hecho, se estimó un $K_m^{cianuro}$ de 2.8 mM a pH 8.9, coherente con el reporte más antiguo (1.8 mM a pH 8.5, 0 °C [256]). Esto llevó a tener que repetir todos los ensayos. Usando 300 µM de cianuro, la actividad aumentó con el pH con una dependencia sigmoidea, con un pK_a aparente de 8.47 ± 0.06 y una

constante máxima de (4.0 ± 0.1) × 10^5 M⁻¹ s⁻¹ (Figura 4A del Anexo III). Estos resultados fueron desconcertantes, ya que se esperaba que la actividad dependiera del pH con una forma de campana, de forma similar a lo observado para el caso de la SQR, revelando el pK_a de la enzima y el del cianuro libre (de 8.97 en las condiciones de trabajo [297]).

A continuación, se estudió la cinética preestacionaria de las reacciones de rodanesa persulfuro con dos aceptores de azufre: sulfito y cianuro. Para preparar el persulfuro, se incubó rodanesa con un exceso de tiosulfato y los compuestos de bajo peso molecular se removieron con una columna de exclusión molecular (PD MidiTrap G-25). La enzima persulfuro fue expuesta a distintas concentraciones de sulfito o cianuro en exceso, en un amortiguador con fuerza iónica constante, a distintos pHs y 25 °C. Las reacciones se siguieron en el espectrofluorímetro de flujo detenido por el cambio en la fluorescencia intrínseca de la enzima. Se ajustaron funciones exponenciales a los aumentos de fluorescencia y se obtuvieron las k_{obs} correspondientes (Figura 5A,B del Anexo III). A partir de las k_{obs} y las concentraciones de sulfito y cianuro utilizadas, se calcularon las k_{pH} de segundo orden. Las gráficas de las constantes de segundo orden en función del pH tuvieron la forma de campana que se esperaba (Figura 5C,D del Anexo III). Los experimentos resultaron en un p K_a de 9.38 ± 0.04 para la enzima persulfuro y en constantes independientes del pH de $(2.5 \pm 0.1) \times$ $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la reacción con sulfito y de $(1.0 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ para la reacción con cianuro (Tabla 2 del Anexo III).

Si bien un p K_a de 9.38 sería consistente con un persulfuro electrofílico porque a pH fisiológico predominaría como especie protonada, los datos estructurales disponibles de la enzima bovina (PDB 1RHD y 1BOH) sugieren que el persulfuro forma enlaces de hidrógeno con grupos aceptores, lo que implicaría que se encuentre deprotonado. Es probable que el p K_a determinado con nuestro método corresponda a una lisina proximal (Lys₂₅₀) que juega un papel estructural y catalítico importante [298]. La lisina protonada aportaría una carga positiva que contribuiría a sobrellevar las cargas negativas del aceptor de azufre y del persulfuro aniónico. Es importante destacar que, aunque el p K_a determinado posiblemente no
corresponda al persulfuro, es responsable de modular la actividad enzimática.

La constante con cianuro medida por fluorescencia de $(1.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ fue 25 veces más grande que la constante de velocidad máxima obtenida en el ensayo de actividad $(4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$. Esta diferencia puede ser explicada por un fenómeno de inhibición por tiosulfato de la actividad, pues el tiosulfato puede reaccionar con la forma persulfuro de la enzima para formar un complejo inactivo (Figura 4B del Anexo III). La disminución de la velocidad de reacción es consistente con la alta concentración de tiosulfato utilizada (300 mM) y la ecuación de velocidad cuando hay inhibición (Figura 4C del Anexo III). A su vez, la inhibición por tiosulfato introduce nuevos equilibrios que podrían estar alterando el p K_a observado con métodos en estado estacionario.

También se exploró una reacción entre la rodanesa persulfuro y mBrB, para poder comparar con los datos de los persulfuros de bajo peso molecular. Sin embargo, pero no se vio reacción, incluso en presencia de concentraciones milimolares de mBrB.

Seguidamente, se estudió la cinética de la reacción de la rodanesa tiol con tiosulfato. Para generar el tiol, primero se preincubó la rodanesa con un exceso de tiosulfato y, posteriormente, con un exceso de cianuro. Luego, se eliminaron los componentes de bajo peso molecular con la columna PD MidiTrap G-25. La reacción se siguió por la disminución de la fluorescencia intrínseca de la rodanesa en presencia de un exceso de tiosulfato (200 µM) en un amortiguador con fuerza iónica constante, a distintos pHs y 25 °C. A los cursos temporales se les ajustaron funciones exponenciales y se obtuvieron las k_{obs} correspondientes (Figura 6A del Anexo III). La gráfica de k_{obs} en función del pH arrojó tres valores de p K_a , de 4.6 ± 0.1, 6.5 ± 0.1 y \sim 10 (Figura 6B,C del Anexo III). En base a los reportes de la rodanesa bovina [116,256], atribuimos el p K_a de 6.5 al tiol de la rodanesa. Este valor es menor que el de un tiol peptídico típico (~9.1) [299], consistente con una modulación del entorno proteico para promover la catálisis. Un p K_a bajo promovería el ataque del tiolato al aceptor en la primera semirreacción (mayor proporción de tiol deprotonado) y la regeneración de la enzima en la

segunda semirreacción (el ataque del dador sobre el azufre externo genera el tiol que tiene menor pK_a que el H₂S, que se produciría en un ataque sobre el azufre interno) (ver 1.4.4).

3.3.2. Conclusiones

En este estudio se determinó la acidez y la reactividad nucleofílica con mBrB de varios persulfuros de bajo peso molecular. Los persulfuros analizados exhibieron una acidez similar (pK_a 4.6-6.3) y constantes de velocidad comparables entre sí $(3.2-9.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$, coherente con la disposición de los sustituyentes a mayor distancia del azufre externo en comparación con los tiolatos. Los resultados obtenidos proporcionan confirmación adicional de la existencia del efecto alfa en las reacciones nucleofílicas de los persulfuros de bajo peso molecular y muestran una correlación entre la reactividad nucleofílica y los p K_a s de los persulfuros. Por otro lado, la velocidad de las reacciones entre los aceptores de azufre y los persulfuros de SQR o rodanesa dependió del pH con un comportamiento que muestra pK_as de 7.8 o 9.38, respectivamente, aunque no necesariamente correspondieran al residuo del persulfuro. Adicionalmente, se determinó un pK_a de 6.5 para el tiol de la rodanesa. Estos resultados sugieren que los entornos proteicos pueden modular la acidez de los persulfuros, dejando en evidencia que los valores de pK_a de los persulfuros de bajo peso molecular no pueden ser extrapolados a los persulfuros proteicos. En resumen, este trabajo contribuye a una mejor comprensión de la química biológica de los persulfuros.

3.3.3. Contribución personal en el manuscrito

Participación en la purificación de la rodanesa humana. Diseño, realización y análisis de los experimentos para poner a punto la medida de actividad de la rodanesa. Participación en el diseño, realización y análisis de los experimentos cinéticos con los persulfuros de bajo peso molecular (Figura 2, 7 y Tabla 1 del Anexo III), SQR (Figura 3 y S1 del Anexo III) y rodanesa (Figura 4, 5, 6 y S2 del Anexo III). Discusión de todos los resultados. Corredactora del artículo.

3.4. Oxidación de roGFP2 por azufretransferasas

3.4.1. Objetivos

La última parte de esta tesis se enfocó en evaluar la capacidad de algunas azufretransferasas para oxidar *in vitro* a una variante de la proteína fluorescente verde sensible al estado redox (roGFP2). Esta investigación se realizó en el marco de un proyecto que tiene el objetivo general de desarrollar biosensores redox fluorescentes para el monitoreo dinámico y en tiempo real de metabolitos azufrados en células. En este proyecto participan colaboradores del Laboratorio de Enzimología de Facultad de Ciencias de la UdelaR, del Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos del IPMont y del Departamento Interactions Arbres Microorganismes de la Université de Lorraine (Francia).

El proyecto en el que se enmarcó este trabajo propone fusionar roGFP2 con rodanesa o MST para generar sensores de sus sustratos específicos, GSSH o 3-MP, respectivamente. Se hipotetiza que las azufretransferasas podrían transferir el persulfuro, producto de la semirreacción con el sustrato dador, a la roGFP2, que funcionaría como sustrato aceptor y terminaría formando el disulfuro que puede ser detectado mediante cambios en la absorbancia o en la fluorescencia (ver Figura 34).

El primer paso crítico para evaluar la eficacia del sensor es constatar que las azufretransferasas tengan la capacidad de oxidar a la roGFP2. Por lo tanto, resulta imprescindible verificar estas reacciones *in vitro* como prueba de concepto antes de experimentar en células. A su vez, luego de superada esta etapa, se deberán evaluar cuestiones adicionales de caracterización de mecanismos de acción y otras relacionadas a los sistemas celulares, como especificidad por los sustratos, interacción con sistemas reductores endógenos, integridad del ambiente celular, etc.

Los experimentos realizados en esta parte de la tesis constituyen las etapas iniciales del proyecto; se evaluó la capacidad de la rodanesa humana y la MST del tripanosomátido *Leishmania major* (*Lm*MST) para oxidar a la roGFP2 *in vitro*. Un punto importante es que, al momento de comenzar

estos experimentos, se contaba con la experiencia de los colaboradores de Francia, que habían visto oxidación de roGFP2 en presencia de 3-MP y las MSTs de la planta *Arabidopsis thaliana* [282], como se comentó previamente. Por otro lado, luego de iniciado el proyecto de biosensores se publicó un artículo con resultados similares usando la MST de levaduras, Tum1 [173].

3.4.2. Materiales y métodos

Soluciones

Las soluciones concentradas de 3-MP (\geq 25 mM, Santa Cruz Biotechnology) se prepararon en agua ultrapura y se almacenaron a -20 °C. Las diluciones de 3-MP se prepararon diariamente en agua ultrapura o amortiguador a partir de las soluciones concentradas. La concentración se verificó por la determinación de tioles con DTNB (AppliChem) [300]. Las soluciones de tiosulfato de sodio (Amresco), tiocianato de potasio (Fluka) y cianuro de potasio (Biopack) se prepararon los días de los experimentos en agua ultrapura o amortiguador dependiendo del experimento. Para preparar soluciones de H₂S₂, se disolvió Na₂S₂ (Dojindo) en agua ultrapura.

Para la purificación de *Lm*MST, se utilizaron distintos amortiguadores: de lisis, con Tris (50 mM, AppliChem), NaCl (0.5 M, Sigma), DNAsa (20 mg/L, Sigma), lisozima (100 mg/L, Sigma), MgCl₂ (10 mM, Sigma) e inhibidores de proteasas (1 pastilla/20 g de pellet bacteriano, Sigma), a pH 8; de unión, con fosfato de sodio (20 mM, Merck, Acros), NaCl (0.5 M) e imidazol (40 mM, Sigma), a pH 7.4; y de elución, con fosfato de sodio (20 mM), NaCl (0.5 M) e imidazol (500 mM), a pH 7.4.

Obtención de proteínas

La expresión y purificación de la proteína roGFP2 fueron realizadas en el Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos del IPMont. La reducción de la proteína se realizó por incubación con un exceso de TCEP (Sigma-Aldrich) o DTT (Acros) (1-10 mM) durante al menos 30 min a temperatura ambiente de manera sistemática antes de cada experimento. El reductor remanente se removió con una columna de desalinización (PD10, GE

Healthcare). Para equilibrar la columna y eluir la proteína, se utilizó un amortiguador de fosfato de sodio (100)mM) con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, 1 mM, Carlo Erba) pH 7.4. а Alternativamente, se utilizó el mismo amortiguador, pero con ácido dietilentriaminopentaacético (dtpa, 100 µM, Acros) en lugar del EDTA. En ciertos experimentos cualitativos con fines exploratorios se usó roGFP2 que había sido reducida el día anterior al experimento. La concentración de roGFP2 total se estimó usando un coeficiente de extinción molar a 428 nm (cercano al punto isosbéstico de las especies oxidada y reducida) de 11000 M⁻¹ cm⁻¹ (valor no publicado; estimado por el Dr. Ferrer-Sueta del Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Facultad de Ciencias, UdelaR).

En cuanto a la obtención de las azufretransferasas, se utilizaron los preparados de rodanesa de la sección anterior (3.1). Por otro lado, se purificó LmMST que había sido expresada por la Dra. Bonilla. La expresión se realizó a partir de una cepa BL21-CodonPlus de Escherichia coli transformada con el plásmido pET-Trx LmMST (GeneScript), que codifica para la LmMST fusionada a una Trx con HisTag, LmMST-Trx-HisTag. Se obtuvieron 6.9 g de pellet de bacterias a partir de dos cultivos de 700 mL, а 37 °C, inducidos con que fueron crecidos isopropil β-D-1tiogalactopiranósido (0.7 mM) e incubados a 15 °C. Para purificar la LmMST, las bacterias se lisaron por resuspensión del pellet en 35 mL de amortiguador de lisis durante 30 min, en hielo, y sonicación. El lisado se centrifugó a 35000 g y 4 °C durante 50 min. El sobrenadante se clarificó con un filtro de 0.46 µm. El sobrenadante filtrado se sembró en una IMAC con resina de níquel (HisTrapTM HP, 1mL, GE Healthcare) conectada a un ÄKTA, de manera de que solo quedara retenida la LmMST-Trx-HisTag, que fue luego eluida con un gradiente de amortiguador de unión: amortiguador de elución (pasando de 100:0 a 0:100 en 40 min) a un flujo de 0.5 mL/min. La proteína eluida se digirió con 0.15 mg de TEV-HisTag (una proteasa del virus de grabado del tabaco fusionada a HisTag; purificada por la Mag. Steglich, Laboratorio de Enzimología) para separar la LmMST de la Trx-HisTag. Se dializó durante 12 h para remover el imidazol proveniente de la elución de la IMAC. El producto de la diálisis se inyectó nuevamente en la IMAC de manera de purificar la LmMST; se eluyó con un gradiente de

amortiguador de elución sin imidazol: amortiguador de elución (pasando de 100:0 a 50:50 en 40 min) a un flujo de 0.5 mL/min. Las fracciones resultantes fueron agrupadas y se les removió el imidazol remanente con una columna de desalinización. La LmMST quedó almacenada en fosfato de sodio (100 mM) con dtpa (100 µM) a pH 7.4 y -20 °C. La enzima almacenada precipitó parcialmente y se observó que el agregado de NaCl (0.5 M) ayudaba а mantenerla estable en los ciclos de congelado/descongelado. La concentración de LmMST se estimó usando un coeficiente de extinción molar a 280 nm de 46870 M⁻¹ cm⁻¹, que fue calculado a partir de la secuencia aminoacídica [296].

Medida de actividad de LmMST

La actividad de *Lm*MST fue medida por la velocidad de estado estacionario de la formación de tiocianato utlizando 3-MP como sustrato, de manera similar a lo realizado previamente [301] y a la medida de actividad de rodanesa (3.3). La *Lm*MST (0.2 μ M) se preincubó en presencia de I3MT-3 (21 μ M, MedChemExpress) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) o de DMSO solo, en Tris 500 mM (pH 8.5, 25 °C) durante 25 min. A las mezclas preincubadas se les agregó cianuro (25 mM) y luego 3-MP (5 mM) (quedando *Lm*MST 0.14 μ M y I3MT-3 15 μ M). Se tomaron alícuotas de 50 μ L a distintos tiempos y se incubaron con 15 μ L de formaldehido (38 %, Biopack) y 65 μ L de FeCl₃·6H₂O (20 mM, Sigma-Aldrich) diluido en HNO₃ (17 %, Dorwil) para detener la reacción. Las absorbancias a 460 nm fueron medidas inmediatamente y se intrapolaron en una curva de calibración de tiocianato realizada en las mismas condiciones. También se hicieron medidas de la concentración de tiocianato formado usando *Lm*MST 0.57 μ M a 37 °C.

Evaluación de la roGFP2 como sustrato de la rodanesa y la LmMST

Para evaluar la oxidación de roGFP2 por rodanesa persulfuro, se registraron espectros UV-Vis en el tiempo (Varian Cary 60) de mezclas de roGFP2 reducida (4.0 μ M) con rodanesa (0.04-15 μ M) y tiosulfato (20-100 μ M) a pH 7.4, 25 °C, en fosfato de sodio (100 mM) con dtpa (100 μ M) o en un amortiguador de tres componentes que contenía ACES (60 mM,

AppliChem), Tris (31.2 mM), etanolamina (31.2 mM, Sigma), NaCl (240 mM) y EDTA (1 mM).

Para estudiar la oxidación de roGFP2 por *Lm*MST persulfuro, se hicieron espectros UV-Vis en el tiempo de roGFP2 reducida (4.0 μ M) expuesta a distintas concentraciones de *Lm*MST y 3-MP en fosfato de sodio (100 mM) con EDTA (1 mM) a pH 7.4, 25 °C. Los experimentos para explorar la cinética de la oxidación se realizaron con *Lm*MST 15-200 nM y 3-MP 8.8 o 22 μ M. Las reacciones se iniciaron con el agregado de 3-MP o *Lm*MST, excepto en los experimentos con preincubación donde la enzima y el sustrato se dejaron reaccionar por 5 min antes de agregar la roGFP2. Para examinar posibles interferencias de metabolitos, se preincubó roGFP2 reducida (3.8 μ M), *Lm*MST (10 nM) y GSH (52 μ M) o tiosulfato (21 μ M) a 25 °C en el mismo amortiguador. Después de 25 min, se agregó 3-MP (3.8 μ M) y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo. Se realizaron controles con roGFP2, *Lm*MST y GSH o tiosulfato sin 3-MP y sin la etapa de preincubación. También se hicieron espectros en el tiempo de roGFP2 (2.0 μ M) expuesta a H₂S₂ (20 μ M) en el mismo amortiguador y 25 °C.

3.4.3. Resultados y discusión

Variaciones en el espectro de la roGFP2 según su estado de oxidación

Se compararon los espectros de absorbancia de la roGFP2 en los estados completamente oxidada y reducida. Se observó que, sumado al pico de 280 nm característico de las proteínas, la roGFP2 oxidada presenta dos máximos relativos de intensidad similar, a 400 y 495 nm, mientras que la reducida exhibe un máximo a 488 nm (Figura 35A). A su vez, al reducir roGFP2 se observó un punto isosbéstico a 427 nm (Figura 35A-C). Esto significa que la absorbancia a 427 nm no depende del estado redox de la roGFP2 y, por lo tanto, sirve para determinar la concentración de proteína total.

Teniendo en cuenta que no existe ninguna longitud de onda en la cual la roGFP2 oxidada absorba y la reducida no, ni viceversa, el grado de oxidación de la roGFP2 no puede ser determinado a partir de una sola longitud de onda. Para poder conocer la proporción de roGFP2 oxidada a

partir de un espectro, se planteó un sistema de ecuaciones que considera la contribución de la proteína oxidada y reducida a dos longitudes de onda y el balance de masas (Ec. 40-Ec. 42). Se utilizaron las absorbancias a 397 y 488 nm por ser las longitudes de onda a las que ocurren los mayores cambios de absorbancia (Figura 35C). La deducción del sistema resultó en una ecuación que permite calcular el grado de oxidación de roGFP2 a partir de las absorbancias a dos longitudes de onda (Ec. 43). A su vez, teniendo en cuenta la concentración total de roGFP2, se pueden estimar las concentraciones de proteína reducida y oxidada en una muestra (Figura 35D). Los coeficientes de extinción molar a 397 y 488 nm fueron determinados a partir de 6 espectros de roGFP2 completamente reducida y de 4 espectros de roGFP2 totalmente oxidada (Tabla 3).



Figura 35. Espectros UV-Vis de roGFP2. A) Espectros representativos de roGFP2 completamente oxidada (línea negra) o reducida (línea roja). La proteína oxidada presenta un máximo a 280 nm y dos máximos relativos a 400 y 495 nm. La proteína reducida exhibe un pico a 280 nm y un máximo a 488 nm. **B)** Espectros de la reducción de roGFP2. Se expuso roGFP2 oxidada (1.8 μ M) a DTT (2 mM) en fosfato de sodio 100 mM con dtpa 100 μ M (pH 7.4, 25 °C); la línea punteada corresponde al espectro antes de agregar DTT. **C)** Cursos temporales de la reducción de roGFP2, corresponden a las longitudes de onda donde se producen los mayores cambios (488 y 397 nm) y donde se forma el punto isosbéstico (427 nm). **D)** Curso temporal de la concentración de roGFP2 oxidada (calculada con la Ec. 43).

Ec. 40	$[roGFP2]_{total} = [roGFP2]_{red} + [roGFP2]_{ox}$
Ec. 41	Abs ₃₉₇ = $\varepsilon_{red 397} [roGFP2]_{red} + \varepsilon_{ox 397} [roGFP2]_{ox}$
Ec. 42	Abs ₄₈₈ = $\varepsilon_{red \ 488} [roGFP2]_{red} + \varepsilon_{ox \ 488} [roGFP2]_{ox}$
Ec. 43	$\frac{[\text{roGFP2}]_{\text{ox}}}{[\text{roGFP2}]_{\text{total}}} = \frac{\text{Abs}_{397}\epsilon_{\text{red}\ 488} - \text{Abs}_{488}\epsilon_{\text{red}\ 397}}{\text{Abs}_{397}(\epsilon_{\text{red}\ 488} - \epsilon_{\text{ox}\ 488}) + \text{Abs}_{488}(\epsilon_{\text{ox}\ 397} - \epsilon_{\text{red}\ 397})}$

 Tabla 3. Coeficientes de extinción molar de roGFP2

	ε ₃₉₇ (M ⁻¹ cm ⁻¹)	ε ₄₈₈ (M ⁻¹ cm ⁻¹)
Reducida	6667 ± 200	46210 ± 1300
Oxidada	21129 ± 800	19790 ± 800

Evaluación de un posible diseño de sensor con rodanesa y roGFP2

Para evaluar la capacidad de la rodanesa persulfuro de oxidar a la roGFP2, se registraron espectros de absorbancia en el tiempo de roGFP2 expuesta a tiosulfato y a rodanesa. Si bien el objetivo del sensor con rodanesa era detectar GSSH, se utilizó tiosulfato como sustrato dador de azufre para simplificar los experimentos de prueba de concepto. Se realizaron experimentos variando el amortiguador, así como las concentraciones de enzima y de tiosulfato. Los resultados demostraron que la rodanesa persulfuro no es capaz de oxidar a la roGFP2. En la Figura 36 se muestra un experimento representativo. El agregado de GSH a la mezcla, que se espera que forme GSSH por la reacción con la rodanesa persulfuro, tampoco generó cambios en el estado redox de la roGFP2.



Figura 36. Exposición de roGFP2 reducida a rodanesa y a tiosulfato. A) Espectro cinético de roGFP2 reducida (4.0 μ M) expuesta a rodanesa (40 nM, agregada a los 179 s) y a tiosulfato (100 μ M, agregado a los 412 s), en el amortiguador ACES/Tris/etanolamina (pH 7.4, 25 °C). **B)** Cursos temporales a 397, 427 y 488 nm.

Obtención de LmMST

La *Lm*MST se purificó a partir de un pellet de bacterias con *Lm*MST-Trx-HisTag con dos pasos de cromatografía de afinidad. En el primer paso de IMAC, se purificó la *Lm*MST-Trx-HisTag (52.8 kDa) del sobrenadante del lisado bacteriano (Figura 37A). Luego, se separó la *Lm*MST de la Trx-HisTag por digestión con TEV-HisTag. En el segundo paso de IMAC, se purificó la *Lm*MST (40.1 kDa) del resto de los productos de la digestión (Trx-HisTag de ~13 kDa, TEV-HisTag de ~33 kDa) (Figura 37B). El gel de electroforesis con las distintas etapas de la purificación muestra que, si bien se perdió proteína en algunos de los pasos de purificación, la *Lm*MST obtenida quedó con un alto grado de pureza (Figura 37C). Se obtuvieron 0.31 mg de enzima que quedaron almacenados en fosfato de sodio (100 mM) con dtpa (100 µM), a pH 7.4, -20 °C.



Figura 37. Purificación de LmMST. A) Cromatograma del lisado de bacterias. *Inserto:* espectro de las fracciones conteniendo la *Lm*MST-Trx-HisTag (asterisco en cromatograma). **B)** Cromatograma del producto de diálisis. *Inserto:* espectro de las fracciones conteniendo la *Lm*MST (asterisco en cromatograma). **C)** Gel de electroforesis SDS-PAGE de alícuotas tomadas en los distintos pasos de la purificación. *Carriles 1 y 8:* marcador de peso molecular, *carril 2:* lisado, *carril 3:* sobrenadante, *carril 4:* pellet, *carril 5:* fracción no unida de la primera IMAC, *carril 6:* lavado de la primera IMAC, *carril 7:* pico de la proteína de interés de la primera IMAC (*Lm*MST-Trx-HisTag de 52.8 kDa), *carril 9:* producto de la digestión (*Lm*MST de 40.1 kDa, TEV-HisTag de ~33 kDa y Trx-HisTag de ~13 kDa), *carril 10:* pico de proteína de interés de la segunda IMAC.

Actividad enzimática de LmMST

Se hicieron experimentos preliminares para determinar si la *Lm*MST purificada se encontraba activa. La actividad específica se determinó por la velocidad de estado estacionario de formación de tiocianato a partir de 3-MP (5 mM, $K_m^{3-MP} = 0.2$ mM, pH 7.3 [301]) y cianuro (25 mM) en presencia de *Lm*MST (0.14 µM), a pH 8.5, 25 °C. La concentración de tiocianato se siguió a distintos tiempos por la formación del complejo tiocianato férrico a 460 nm. El curso temporal no exhibió un comportamiento exactamente lineal, pero se ajustó una recta al primer minuto de la reacción de manera de estimar una velocidad de estado estacionario (Figura 38A). Se obtuvo una velocidad inicial de 469 µM min⁻¹ que correspondió a una actividad específica de 83.5 U mg⁻¹. En conclusión, la enzima presentó actividad,

aunque menos que lo reportado (229 U mg⁻¹ con 3-MP 5 mM y cianuro 10 mM, a 37 °C [267]). Se realizaron controles con 3-MP y cianuro en ausencia de enzima que verificaron que no hubo una contribución de tiocianato por una reacción espontánea de los sustratos ni interferencias de los sustratos en la absorbancia a 460 nm (Figura 38B).



Figura 38. Medida de la actividad de *Lm***MST. A)** Cursos temporales de la formación de tiocianato catalizada por *Lm*MST sola (0.14 μ M) (cuadrados negros) o preincubada con I3MT-3 (15 μ M) (círculos verdes) en presencia de cianuro (25 mM) y 3-MP (5 mM) en Tris 500 mM (pH 8.5, 25 °C). Se ajustaron rectas hasta el primer minuto de cada reacción (líneas rojas), obteniendo velocidades iniciales de 469 y 451 μ M min⁻¹ y actividades específicas de 83.5 y 80.2 U mg⁻¹, respectivamente. **B)** Cursos temporales de la concentración de tiocianato formado a partir de cianuro (25 mM) y 3-MP (5 mM) en ausencia (triángulos azules) o presencia de *Lm*MST (0.57 μ M) (cuadrados negros), en Tris 500 mM (pH 8.5, 37 °C).

A su vez, se evaluó si la actividad enzimática podía ser inhibida por I3MT-3, un inhibidor de MSTs de mamíferos (IC₅₀ de 2.7 μ M en presencia de MST 10 μ M) [301]. En primer lugar, se registraron espectros de absorbancia del I3MT-3 que demostraron que no absorbe a 460 nm. La *Lm*MST fue preincubada con un exceso de I3MT-3 durante 25 min y luego se midió su actividad. La enzima expuesta a I3MT-3 tuvo una actividad similar a la que no fue expuesta, de 80.2 U mg⁻¹ (Figura 38A). Esto significa que el I3MT-3 no es capaz de inhibir a la *Lm*MST, presentando una ventaja ante la potencial necesidad de inhibir a la MST endógena de células de mamíferos sin afectar el rendimiento de un sensor con *Lm*MST y roGFP2.

Evaluación de un posible diseño de sensor con LmMST y roGFP2

Como prueba de concepto del sensor *Lm*MST-roGFP2 para detectar 3-MP, se registraron espectros UV-Vis de roGFP2 incubada con 3-MP y *Lm*MST en el

tiempo, y en efecto, la roGFP2 fue oxidada (Figura 39). Para evitar la oxidación espontánea de roGFP2, el amortiguador contenía EDTA 1 mM (en pruebas anteriores con dtpa 100 µM no se pudo evitar). Si bien la concentración de 3-MP usada inicialmente oxidó solo parcialmente a la roGFP2, tras un agregado de más 3-MP, la roGFP2 se oxidó completamente (Figura 39A). La dilución de 3-MP usada en este experimento había sido preparada en amortiguador unos días antes y almacenada a -20 °C. En experimentos posteriores se constató que estas diluciones debían ser preparadas el día que fueran a usarse porque no eran estables (se vieron cambios en la forma del espectro UV-Vis y en la concentración de tioles). Aunque la concentración exacta de 3-MP fuera desconocida, estos experimentos proporcionaron resultados concluyentes en cuanto a la capacidad del sistema 3-MP/LmMST para oxidar a la roGFP2. En cambio, en presencia de 3-MP o LmMST y ausencia del otro, la roGFP2 no se oxidó (Figura 39A), dando la pauta de que la especie responsable de la oxidación es un producto de la reacción de 3-MP y LmMST, presumiblemente la LmMST persulfuro (ver Figura 34).



Figura 39. Oxidación de roGFP2 por 3-MP y *Lm***MST. A)** Cursos temporales de roGFP2 (4.0 μ M) sola (cuadrados negros) y en presencia de 3-MP (4.4 μ M) (círculos rojos), de *Lm*MST (100 nM) (triángulos azules) o de *Lm*MST (100 nM) y 3-MP (4.4 μ M) (rombos verdes) en fosfato de sodio (100 mM) con EDTA (1 mM, pH 7.4, 25 °C) obtenidos a partir de espectros UV-Vis. Las concentraciones reales de 3-MP eran menores, pues la concentración del stock estaba sobreestimada y se desconoce cuál era su concentración exacta. Las gráficas muestran el porcentaje de la roGFP2 oxidada. **B)** Espectros cinéticos de la oxidación de roGFP2 por exposición a 3-MP y *Lm*MST (correspondientes a los rombos verdes en *A*).

Exploración de la oxidación de roGFP2 por LmMST y 3-MP

Luego de establecer la viabilidad de un sensor con *Lm*MST y roGFP2 para detectar 3-MP, se comenzó a explorar la cinética de las reacciones involucradas, así como posibles interacciones con otros metabolitos.

Para ahondar en la cinética, se puso a reaccionar roGFP2 reducida con un exceso de 3-MP y concentraciones variables de LmMST, y se registraron espectros UV-Vis en el tiempo (Figura 40A). La roGFP2 se oxidó completamente en una escala de tiempo de minutos; los cursos temporales no siguieron un comportamiento exponencial simple (Figura 40B), sino que presentaron una fase de "lag" y una fase lineal de estado estacionario antes de oxidar a la roGFP2 completamente. La magnitud de los lags disminuyó con la concentración de enzima; de hecho, no se vieron en los registros correspondientes a las mayores concentraciones de enzima testeadas (Figura 40B). Para determinar las velocidades de estado estacionario de cada reacción, se ajustaron rectas a las fases lineales de todos los registros (ejemplos en Figura 40B). Las velocidades de estado estacionario de la oxidación de roGFP2 aumentaron tanto con la concentración de enzima como de sustrato (Figura 40B,C). Por otro lado, al exponer roGFP2 reducida a mezclas con LmMST y 3-MP preincubadas, se observaron cursos temporales con las mismas velocidades de estado estacionario que en los experimentos sin preincubar, pero no se observaron las fases de lag (Figura 40D). La velocidad de estado estacionario aumentó hiperbólicamente con la concentración de enzima, independientemente de la concentración de 3-MP del ensayo (Figura 40E).

La presencia de los lags en algunos de los cursos temporales sugiere que la oxidación de roGFP2 requirió de un paso previo más lento (Figura 40B). La desaparición de los lags con el aumento de concentración de enzima indica que este paso previo depende de la concentración de enzima y, por lo tanto, su velocidad puede ser acelerada (o enlentecida) (Figura 40B). Contrariamente, no parece depender de la concentración de 3-MP, aunque solo se compararon dos concentraciones (Figura 40C). Los experimentos con enzima y sustrato preincubados sugieren que la especie que oxida a la

roGFP2 es un producto de la reacción de 3-MP con *Lm*MST que se genera durante la fase de lag (Figura 40D).



Figura 40, Exploración de la cinética de la oxidación de roGFP2 por LmMST v 3-MP. A) Espectro cinético representativo. Se registraron espectros UV-Vis en el tiempo de roGFP2 reducida (4.0 μ M) expuesta a *Lm*MST (67 nM) y 3-MP (8.8 μ M) en fosfato de sodio (100 mM) con EDTA (1 mM, pH 7.4, 25 °C). Los espectros fueron registrados cada 14 s durante 6.2 min. La línea punteada corresponde a la roGFP2 antes de reaccionar. B) Cursos temporales de la reacción de roGFP2 (4.0 µM) con concentraciones variables de LmMST (17-200 nM) y una concentración fija de 3-MP (8.8 μ M); se ajustaron rectas a las fases lineales para determinar las velocidades de estado estacionario de cada reacción. C) Cursos temporales de la reacción de roGFP2 (4.0 µM) con una concentración fija de LmMST (17 nM) y concentraciones variables de 3-MP (8.8 v 22.0 µM). D) Cursos temporales de la reacción de roGFP2 (4.0 µM) con LmMST (15 nM) y 3-MP (22.0 μ M) o con una mezcla de *Lm*MST (15 nM) y 3-MP (22.0 μ M) que había sido preincubada durante 5 min. E) Velocidades de estado estacionario versus concentración de LmMST. Se ajustaron hipérbolas a los datos obtenidos con 3-MP 8.8 (cuadrados negros) y 22 μ M (círculos rojos). Los ajustes dieron velocidades máximas de (4.4 ± 0.4) × 10⁻⁸ y (3.9 ± 0.2) \times 10⁻⁸ M s⁻¹ y concentraciones de *Lm*MST correspondientes a la mitad de las velocidades máximas de 73 \pm 18 y 21 \pm 4 nM, respectivamente.

A diferencia de las cinéticas Michaelianas típicas en las cuales la velocidad aumenta linealmente con la concentrción de enzima, la velocidad de oxidación de la roGFP2 alcanzó un máximo, sugiriendo un proceso de orden cero respecto a la enzima (Figura 40E). Asumiendo que el proceso fuera de orden uno respecto a la roGFP2, se estima una constante de 0.010 \pm 0.001 s⁻¹ (dividiendo la velocidad máxima entre la concentración de roGFP2) (Figura 40E). Esta reacción podría corresponder al cierre del disulfuro a partir del persulfuro y tiol formados sobre la roGFP2 (Figura 34*c*), lo que implicaría una limitante para todos los sensores con roGFP2 basados en esta reacción. En tal caso, la proximidad espacial entre la *Lm*MST y roGFP2 en la fusión no proporcionaría ninguna ventaja cinética para el sensor, consistente con los resultados reportados para la MST de levadura [173].

Seguidamente, se estudió cómo podrían interferir GSH y tiosulfato con el potencial sensor. En presencia de un exceso de GSH (10 veces la de 3-MP estimada), la oxidación de roGFP2 por 3-MP y *Lm*MST se inhibió parcialmente (Figura 41A). Esto podría deberse a reacciones del GSH con las especies intermediarias, como *Lm*MST persulfuro o roGFP2 persulfuro, así como con la roGFP2 oxidada. Esta observación podría implicar desventajas para un potencial sensor en contextos celulares.

Los resultados obtenidos tiosulfato sembraron con interrogantes importantes. En presencia de *Lm*MST, el tiosulfato no fue capaz de oxidar a la roGFP2; tampoco alteró la oxidación por 3-MP (Figura 41B). Considerando que el tiosulfato se ha reportado como sustrato dador de la LmMST ($k_{cat}/K_m^{tiosulfato} = 2.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [267]), los resultados obtenidos no fueron los esperados. Esto plantea dos alternativas: o bien la LmMST persulfuro es la especie responsable de oxidar a la roGFP2, pero el tiosulfato no es buen sustrato y por lo tanto no se produce adecuadamente el persulfuro en la LmMST, o la reacción de 3-MP con LmMST genera un producto adicional a la LmMST persulfuro y al piruvato, que es capaz de oxidar a la roGFP2 y que no se forma con tiosulfato. A su vez, algunos experimentos realizados posteriormente por otros integrantes del proyecto (el Bach. Ríos y el Dr. Cuevasanta) sugieren que no hay una transferencia directa entre la LmMST persulfuro y la roGFP2, indicando que la reacción de *Lm*MST y 3-MP genera una especie adicional responsable de la oxidación.



Figura 41. Oxidación de roGFP2 por *Lm***MST y 3-MP en presencia de GSH o tiosulfato.** A mezclas de roGFP2 reducida (3.8 μ M) con *Lm*MST (10 nM) en fosfato de sodio (100 mM) con EDTA (1 mM, pH 7.4, 25 °C), se les agregó GSH (57 μ M) (A) o tiosulfato (21 μ M) (B) y, luego de 25 min, 3-MP (5.2 μ M) (triángulos azules). Se registraron espectros UV-Vis en el tiempo para obtener los cursos temporales de oxidación de roGFP2. Se realizaron controles de roGFP2 con 3-MP (cuadrados negros), GSH (círculos rojos en A) o tiosulfato (círculos rojos en B) con las mismas concentraciones. La concentración real de 3-MP era menor, pues la concentración del stock estaba sobreestimada y se desconoce cuál era su valor exacto.

Por otro lado, considerando que uno de los mecanismos catalíticos propuestos para las MSTs sugiere que la reacción con 3-MP (en presencia de Trx) forma H_2S_2 y H_2S_3 (ver Figura 33A) [269–271], se realizaron experimentos con H_2S_2 y roGFP2 (sin *Lm*MST). En este sentido, se confirmó que el H_2S_2 es capaz de oxidar rápidamente a la roGFP2 (Figura 42), consistente con la oxidación por polisulfuros contaminantes en soluciones de NaHS reportada previamente [79]. Otro de los mecanismos planteados para las MSTs propone la generación de 3-MP persulfuro (ver Figura 33B) [272] que, en principio, podría ser la especie responsable de oxidar a la roGFP2, pues podría reaccionar con uno de sus tioles para terminar formando roGFP2 oxidada y H_2S . Estas alternativas están siendo examinadas por el Bach. Ríos y el Dr. Cuevasanta.



Figura 42. Oxidación de roGFP2 por H₂S₂. Espectros UV-Vis de una solución de roGFP2 (2.0 μ M) en fosfato de sodio (100 mM) con EDTA (1 mM, pH 7.4, 25 °C) a la cual se le agregó H₂S₂ (20 μ M) a los 62 s.

3.4.4. Conclusiones y perspectivas

Con el objetivo final de generar biosensores fluorescentes para detectar metabolitos azufrados, en esta parte de la tesis se evaluó la capacidad de la rodanesa humana y la LmMST para oxidar a la roGFP2. Se compararon los espectros UV-Vis de la roGFP2 completamente reducida y oxidada, y se desarrolló una ecuación para determinar el grado de oxidación de la proteína a partir de las absorbancias a 397 y 488 nm. Los experimentos con rodanesa y tiosulfato demostraron que dicha enzima no puede usar a la roGFP2 como sustrato aceptor de azufre. Se obtuvo LmMST pura y con actividad enzimática, que no varió en presencia del inhibidor I3MT-3. La LmMST fue capaz catalizar la oxidación de roGFP2 en presencia de 3-MP. Los estudios cinéticos mostraron que la velocidad aumenta con la concentración de enzima y de 3-MP, aunque se vio limitada por una velocidad máxima de 4.0×10^{-8} M s⁻¹. Por otro lado, el GSH interfirió con la oxidación de la roGFP2 por LmMST y 3-MP, mientras que el tiosulfato en las condiciones de trabajo no lo hizo. Los resultados plantean dudas de si el tiosulfato es un sustrato para la LmMST y sobre cuál era la especie responsable de la oxidación de la roGFP2. A su vez, se determinó que el H_2S_2 es capaz de oxidar a la roGFP2 rápidamente sin la asistencia de ninguna enzima. En suma, se podría generar un biosensor con LmMST y roGFP2 para detectar 3-MP, aunque aún no se comprende el mecanismo. En este sentido, este trabajo ha servido de puntapié para realizar investigaciones dedicadas a estudiar su funcionamiento en profundidad.

4. Discusión global, conclusiones y perspectivas

Los persulfuros cumplen roles fundamentales en procesos de biosíntesis, catabolismo y señalización. Tienen una química muy versátil que es explotada en los mecanismos catalíticos de varias enzimas y que puede ser aprovechada para proteger a los tioles proteicos en condiciones de estrés oxidativo. A pesar de que las investigaciones sobre persulfuros se iniciaron en la década de los sesenta, el interés en las últimas décadas ha crecido enormemente, principalmente impulsado por considerárselos candidatos para la transducción de los efectos beneficiosos del H₂S. Los trabajos sobre persulfuros de los últimos años se han dedicado mayoritariamente a estudiar su participación e implicancia en procesos fisiológicos. Debido al creciente interés, también se han desarrollado métodos de detección, se han sintetizado moléculas dadoras de persulfuros y se ha avanzado en la comprensión de algunos aspectos de su reactividad biológica. No obstante, propiedades químicas de los persulfuros están escasamente las caracterizadas. Bajo la influencia del actual fervor en la investigación de persulfuros, se observa una tendencia a llevar a cabo estudios complejos sin una comprensión sólida de sus aspectos fundamentales. Varios de estos estudios adoptan supuestos o subestiman limitaciones experimentales inherentes al trabajo con los persulfuros, comprometiendo la integridad de los resultados y, como consecuencia, ralentizando el desarrollo del área o, peor aún, llegando a conclusiones incorrectas. La falta de conocimiento sobre las propiedades fundamentales de los persulfuros también dificulta la comprensión de los mecanismos bioquímicos en los que se ven involucrados. Esta carencia motivó la investigación de algunas propiedades bioquímicas de los persulfuros en esta tesis, con el fin de contribuir a su entendimiento.

Los estudios con persulfuros de bajo peso molecular se enfrentaron a barreras experimentales relacionadas a su estabilidad que tuvieron que ser superados antes de abordar el análisis de las propiedades fundamentales. Los intentos fallidos de aislar persulfuros de bajo peso molecular indicaron la imposibilidad de purificarlos en medio acuoso debido a su alta reactividad, resultando en la necesidad de utilizar mezclas como fuentes de

persulfuros. La incubación de GSSG en medio alcalino no resultó conveniente para generar preparados de GSSH, pues se estableció que la cinética de formación es relativamente lenta ($\sim 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), que la mezcla no alcanza un equilibrio y que se forman varias especies adicionales que podrían intervenir con experimentos posteriores por poseer una reactividad similar, como otros compuestos con azufre sulfano (GSSSH, GSSSG, posiblemente H_2S_2) y GSH (3.1). En contraste, las mezclas de GSSG (en exceso estequiométrico) con H_2S a pH 7.4 demostraron ser útiles como fuente de GSSH, ya que alcanzan un equilibrio permaneciendo constantes las concentraciones de las especies involucradas, incluyendo GSSH. Una observación importante de estos experimentos es que la concentración de GSSH que se forma es subestequiométrica, a diferencia de lo que se asume en varios artículos [52-54]. De hecho, las concentraciones de GSH en el equilibrio fueron significativamente mayores que las de GSSH. Esto se debió a que estas mezclas establecen un segundo equilibrio donde reaccionan el GSSH y el GSSG remanente para formar GSH y GSSSG, consistente con lo reportado por otros grupos [58,119]. El hecho de que las mezclas tengan un exceso de GSSG respecto a H₂S promueve esta reacción secundaria y limita la magnitud de otras reacciones que llevarían a la formación de polisulfuros de hidrógeno. Por lo tanto, aunque no se descarta que las especies formadas puedan seguir reaccionando para producir polisulfuros mayores, se puede concluir que las mezclas contienen principalmente GSSG, H₂S, GSH, GSSH y GSSSG, y que son útiles para ser usadas como fuente de GSSH una vez alcanzado el equilibrio (3.2).

En cuanto a los métodos utilizados para cuantificar GSSH en las mezclas, la caracterización de la reacción de GSSG y HO⁻ nos alertó de los sesgos que pueden ocurrir en el método de cianólisis fría cuando las mezclas a analizar contienen disulfuros, ya que involucra una etapa de incubación a pH alcalino durante la cual se pueden formar sulfanos artefactualmente. Se demostró que este sesgo puede ser corregido si todas las muestras se incuban en medio alcalino durante el mismo período de tiempo, incluyendo un control del disulfuro en agua que luego se resta (3.1). De todas maneras, incluso contemplando estas consideraciones, la cianólisis fría no sirve para determinar la concentración exacta de persulfuros, ya que cuantifica azufre

130

sulfano total. En un contexto donde la mayoría de los métodos de detección se enfocan en persulfuros proteicos y donde los métodos para cuantificar persulfuros de bajo peso molecular no son específicos, fue necesario desarrollar un método preciso y confiable que permitiera cuantificar GSSH en medio acuoso en una mezcla de especies. Por lo tanto, se adaptaron métodos de HPLC basados en la derivatización con mBrB que permitieron cuantificar el GSSH en mezclas además de GSSG, GSH y H₂S (3.1 y 3.2). La fortaleza de este método fue afirmada posteriormente en la literatura por la verificación de la estabilidad de los productos formados con mBrB en comparación con otros métodos de alquilación [64].

Una vez superados los desafíos técnicos relacionados a la preparación y cuantificación de los persulfuros de bajo peso molecular, se comenzaron a caracterizar sus propiedades. Se determinó el p K_a de seis persulfuros de bajo peso molecular incluyendo persulfuros de relevancia biológica, como GSSH y CysSSH (3.2 y 3.3). Todos los persulfuros presentaron menor pK_a que los tioles correspondientes. Si bien esto es asumido en la literatura, este trabajo proporciona evidencia experimental que lo demuestra. A su vez, resultados computacionales de nuestros colaboradores mostraron que la mayor acidez se debe a que el enlace S-H en los persulfuros es más débil que en los tioles (3.2).

En cuanto a la reactividad electrofílica de los persulfuros de bajo peso molecular, se exploró la reacción de CysSSH y GSSH frente a GSH. En ambas reacciones se observó formación de H₂S, indicando que el ataque de un tiol de bajo peso molecular sobre un persulfuro de bajo peso molecular ocurre sobre el azufre interno preferencialmente (3.1 y 3.2). Para la reacción de GSSH con GSH se determinó una constante cinética de 1.11 M⁻¹ s⁻¹ (pH 7.4, 25 °C) (3.2).

En relación con los persulfuros como nucleófilos, se caracterizó la cinética de las reacciones de GSSH con dos electrófilos de relevancia fisiológica, peroxinitrito y H_2O_2 , así como las de seis persulfuros de bajo peso molecular con el agente alquilante mBrB. Las constantes cinéticas de estas reacciones resultaron mayores que las que se esperan para los tioles con igual p K_a según los gráficos de Brønsted, constatando un efecto alfa en los

persulfuros respecto a los tiolatos, cuya magnitud depende del electrófilo (3.2 y 3.3). Aunque el efecto alfa en compuestos con azufre se sugiere habitualmente en la literatura, no se disponía de datos sólidos que lo confirmaran. La mayor reactividad nucleofílica de los persulfuros con hidroperóxidos respecto a los tioles es coherente con el rol protector sugerido para los persulfuros en un contexto de estrés oxidativo (ver 1.4.3).

Los resultados obtenidos muestran que, a pH fisiológico, la mayor nucleofilia de los persulfuros de bajo peso molecular con respecto a los tioles estructuralmente análogos se debe a la mayor disponibilidad de la especie ionizada y, dependiendo del electrófilo, al efecto alfa.

Se observaron valores similares de acidez (p $K_a = 4.6-6.3$) y de nucleofilia ($k_{ind mBrB} = 3.2-9.0 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$) para los distintos persulfuros de bajo peso molecular, sugiriendo que los sustituyentes de los persulfuros ejercen un efecto menor en las propiedades bioquímicas respecto a los tioles por estar a mayor distancia del azufre externo (3.2 y 3.3).

La baja disponibilidad de persulfuros protonados junto con la alta reactividad nucleofílica no parecería compatible con que los persulfuros fisiológicos tengan una reactividad electrofílica. Sin embargo, usando la SQR y rodanesa como modelos, se demostró que la acidez de estos persulfuros es modulada por los entornos proteicos facilitando su rol electrofílico. Por lo tanto, se concluye que los valores de pK_a de los persulfuros de bajo peso molecular no pueden ser extrapolados a los persulfuros proteicos (3.3).

Como se explicó previamente, hay disputas sobre cuáles son los sustratos biológicos de la SQR y la rodanesa. Las teorías actuales debaten sobre si el GSH o el sulfito actúan como aceptores de la SQR, y si el GSSH o el tiosulfato sirven como donadores para la rodanesa, existiendo una inclinación hacia la preferencia por el GSH y el GSSH, respectivamente (Figura 3, 1.6.2). Los resultados de esta tesis sugieren que algunos de los experimentos que respaldaron estas hipótesis presentaban inconvenientes técnicos, lo cual afecta la interpretación de los resultados y, por lo tanto, la comprensión de las rutas metabólicas. Por ejemplo, en algunos de los ensayos se sobreestimó la concentración de persulfuro mientras que en otros se subestimó, ya que se empleó el método de cianólisis fría para

cuantificar GSSH en mezclas con GSSG (3.1), así como se asumió que el GSSH, CysSSH o HcySSH, en presencia de los tioles correspondientes, forman cantidades estequiométricas de H₂S (3.2) [43,170]. A su vez, en los experimentos donde se determinaron los parámetros cinéticos de la rodanesa humana que se citan en la literatura actual [170], no se contempló la inhibición por tiosulfato llevando a obtener valores incorrectos de K_m de cianuro (3.3). Se puede concluir que la información disponible no permite elucidar del todo las rutas metabólicas de estas enzimas. En este sentido, los experimentos de cinética preestacionaria con rodanesa de esta tesis, primeros en su tipo, permitieron monitorear las semirreacciones con distintos sustratos de manera independiente (3.3), y sirven de puntapié para ahondar en la determinación de su sustrato preferido. Por ejemplo, con la técnica de fluorescencia intrínseca (3.3) se podría seguir la cinética de rodanesa persulfuro con GSH, así como la de rodanesa tiol con GSSH (formado a partir de GSSG y H_2S) de manera directa y continua. De hecho, la reciente aprobación de un proyecto Fondo Clemente Estable centrado en la rodanesa con la Dra. Alvarez como responsable, facilitará la realización de estos experimentos, cuyo diseño ha quedado planteado en esta tesis.

Finalmente, se buscó aprovechar la reactividad de los persulfuros que se forman en la rodanesa y la *Lm*MST para desarrollar biosensores para detectar GSSH y 3-MP, respectivamente. El fundamento de los sensores se basa en que dichos persulfuros sean capaces de oxidar a la roGFP2 generando un cambio de fluorescencia. La rodanesa humana no logró oxidar a la roGFP2. En contraposición, la *Lm*MST podría llegar a servir para generar un sensor de 3-MP, aunque el mecanismo por el cual la roGFP2 es oxidada parece ser más complejo del planteado inicialmente (3.4). Los resultados con *Lm*MST sirven de disparador para ahondar en la comprensión del mecanismo por el cual funciona el biosensor, así como en los mecanismos involucrados en la catálisis de las MSTs en general, dado que se ha postulado más de un mecanismo catalítico (Figura 32, Figura 33). En efecto, el entendimiento de estos mecanismos está siendo abordado en el marco de la tesina del Bach. Ríos con la orientación del Dr. Cuevasanta.

En conclusión, en esta tesis se caracterizó la acidez y reactividad de algunos persulfuros biológicos, proporcionando evidencia experimental para la

mayor acidez de los persulfuros de bajo peso molecular, la modulación de esta acidez por los entornos proteicos y el efecto alfa que presentan los persulfuros. Se hicieron aportes en cuanto a la preparación y detección de persulfuros, especialmente se alertó sobre los sesgos que pueden ocurrir en el método de cianólisis fría. Adicionalmente, se evaluó la aplicación de su reactividad para generar biosensores. En suma, en este trabajo se sentaron fundamentos sólidos sobre los persulfuros, basados en principios termodinámicos y cinéticos, que se espera que contribuyan a la comprensión de sus roles biológicos.

Anexos

Anexo I: Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method

Anexo II: Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide

Anexo III: Acidity of persulfides and its modulation by the protein environments in sulfide quinone oxidoreductase and thiosulfate sulfurtransferase

Anexo IV: Autorización de coautores para realizar una tesis por compendio de artículos

Anexo V: Actividades adicionales durante el desarrollo de la tesis

Anexo I. Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method

Artículo publicado en Free. Radic. Biol. Med. en 2023

<u>Benchoam D.</u>, Cuevasanta E., Semelak J.A., Mastrogiovanni M., Estrin D.A., Möller M.N., Alvarez B.



Contents lists available at ScienceDirect

Free Radical Biology and Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/freeradbiomed



Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method

Dayana Benchoam^{a,b,c}, Ernesto Cuevasanta^{a,b,d}, Jonathan A. Semelak^e, Mauricio Mastrogiovanni^{b, f}, Darío A. Estrin^e, Matías N. Möller^{b, g}, Beatriz Alvarez^{a, b, *}

^a Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 11400, Uruguay

Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay

² Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

^d Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 11400, Uruguay

e Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires,

Ciudad Universitaria, Pabellón 2, Buenos Aires, 1428, Argentina

^f Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, 11800, Uruguay

^g Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, 11400, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords. Disulfide Glutathione disulfide Persulfide Glutathione persulfide Dehvdroalanine Sulfane sulfur β-elimination Kinetics Cold cyanolysis

ABSTRACT

It is well established that proteins and peptides can release sulfur under alkaline treatment, mainly through the β-elimination of disulfides with the concomitant formation of persulfides and dehydroalanine derivatives. In this study, we evaluated the formation of glutathione persulfide (GSSH/GSS⁻) by exposure of glutathione disulfide (GSSG) to alkaline conditions. The kinetics of the reaction between GSSG and HO⁻ was investigated by UV-Vis absorbance, reaction with 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), and cold cyanolysis, obtaining an apparent second-order rate constant of $\sim 10^{-3}$ M⁻¹ s⁻¹ at 25 °C. The formation of GSSH and the dehydroalanine derivative was confirmed by HPLC and/or mass spectrometry. However, the mixtures did not equilibrate in a timescale of hours, and additional species, including thiol and diverse sulfane sulfur compounds were also formed, probably through further reactions of the persulfide. Cold cyanolysis is frequently used to quantify persulfides, since it measures sulfane sulfur. This method involves a step in which the sample to be analyzed is incubated with cyanide at alkaline pH. When cold cyanolysis was applied to samples containing GSSG, sulfane sulfur products that were not present in the original sample were measured. Thus, our results reveal the risk of overestimating the amount of sulfane sulfur compounds in samples that contain disulfides due to their decay to persulfides and other sulfane sulfur compounds at alkaline pH. Overall, our study highlights that the β-elimination of disulfides is a potential source of persulfides, although we do not recommend the preparation of GSSH from incubation of GSSG in alkali. Our study also highlights the importance of being cautious when doing and interpreting cold cyanolysis experiments.

1. Introduction

By the time that the word "protein" was coined almost two centuries ago, it was already observed that proteins release sulfur under alkaline treatment [1]. Later on, it was understood that the alkali-labile sulfur came from disulfides formed between two cysteine residues [2,3], and that the exposure of disulfide-containing peptides and proteins to alkaline conditions can give rise to several products including hydrogen sulfide (H₂S), dehydroalanine, sulfenic acid, the thioether lanthionine, and, of particular relevance for this study, persulfide $(RSSH/RSS^{-})^{1}$ [4].

The decay of disulfides in alkaline pH can be mediated by several processes [3,5] (Scheme 1). In the case of alkyl disulfides such as those present in peptides and proteins, the main process involved is the β -elimination of the disulfide. This implicates the abstraction of a proton from the carbon in the β -position to a sulfur (which confoundingly

E-mail address: beatriz.alvarez@fcien.edu.uy (B. Alvarez).

https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.07.006

Received 31 May 2023; Received in revised form 30 June 2023; Accepted 5 July 2023 Available online 6 July 2023

0891-5849/© 2023 Elsevier Inc. All rights reserved.

^{*} Corresponding author. Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá 4225, Montevideo, 11400, Uruguay.

¹ The protonated species is hydropersulfide (RSSH), and the IUPAC names are hydridodisulfide, disulfanyl, or dithiohydroperoxide. The deprotonated species is persulfide anion (RSS'). Herein, the terms "RSSH" and "persulfide" are used for the mixture of RSSH and RSS' in aqueous solution, unless specified.

Abbreviations		GS-CAM IAM derivative of GSH		
		GSS-CAN	M IAM derivative of GSSH	
RSH	thiol	GSSS-CAM IAM derivative of GSSSH		
RSSH	persulfide	mBrB	monobromobimane	
RSOH	sulfenic acid	GS-B	mBrB derivative of GSH	
GSH	glutathione	GSS-B	mBrB derivative of GSSH	
GSSH	glutathione persulfide	B-S-B	mBrB derivative of H ₂ S	
GSSG	glutathione disulfide	B-SS-B	mBrB derivative of H ₂ S ₂	
GSSSG	glutathione trisulfide	DTNB	5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)	
GSSSH	glutathione hydrotrisulfide	TNB	5-thio-2-nitrobenzoic acid	
DHG	dehydroalanine derivative of GSH	TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphine	
GS(O)SG	thiosulfinate derivative of GSSG	LMW	low molecular weight	
IAM	iodoacetamide	ESI	electrospray ionization	
CAM	carboxyamidomethyl	$k_{ m obs}$	observed exponential rate constant	

happens to be the carbon usually denominated α -carbon in cystine derivatives) to form persulfide and dehydroalanine derivatives (Scheme 1i). Another possible process is the hydrolysis of the disulfide bond through the S_N2 attack of HO⁻ on the disulfide forming sulfenic acid (RSOH/RSO⁻) and thiolate (RSH/RS⁻) (Scheme 1ii). This substitution mechanism occupies a secondary role in peptide and protein disulfide degradation [4,6]. However, 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Ellman's reagent), an aromatic disulfide that lacks eliminable protons, decays mainly in this way [7]. Last, α -elimination involving the abstraction of a proton in α -position to a sulfur (Scheme 1iii) rarely occurs in peptides and proteins. One disulfide in which this process can happen is dithiodiglycolic acid, in which there are no protons in the β -position [6].

Persulfides belong to the group of sulfane sulfur compounds. This term refers to molecules that contain sulfur bound to either two sulfur atoms or to a sulfur and an ionizable hydrogen, as in the case of the external sulfur in persulfides [8]. Persulfides are key intermediates in the process of mitochondrial oxidation of H₂S, and they participate in the biosynthesis of iron sulfur clusters and other cofactors. In addition, they have been proposed to have a role as transducers of the signaling effects of H₂S [9]. Persulfides can be synthesized by H₂S–dependent and –independent processes. For example, they can be formed from the

reaction of H_2S with disulfides, which gives persulfides and thiols (Equation (1)). Persulfides have a very rich chemistry. They are more acidic than thiols. The anion has high nucleophilicity, due, in part, to the alpha effect, *i.e.*, the increased reactivity of a nucleophile when the neighboring atom has high electron density [10,11]. Persulfides also have electrophilic character. Therefore, they can react with themselves. Last, persulfides are excellent one-electron reductants [12].

$$RSSR + HS^- \rightleftharpoons RS^- + RSSH \tag{1}$$

Among several approaches with different specificities [13,14], a frequently used technique for the quantification of persulfides is cold cyanolysis. The method is based on the nucleophilic attack of cyanide (CN⁻) on persulfides to form thiocyanate (SCN⁻) at room temperature; this first step is performed at alkaline pH to favor the reaction (Equation (2)). The thiocyanate produced can be detected upon the addition of ferric ions, as they react with thiocyanate to form the red complex ferric thiocyanate (Fe(SCN)²⁺), which absorbs at 460 nm (Equation (3)); this second step is performed at acidic pH and in the presence of formaldehyde to consume the remaining cyanide. In addition to persulfides, other sulfane sulfur compounds such as polysulfides (RSS_nSR, RSS_nSH and HS_nSH, n \geq 1), thiosulfonates (RSO₂S⁻) and polythionates (°O₃S-S_n-SO₃) can also give positive results with the cold cyanolysis method [8]. It is



Scheme 1. Possible pathways of disulfides decay in alkaline solution.



Scheme 2. Reaction of GSSG with HO⁻ to give GSSH, DHG and water. Note that at moderate/high alkaline pH, GSSG has four negative charges and GSSH is in the anionic form (GSS⁻).

worth noting that, in many cases, disulfides are also present in mixtures analyzed by cold cyanolysis, particularly when they are used as starting points in persulfide preparation [15–17].

 $RSSH + CN^{-} \rightarrow RS^{-} + SCN^{-} + H^{+} \text{ (at alkaline pH)}$ (2)

$$SCN' + Fe^{5+} \rightleftharpoons Fe(SCN)^{2+}$$
 (at acidic pH) (3)

The tripeptide glutathione (γ -glutamylcysteinylglycine, GSH) is very abundant in most cell types. Its persulfide derivative (GSSH) has been proposed to be a product of the mitochondrial enzyme sulfide quinone oxidoreductase [18]. In addition, GSSH is substrate of persulfide dioxygenase (also called ETHE1) [15,19] and rhodanese [18,19]. The concentration of GSSH in mouse liver tissue has been estimated to be $\sim 7 \,\mu$ M [20]. Previous work from our group, in which mixtures containing GSSH were prepared by the incubation of glutathione disulfide (GSSG) with H₂S (Equation (1)), revealed that GSSH has a pK_a of 5.45, which is 3.49 units lower than GSH [11].

According to previous reports, the main decay pathway for GSSG in alkaline solution appears to be β -elimination (Scheme 1i), with formation of the persulfide (GSS⁻) and the dehydroalanine derivative (γ -glutamyldehydroalanylglycine, abbreviated DHG) (Scheme 2) [4,6,21–23].

Due to the increasingly recognized relevance of persulfides, and of GSSH in particular, it is relevant to count with methods for GSSH preparation. A method based on the incubation of the disulfide under alkaline conditions would have the potential advantage of avoiding the formation of large amounts of the thiol (Scheme 2), in contrast to methods involving the mixture of the disulfide with H_2S to yield the persulfide and the thiol (Equation (1)) [10,11]. With this in mind, we characterized the formation of persulfide from the decay of GSSG in alkaline solution.

1. Reaction of GSSH with GSSG

GSS⁻ + GSSG 🗢 GSSSG + GS⁻

2. Reaction of GSSH with another GSSH



3. Some of the further possible reactions

 $GS^- + GSSH \rightleftharpoons GSSG + HS^ GSS^- + GSSSG \rightleftharpoons GSSSSG + GS^ GS^- + GSSSSG \rightleftharpoons GSSG + GSSS^-$

Scheme 3. Subsequent reactions of the GSSH formed by GSSG in NaOH. Plausible reactions of GSSH include the reactions with GSSG (in excess) (1) and with a second GSSH with nucleophilic attacks at both sulfur atoms (2). Moreover, the reactants and products of these reactions could undergo further reactions (3).

2. Materials and methods

2.1. Solutions and mixtures

Alkaline mixtures were prepared by incubating 12 mM GSSG (Appli-Chem) in 100-300 mM NaOH (AppliChem) at 25 °C. The concentration of HO⁻ was corrected for the release of four protons per GSSG molecule, 52-252 mM, respectively. For UV-Vis kinetic experiments, NaOH solutions were freshly prepared in ultrapure water and titrated with oxalic acid. Solutions of hydrogen peroxide (H₂O₂, Baker) were prepared in ultrapure water and quantified by absorbance at 240 nm ($\varepsilon_{240} = 39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [24, 25]. Concentrated stocks of DTNB (AppliChem) (20 mM) were prepared in ethanol. Concentrated stocks of monobromobimane (mBrB, Sigma-Aldrich) (50 mM) were prepared in acetonitrile; dilutions in water or buffer were quantified by absorbance at 396 nm ($\varepsilon_{396} = 5300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [26]. Solutions of tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP, Sigma-Aldrich) were prepared in distilled water. Solutions of H₂S were prepared from crystals of Na₂S·9H₂O (Carlo Erba) the day of the experiment; they were washed with distilled water and dissolved in ultrapure water. Solutions and mixtures containing H₂S were manipulated with gas-tight Hamilton syringes and prepared in sealed vials.

2.2. Kinetics by UV-Vis absorbance

The reaction of GSSG (12 mM) with NaOH (52-252 mM, final concentrations) was followed by UV–Vis absorbance in a Varian Cary 50 spectrophotometer. Kinetic spectra were recorded up to 2 h at 25 °C and the time courses at 335 nm were analyzed. Moreover, the reaction of GSSH-containing alkaline mixtures with H_2O_2 was studied by preincubating GSSG with 52 mM NaOH for 1 h. Then, aliquots were 4.5-fold diluted and reacted with 2.5 mM H_2O_2 in 0.5 M Tris buffer with HCl, final pH of 7.5 and 25 °C, for 30 min. Data were analyzed with the software OriginPro 8.6.

2.3. Reaction of alkaline GSSG with DTNB

The formation of nucleophilic compounds by the reaction of GSSG (12 mM) with NaOH (52 mM) was followed by reaction with DTNB. Aliquots from the alkaline mixture were taken at increasing times; they were 50-fold diluted and reacted with 0.4 mM DTNB in 0.5 M Tris buffer, pH 7.4 and 25 °C. Formation of the thiol 5-thio-2-nitrobenzoic acid (TNB) was measured immediately by absorbance at 412 nm ($\varepsilon_{412} = 14,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) [27]. Controls of NaOH alone were done under the same conditions and subtracted. In addition, in alkaline mixtures that had reacted for 110-134 min, the pH was lowered by dilution in 0.5 M Tris buffer with HCl, pH 7.4, and the decay of nucleophilic species was studied by reaction with DTNB as before.

2.4. Mass spectrometry

Mixtures of GSSG (12 mM) in NaOH (52 mM) were incubated for 1.5 h. Aliquots were 2-fold diluted in 0.5 M Tris/acetic acid buffer, final pH 7.4. Alternatively, aliquots were diluted as before and exposed to 10 mM H_2O_2 during 15 min. Samples were mixed with 37 mM

iodoacetamide (IAM, Sigma) to block persulfides and other nucleophilic sulfur species. The derivatized samples were submitted to a solid phase extraction step using a SPE Chromabond Drug II column (Macherey Nagel). Then, samples were analyzed by direct infusion into a hybrid triple-quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (QTRAP4500, AB Sciex). For molecular ion identification, Q1 mode was employed in positive mode, electrospray voltage and declustering potential were set to 5.0 kV and 50 V, respectively, and the scan speed was set to 1000 Da/ s. Fragmentation experiments were performed in the Product Ion mode with a collision energy of 35 V. Data were acquired and analyzed with the software Analyst 1.6.2.

2.5. Reversed-phase HPLC of mBrB derivatives

Reversed-phase chromatography experiments were performed on a 1260 Infinity HPLC instrument (Agilent) with a diode array UV-Vis absorbance detector and a ZORBAX Eclipse Plus C18 column (100 imes 4.6 mm, 3.5 µm, Agilent). GSSG (12 mM) was incubated in NaOH (52 mM) at 25 °C, and after 75 min, samples were cooled, and aliquots were 10fold diluted in 50 mM ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, 25 °C, containing 1 mM mBrB. Alternatively, aliquots were diluted and derivatized with 0.1 mM mBrB (10 min), then, reduced with 0.5 mM TCEP (10 min), and finally, derivatized again with 0.9 mM mBrB (10 min); the overall dilution was 30-fold. The derivatized dilutions were injected. Elution was carried out with a gradient of 50 mM ammonium bicarbonate, pH 7.8:acetonitrile (100:0 from 0 to 2 min, 60:40 from 8 to 10 min) at a flow rate of 0.8 mL/min. Chromatograms at 396 nm corresponding to the mBrB derivatives were used. The concentrations of GSH and H₂S were determined by measuring the area under the peaks and comparing with calibration curves of standards. The calibration curve for GSH (Acros) was used to quantify GSSH, considering the same absorptivity of the derivatives due to the bimane moieties.

2.6. Cold cyanolysis

The reaction of GSSG (12 mM) with NaOH (52 mM) was also studied by the cold cyanolysis method. Aliquots taken at increasing times were 16-fold diluted in water and exposed to 80 mM NH₄OH (Sigma-Aldrich) and 50 mM KCN (Biopack) at room temperature during 5-115 min depending on the sample. Reactions were stopped by addition of 0.6% formaldehyde (Biopack) and 10 mM FeCl₃·6H₂O (Sigma-Aldrich) in 2.8% HNO₃ (Dorwil), final concentrations. Absorbances at 460 nm were registered and interpolated in calibration curves of KSCN (Sigma) made the same day and under the same conditions [8]. Controls of GSSG in water and NaOH alone were done under the same conditions. Alternatively, cold cyanolysis was done to mixtures of 16.7 mM H₂S and 3.35 mM GSSG preincubated for 30 min in 0.5 M Tris buffer, at pH 7.4 and 25 °C. In these experiments, the samples were incubated with NH₄OH and KCN for variable times, from 5 to 55 min.

3. Results

3.1. GSSG forms persulfide at alkaline pH

The formation of GSSH from GSSG incubated in NaOH was studied by several approaches. We first studied the kinetics of the reaction between GSSG (12 mM) and varying concentrations of NaOH (52-252 mM) by UV–Vis absorption spectroscopy, following the increase at 335 nm characteristic of persulfides [28–30] in a timescale of minutes (Fig. 1A). Exponential plus linear functions were fitted to the kinetic traces, obtaining observed rate constants (k_{obs}) for each concentration of NaOH (Fig. 1B). The exponential phases were attributed to GSSH formation, while the linear phases were probably due to the secondary formation of hydrogen persulfide and higher order polysulfides (HS_nSH, RSS_nSR and RSS_nSH, n \geq 1). The k_{obs} increased linearly with the concentration of NaOH, yielding an apparent second-order rate constant of 0.38 \pm 0.05 M⁻¹ min⁻¹ ((6.3 \pm 0.8) \times 10⁻³ M⁻¹ s⁻¹), at 25 °C (Fig. 1C).

As further proof that the change in UV-Vis absorbance is indicative of GSSH formation, and given that persulfides react with H_2O_2 [11], we studied the reaction of alkaline GSSG with H₂O₂. Accordingly, when GSSG (12 mM) was preincubated for 1 h in NaOH (52 mM) and a 4.5-fold dilution was reacted with excess H₂O₂ at pH 7.5 and 25 °C, the absorbance decreased (Fig. 2A). Kinetic traces at 335 nm were biphasic (Fig. 2B). A first fast phase with a k_{obs} of $1.31 \pm 0.04 \text{ min}^{-1}$ was obtained, from which a second-order rate constant of 8.7 \pm 0.2 $M^{\text{-1}}$ s^{\text{-1}} was calculated. This is consistent with the reaction of GSSH with H₂O₂ to form GSSOH and water (7.5 \pm 0.6 M⁻¹ s⁻¹ at pH 7.02, 25 °C [11]). Considering that secondary reactions of GSSH might generate GSH, we confirmed that the fast phase did not account for reaction with GSH. A rate constant between GSH and H₂O₂ of 1.2 M⁻¹ s⁻¹ (pH 7.5, 25 °C) was measured through reaction with DTNB (Fig. S1), in agreement with published data [31]. Although the anion GS⁻ has higher intrinsic reactivity with H₂O₂ than GSS⁻ [11], at pH 7.5 the persulfide has a higher rate constant because of the increased availability of the ionized species (the pKa of GSSH is 5.45 while that of GSH is 8.94) [11,31]. Of note, with respect to a thiolate with a similar pK_a (5.45), GSS⁻ presents higher intrinsic reactivity due to the alpha effect [11].

An additional approach to examine the proposed reaction between GSSG and HO⁻ to form GSSH consisted in measuring the formation of nucleophilic compounds. GSSG was incubated at alkaline pH (52 mM NaOH), and aliquots taken at increasing times were mixed with the disulfide DTNB in excess, at pH 7.4 and 25 °C. The formation of the yellow thiol TNB by the reaction of DTNB with nucleophiles was calculated from the absorbance at 412 nm. Exponential plus linear functions were fitted to the time courses of formation of DTNB-reactive products (Fig. 3). The k_{obs} of the exponential phase, which could correspond to the formation of GSSH, was $(3.3 \pm 0.5) \times 10^{-2}$ min⁻¹. A second-order rate constant of $(11 \pm 2) \times 10^{-3}$ M⁻¹ s⁻¹ was calculated, which is relatively similar to the one determined by the increase in absorbance at 335 nm,



Fig. 1. Kinetics of GSSG decay at alkaline pH by UV–Vis absorption. GSSG (12 mM) was incubated with NaOH (52-252 mM) at 25 °C. (A) Absorbance spectra of GSSG with 52 mM NaOH were registered each 1 min until 60 min and each 5 min until 120 min. (B) Time courses of the absorbance increase at 335 nm. The solid traces represent the fits of exponential plus straight line equations. (C) k_{obs} against concentration of NaOH yielded an apparent second-order rate constant of 0.38 \pm 0.05 M⁻¹ min⁻¹ (slope \pm error of the fit, data from two independent experiments).



Fig. 2. Reaction of GSSH with H₂O₂. GSSH was formed by preincubating GSSG (12 mM) with NaOH (52 mM) for 1 h at 25 °C. An aliquot was 4.5-fold diluted and reacted with 2.5 mM H₂O₂ in 0.5 M Tris buffer, at a final pH of 7.5 and 25 °C. (A) Absorbance spectra registered each 7.2 s for 17 min and each 1 min afterwards. (B) Time course at 335 nm. The red trace represents the fit of a double exponential equation with k_{obs} of 1.31 \pm 0.04 and 0.079 \pm 0.002 min⁻¹ (parameters \pm errors of the fit).



Fig. 3. Formation of DTNB-reactive compounds from GSSG and NaOH. GSSG (12 mM) was mixed with NaOH (52 mM) at 25 °C. Aliquots were 50-fold diluted and reacted with 0.4 mM DTNB in 0.5 M Tris buffer at pH 7.4 and 25 °C. The concentration of the yellow thiol TNB was calculated from the absorbance at 412 nm and corrected by dilution. The black circles and the red trace correspond to a representative experiment. The fits of exponential plus line functions yielded a $k_{\rm obs}$ of 0.033 \pm 0.005 min⁻¹ (mean \pm mean of the errors, two independent experiments).

 $(6.3 \pm 0.8) \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 1C).

3.2. Mass spectrometry analyses reveal the formation of GSSH and DHG, as well as thiol and trisulfide derivatives

The mixtures of GSSG and NaOH were analyzed by electrospray ionization (ESI) MS after alkylation with IAM. This treatment introduces a carboxyamidomethyl (CAM) group to the nucleophilic sulfur compounds, increasing the mass by 57.07 Da. Peaks consistent with GSS-CAM (m/z 397.1 Da) and DHG (m/z 274.1) were detected (Fig. 4A), confirming the β -elimination process shown in Scheme 1i. GSSG and GSSSG (glutathione trisulfide) were detected both as the singly and doubly charged species. Peaks corresponding to GS-CAM and GSSS-CAM (derivatives of GSH and of the hydrotrisulfide GSSSH, respectively) were also present. Although the detection of GS-CAM agrees with previous observations regarding the partial conversion of GSS-CAM to GS-CAM [32], formation of GSH in the alkaline solution could also account for

the detection of GS-CAM. In fact, the detection of GSSS-CAM and GSSSG proves secondary reactions of GSSH that would also yield GSH.

No derivatized sulfenic acid (GS(O)-CAM) could be detected. The thiosulfinate (GS(O)SG), which is the product expected from the condensation of two sulfenic acids, was observed as singly and doubly charged species. This suggests that hydrolysis (Scheme 1ii) may constitute an additional pathway for GSSG decay. However, considering the similarities in the ionizing groups and the intensities of DHG and GSS-CAM *m*/*z* peaks compared to that of GS(O)SG, hydrolysis appears to be minor. Of note, the lanthionine thioether derivative expected from the reaction of DHG with GSH [33] was not detected (*m*/*z* = 581.2). Besides, the peaks corresponding to GS-CAM, GSS-CAM and GSSS-CAM could not be observed when samples were treated with 10 mM H₂O₂ for 15 min before alkylation. In contrast, GSSG, GSSG, GS(O)SG and DHG could still be observed (Fig. S2).

The identities of GSS-CAM and DHG were confirmed by MS/MS; the fragmentation patterns were consistent with the structures proposed (Fig. 4B). Overall, the MS results confirm the decay of GSSG in alkaline solution to form GSSH and DHG (Scheme 2), and evidence the formation of additional products from further reactions of GSSH.

3.3. HPLC experiments show comparable concentrations of GSH and GSSH, and formation of H_2S

To accurately determine the concentration of GSSH formed by GSSG at alkaline pH, reversed-phase HPLC experiments were carried out. We performed a method based on mBrB derivatization where GSSH, GSH and H_2S react with excess mBrB to form the derivatized species GSS-B, GS-B and B-S-B, respectively, similar to the one used previously [11]. The mBrB derivatives present high stability [32]. Standards of GS-B and B-S-B were prepared and used to assign the corresponding peaks (retention times of 5.9 and 9.2 min, respectively), and to construct calibration curves at 396 nm.

An aliquot of GSSG (12 mM) incubated with NaOH (52 mM) for 75 min was diluted in ammonium bicarbonate buffer, pH 7.8, 25 °C, derivatized with excess mBrB and analyzed by HPLC. Peaks corresponding to GSS-B, GS-B and B-S-B were observed (Fig. 5), representing 0.70 mM of GSSH, 0.77 mM of GSH and 0.22 mM of H₂S in the original mixture. The identity of the peak ascribed to GSS-B (retention time of 6.4 min) was verified by ESI-MS and MS/MS. The concentration of GSS-B was quantified using the calibration curve for GS-B, based on the assumption of similar absorptivities at 396 nm due to the presence of the bimane moiety.

When a derivatized aliquot was reduced with excess of the reductant TCEP and again derivatized with mBrB in excess, as expected, the peak corresponding to GSS-B disappeared, while those of GS-B and B-S-B increased, representing 17.81 and 1.69 mM, respectively, in the concentrated mixture (Fig. 5). Note that the high concentration of GSH also includes the reduction of GSSG. The amounts of B-S-B detected are consistent with sulfane sulfur being present in other forms besides GSSH. An additional small peak (retention time of 9.5 min) was observed in the derivatized sample and disappeared with reduction; this peak is consistent with the species B-SS-B (derivatized H_2S_2).

In summary, the HPLC experiments confirm that GSSG preincubated in NaOH produced GSSH. They also show the formation of GSH, H₂S, and possibly H₂S₂. Besides, it was demonstrated that the formation of GSH could not be avoided by this method as we initially expected. On the contrary, similar concentrations of GSH and GSSH were generated. This suggested that GSSH had undergone further reactions. In fact, in parallel experiments we tried to isolate GSSH from alkaline mixtures or from mixtures of GSSG and H₂S, without success. We explored different techniques such as separations by Chromabond Drug II column solid phase extraction, HPLC with an Acclaim mixed-mode WAX-1 column, precipitation of H₂S with Zn²⁺, incubation with acetone to precipitate all the glutathione derivatives except H₂S, among others. It was not possible obtain pure GSSH, as other species were formed due to decay





Fig. 5. HPLC analysis of alkaline GSSG derivatized with mBrB. Chromatograms of standards and GSSG in alkaline pH were compared. 1) mBrB (4 mM), asterisks depict impurities; 2) GS-B (0.4 mM); 3) B-S-B (0.1 mM); 4) GSSG (12 mM) incubated in NaOH (52 mM) for 75 min was derivatized with mBrB (1 mM, 10-fold dilution); or 5) derivatized with mBrB (0.1 mM), reduced with TCEP (0.5 mM), and derivatized with more mBrB (0.9 mM, 30-fold dilution). Dilutions were done in ammonium bicarbonate buffer (50 mM, pH 7.8, 25 °C). All chromatograms were recorded at 396 nm.

processes such as its reaction with another GSSH.

3.4. Considerations in cold cyanolysis to avoid overestimation of persulfide

Since the cold cyanolysis method is commonly used to quantify persulfides, we studied the alkaline GSSG mixtures with this technique. Fig. 4. Mass spectrometric detection after IAM derivatization. GSSG (12 mM) was incubated with NaOH (52 mM) for 1.5 h, derivatized with IAM. submitted to solid phase extraction and analyzed. (A) Mass spectra of the products. The peaks marked are consistent with DHG; with GSSG, GSSSG and GS(O) SG singly and doubly charged; and with the IAM derivatives of GSH (GS-CAM), GSSH (GSS-CAM) and GSSSH (GSSS-CAM). (B) Identification of GSS-CAM (top) and DHG (bottom). Left: Enhanced resolution mass spectra showing that they are singly charged species. Top right: Fragmentation pattern of GSS-CAM (m/z 397.1); the main product ions are ascribable to loss of glycine and glutamate in combination with loss of SCAM (3-mercaptoacetamide). Bottom right: Fragmentation pattern of DHG (m/z 274.4) showing loss of glycine and glutamate in combination with CO2, HCO2H and NH3.

GSSG (12 mM) was incubated with NaOH (52 mM). After 106 min, aliquots were taken at increasing times, and mixed with KCN and NH₄OH to allow SCN⁻ formation. After 45 min from the last sample, formaldehyde, FeCl₃ and HNO₃ were added simultaneously to all the samples, and the absorbance of the complex $Fe(SCN)^{2+}$ was measured. Although the incubation time of GSSG with NaOH had been variable, all the samples displayed similar $Fe(SCN)^{2+}$ levels because the total incubation time at alkaline pH, either in NaOH or NH₄OH, had been similar (Fig. 6A). Importantly, a control of GSSG in water instead of NaOH presented significant concentrations of $Fe(SCN)^{2+}$. This points at significant persulfide formation during the incubation period with NH₄OH and KCN (Fig. 6A).

In contrast, when aliquots were taken from the GSSG/NaOH mixture at different timepoints but incubated with NH₄OH and KCN for the same exact time (either 10 or 45 min, see below), and the control of GSSG in water subtracted, the formation of sulfane sulfur compounds increased with time as expected (Fig. 6B). From the fits of exponential equations, the k_{obs} was estimated to be $(1.1 \pm 0.4) \times 10^{-2}$ min⁻¹ (Fig. 6C), and a second-order rate constant of $(4 \pm 1) \times 10^{-3}$ M⁻¹ s⁻¹ was calculated, which is consistent with the values obtained from UV–Vis absorbance and DTNB data if we take into account that the different methods assess different groups of species.

With the aim of diminishing the amount of sulfane sulfur produced during the alkaline step of the cold cyanolysis method, we evaluated if the incubation time in NH₄OH could be reduced. Thereby, GSSG and excess H_2S (to minimize GSSG) were incubated for 30 min and cold cyanolysis was done varying the incubation time in NH₄OH and KCN. We observed that after 10 min of incubation, the concentration of sulfane sulfur detected remained unchanged (Fig. S3).

On the whole, our cold cyanolysis results provide further evidence for the formation of GSSH from GSSG in alkali. Our results also reveal the risk of overestimating the amount of persulfide present in a sample with the cold cyanolysis method when disulfides are also present in the sample. This caveat arises in the step of incubation with cyanide under alkaline conditions, a step in which disulfides decay to persulfides.


Fig. 6. Formation of sulfane sulfur compounds. The concentration of sulfane sulfur compounds produced by GSSG (12 mM) in NaOH (52 mM) at 25 °C was measured by cold cyanolysis. Aliquots were taken at increasing times and preincubated with NH₄OH and KCN to form KSCN. The reactions were stopped by addition of formaldehyde and FeCl₃ in HNO₃. The concentration of the complex Fe(SCN)²⁺ was measured by absorbance at 460 nm. (A) Experiment with aliquots incubated in NH₄OH/KCN for different times. Spectra of aliquots taken from 106 to 176 min of reaction but recorded 45 min after the last aliquot. Controls of GSSG in water (blue) and of NaOH alone (black) were done. (B) Experiment with aliquots incubated in NH₄OH/KCN the exact same time (10 min), including a control of GSSG in water (blue dashed line). Spectra of aliquots taken from 0.5 to 146 min of reaction. (C) Concentration of sulfane sulfur *versus* time of incubation in NaOH in (A) (blue triangles) and (B) (black circles). The black trace represents the fit of an exponential equation. A k_{obs} of 0.011 \pm 0.004 min⁻¹ (mean \pm S.D., three independent experiments) was obtained.

4. Discussion

In this study, we explored the reaction between GSSG and HO⁻, and evidenced that GSSH and DHG are formed (Scheme 2), in agreement with a β -elimination process (Scheme 1i). The kinetics of the reaction were studied by absorbance at 335 nm, reaction with DTNB, and cold cyanolysis, yielding k_{obs} in timescales of minutes that were attributed to the formation of GSSH. Apparent second-order rate constants of $\sim 10^{-3}$ M⁻¹ s⁻¹ were obtained with the three approaches used, $(6.3 \pm 0.8) \times 10^{-3}$, $(11 \pm 2) \times 10^{-3}$ and $(4 \pm 1) \times 10^{-3}$ M⁻¹ s⁻¹, respectively, at 25 °C. These values are consistent with values estimated previously for alkyl disulfides including GSSG [6,34].

Regarding the mechanism of the β -elimination process (Scheme S1), an E1 elimination with a carbocation intermediate can be ruled out, since the kinetics of such mechanism would be zero-order in HO⁻, while the observed kinetics were first-order in HO⁻ (Fig. 1). Our kinetic data are consistent with two alternative mechanisms: E2 or E1cb. In an E2 concerted mechanism, the base would abstract the proton from the β-position carbon with simultaneous bond rearrangement and persulfide release; for this one-step mechanism, the $k_{\rm obs}$ would increase linearly with HO⁻ concentration, and the slope of the plot $(6.3 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$ would represent the rate constant of the concerted process. In an E1cb two-step mechanism, there would be an initial abstraction of the proton by the base to form a carbanion intermediate, followed by bond rearrangement and persulfide expulsion; for this two-step mechanism, the apparent second-order rate constant may be an algebraic combination of individual rate constants and may depend on the rate-limiting step, leading to linear or hyperbolic plots. It is important to consider that the rate of proton abstraction from an α -carbon of a typical peptide (the carbon in β with respect to the disulfide) is slow. Measurements reported for a glycine tripeptide reveal that the rate constant for proton abstraction from the α -carbon of the internal glycyl residue by HO⁻ is 2.0 \times 10⁻⁴ M⁻¹ s⁻¹, and that the pK_a is 25.9 [35]. Since the rate constant that we obtained is one order of magnitude higher, the β -elimination of GSSG is likely to occur through a concerted mechanism. In addition, in the case of GSSG, the rate of the reaction is probably affected by the four negative charges present in GSSG under alkaline conditions, which disfavor the reaction with the also negative HO⁻. On the other hand, the β -elimination from GSSG to form DHG and GSSH is probably facilitated by the low pK_a of GSSH (5.45 [11]), which makes it a relatively good leaving group. In fact, an analogous β -elimination from GSH to form DHG and H_2S [33] is probably disfavored by the higher pK_a of H_2S (6.98 [36]). Besides, it is interesting to compare the reaction of HO⁻ with GSSG $(\beta$ -elimination, 10^{-3} M⁻¹ s⁻¹) with the reaction of HS⁻ with GSSG (S_N2 attack on the disulfide, 0.3 M^{-1} s⁻¹, pH-independent) [10,11]. The

differences in the mechanisms and rate constants likely reflect that HO⁻ is a good base (pK_a water 14 [37], pK_a H₂S 6.98 [36]) while HS⁻ is a good nucleophile [38].

HPLC experiments showed that after 75 min of reaction between 12 mM GSSG and 52 mM HO⁻, 0.70 mM GSSH was formed. This is consistent with the concentrations estimated by the other methods, considering that they assess different species. From UV–Vis experiments, and using an extinction coefficient of 460 M^{-1} cm⁻¹ at 335 nm [29], the concentration of persulfides formed at 75 min was estimated to be 0.74 mM. Although absorbance at 335 nm is not specific for persulfides in a mixture, it can provide a rough estimate. From reaction with DTNB, 1.8 mM of nucleophilic sulfur species were measured, in accordance with 0.70 mM GSSH plus 0.77 mM GSH, 0.22 mM H₂S (measured by HPLC), unknown concentrations of GSSSH (detected by MS) and, if any, other hydropolysulfides present. Furthermore, upon 75 min of reaction, the cold cyanolysis method detected 1.2 mM of sulfane sulfur compounds, which accounted for 0.70 mM GSSH, unknown concentrations of GSSSH and GSSSG (detected by MS), and likely, other polysulfides.

In addition, MS experiments proved that GSSH underwent further reactions to form GSH, GSSSH and GSSSG. HPLC experiments allowed to quantify GSH and GSSH, showing that they were comparable (0.77 mM GSH versus 0.70 mM GSSH) and that significant concentrations of GSH could not be avoided by this method as we originally expected. HPLC chromatograms revealed that H₂S was another product formed. Of note, the fact that H₂S was not seen by MS does not contradict the observation in the HPLC experiment, since the m/z of the derivatized species would be below the range that was analyzed. These secondary products are likely to have been generated by the reaction of GSSH with GSSG, which was in excess (Scheme 3.1). In fact, we previously estimated a rate constant of $\sim 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for this reaction (with doubly charged GSSG) [11]. Secondary products may have also been generated by the reaction of GSSH with another GSSH (Scheme 3.2). These reactions would explain all the sulfur species identified: GSSG, GSSH, GSH, GSSSH, GSSSG, H₂S, and feasibly, H₂S₂. Once these species were generated, they could have continued to react forming higher order polysulfides and ultimately, elemental sulfur (S₈). Some of the possible additional reactions are shown (Scheme 3.3). The secondary reactions of GSSH could allow the reaction between GSSG and HO⁻ to proceed to the right, in line with the absence of a non-zero y-axis intercept in the plot of k_{obs} versus HO (Fig. 1), which suggests irreversibility. Regarding the formation of GSH, a concurrent process of hydrolysis of GSSG to give GSOH and GSH (Scheme 1ii) could also be contributing to the GSH detected. As for DHG, it possesses electrophilic reactivity and could have reacted with GSH to give the thioether [33], but a lanthionine derivative was not evidenced by MS.

Given the number of species detected and that they do not reach a situation of equilibrium in a timescale of hours, we discourage the preparation of GSSH stocks by incubating GSSG in NaOH. Instead, we recommend reacting GSSG in excess with H_2S at pH 7.4 and 25 °C, which is two orders of magnitude faster, 0.23 M⁻¹ s⁻¹ [11]. In this case, two reversible reactions predominate and equilibrium concentrations are achieved within minutes [11]. In addition, when alkaline mixtures were left to react to form GSSH and after several minutes the pH was lowered to 7.4, the concentration of the nucleophilic sulfur species did not remain stable, in fact, it decreased with time (Fig. S4). The different compositions of the mixtures is also a point to be considered, since the predominant secondary reactions would vary with the initial species. For instance, when GSSH is formed by mixing GSSG with H₂S in excess [16], the GSSH formed will be more likely to react with H₂S (to form H₂S₂ and GSH) rather than with GSSG (to form GSSSG and GSH).

Our results regarding the formation of persulfides and dehydroalanine from disulfides can likely be extrapolated to other biologically-relevant low molecular weight (LMW) disulfides, such as cystine, as well as to protein disulfides. In fact, dehydroalanine and its Michael adducts with thiols are naturally present in some peptides and proteins, and are byproducts of protein aging. They are often detected in proteomic studies with thiol proteins. Anecdotically, this chemistry is implicated in cosmetic treatments for the straightening of hair using alkaline relaxers. In addition to disulfides, as confirmed herein, other sources of dehydroalanine are serine, phosphoserine and selenocysteine residues [39-41]. The environment of the disulfide could facilitate β -elimination at lower pHs; this is exemplified by lens protein, in which a lysine proximal to the cystine has been proposed to assist in proton abstraction [42]. Besides, the β -elimination of specific disulfides can be catalyzed by enzymes that contain pyridoxal 5'-phosphate as cofactor. Mammalian cystathione β -synthase and cystathionine γ -lyase can use cystine as substrate, catalyzing the formation of the persulfide of cysteine together with pyruvate and ammonium (cystine lyase activity). Cystathionine γ -lyase can also use homocystine, yielding the persulfide of homocysteine, α -ketobutyrate and ammonium [43,44]. These activities appear to be non-canonical, secondary activities of the mammalian enzymes. Inside the cell, the concentrations of disulfides are low, and these reactions are not expected to constitute a major pathway for persulfide formation [44]. Nevertheless, some bacteria and plants have dedicated enzymes with cystine lyase activity, although their significance is not vet clear [45,46].

The formation of persulfides and other sulfane sulfur compounds from the incubation of GSSG in NaOH alerted us to possible biases that could be occurring in the cold cyanolysis procedure, which is frequently used to quantify persulfides. This method involves a step in which the sample is incubated with cyanide at alkaline pH (using NH₄OH) (Equation (2)). Therefore, if disulfides are present in the sample to be analyzed, persulfides and other sulfane sulfur compounds may be generated during this incubation step, and the sulfane sulfur concentration would be overestimated compared to that present in the original sample. Indeed, when cold cyanolysis was performed to controls of 12 mM GSSG in water, ~0.35 mM of sulfane sulfur was measured, which is significant compared to the levels formed by 12 mM GSSG in 52 mM NaOH (1.6 mM upon 2.5 h, Fig. 6), as well as with the equilibrium concentrations of GSSH (0.15-0.71 mM) in mixtures of GSSG (6-10 mM) and H₂S (0.5-2 mM) [11]. Hence, to avoid overestimation when performing cold cyanolysis if the sample contains disulfides, it is important to make a control of the disulfides in water and to incubate all samples in NH4OH for the exact amount of time. Additionally, it is convenient to reduce the time that the sample is exposed to alkaline conditions (Fig. S3). Furthermore, our work highlights that the common practice of adding NaOH to solutions of GSSG and other disulfides to favor the dissolution may lead to persulfide formation.

In typical cold cyanolysis procedures, after the incubation step with KCN in alkaline pH where thiocyanate is formed, the sample is then exposed to Fe^{3+} in acidic pH to produce the colored complex Fe(SCN)²⁺

(Equation (3)), which has an absorbance peak at 460 nm. This way, the concentration of KSCN formed can be calculated with a calibration curve done under the same conditions. However, this second step also has experimental limitations. $Fe(SCN)^{2+}$ is a weak complex with a relatively small formation equilibrium constant, $K_{eq} = 708$ (25 °C, I = 0) [47]. Thus, when a final concentration of 10 mM Fe^{3+} is used [8], the concentration of the complex measured would account for 88% of the SCN. Although higher concentrations of Fe³⁺ could increase the yield of the formation of the complex, both FeCl₃ and Fe(NO₃)₃, commonly used in cold cyanolysis, absorb at 460 nm [48]. Besides, $Fe(SCN)^{2+}$ has low absorptivity, $\varepsilon_{460} = 4700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [49,50], limiting the sensitivity of the method. Additionally, the complex and hence the absorbance, vary under different conditions; they are affected by the presence of chloride [51] and by the buffer used. All things considered, it is absolutely necessary to do KSCN calibration curves with fresh KSCN stocks under the same conditions and on the day of the experiment. Lastly, it is crucial to bear in mind that secondary reactions of LMW persulfides produce significant amounts of other sulfane sulfur compounds [11], and that CN⁻ can react with these compounds as well to form SCN⁻. Thus, the cold cvanolysis method measures sulfane sulfur, not persulfides specifically. We cannot emphasize enough that cold cyanolysis should not be used to measure persulfides specifically and accurately; in particular, it should not be used for the quantification of putative persulfide standards.

Altogether, we recommend to quantify LMW persulfides by derivatization of the sample with mBrB followed by HPLC [11,32]. The concentration of the labelled persulfide can be then calculated from the corresponding peak using the calibration curve at 396 nm of the derivatized analog thiol. Although we are aware that this method implies assuming similar absorptivities for persulfide and thiol, this is a reasonable supposition considering that the bimane moiety, present in both, is the main contributor to the absorbance at 396 nm. Besides, other functional groups such as disulfides and trisulfides, would not interfere at the wavelength of the measurement. In addition, the mBrB derivatives, unlike the IAM and N-ethylmaleimide ones, are stable [32].

5. Conclusions

This study evidences that GSSG and HO react through a β -elimination mechanism to form GSSH and DHG with a second-order rate constant of $\sim 10^{-3}$ M⁻¹ s⁻¹. Additional species are formed through secondary reactions, including GSH, GSSSH, GSSSG and H₂S. The concentrations of GSH and GSSH that are produced in these mixtures are similar. Besides, these mixtures do not reach equilibrium within ~ 2 h. Thus, we do not recommend the preparation of stocks of GSSH by incubating GSSG in alkali. This study also reveals that the formation of persulfides from disulfides at alkaline pH can lead to potential overestimations in cold cyanolysis measurements when there are disulfides present in the original sample, highlighting that it is important to be extremely careful with the cold cyanolysis procedure and very cautious with the conclusions drawn from the results.

Funding

This work was supported by grants from Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay, and by scholarships from Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina (to JAS), and Comisión Académica de Posgrado (CAP), Uruguay (to DB).

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.07.006.

References

- G.J. Mulder, Zusammensetzung von Fibrin, albumin, leimzucker, leucin u. S. w, Ann. Pharm. (Poznan) 28 (1838) 73–82.
- [2] E.J. Cohn, Some physical-chemical characteristics of protein molecules, Chem. Rev. 24 (1939) 203–232.
- [3] A.J. Parker, N. Kharasch, The scission of the sulfur-sulfur bond, Chem. Rev. 59 (1959) 583–628.
- [4] D. Cavallini, G. Federici, E. Barboni, M. Marcucci, Formation of persulfide groups in alkaline treated insulin, FEBS Lett. 10 (1970) 125–128.
- [5] J.P. Danehy, J.A. Kreuz, The alkaline decomposition of organic disulfides. I. Some dithiodicarboxylic Acids1, J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 1109–1113.
- [6] T.M. Florence, Degradation of protein disulphide bonds in dilute alkali, Biochem. J. 189 (1980) 507–520.
- [7] J.P. Danehy, V.J. Elia, C.J. Lavelle, Alkaline decomposition of organic disulfides. IV. Limitation on the use of Ellman's reagent. 2, 2'-Dinitro-5, 5'-dithiodibenzoic acid, J. Org. Chem. 36 (1971) 1003–1005.
- [8] J.L. Wood, Sulfane sulfur, Methods Enzymol. 143 (1987) 25-29.
- [9] M.R. Filipovic, J. Zivanovic, B. Alvarez, R. Banerjee, Chemical biology of H2S signaling through persulfidation, Chem. Rev. 118 (2018) 1253–1337.
- [10] E. Cuevasanta, M. Lange, J. Bonanata, E.L. Coitiño, G. Ferrer-Sueta, M.R. Filipovic, B. Alvarez, Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide, J. Biol. Chem. 290 (2015) 26866–26880.
- [11] D. Benchoam, J.A. Semelak, E. Cuevasanta, M. Mastrogiovanni, J.S. Grassano, G. Ferrer-Sueta, A. Zeida, M. Trujillo, M.N. Möller, D.A. Estrin, B. Alvarez, Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide, J. Biol. Chem. 295 (2020) 15466–15481.
- [12] S.A. Everett, L.K. Folkes, P. Wardman, K.D. Asmus, Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation, Free Radic. Res. 20 (1994) 387–400.
- [13] E. Cuevasanta, M.N. Möller, B. Alvarez, Biological chemistry of hydrogen sulfide and persulfides, Arch. Biochem. Biophys. 617 (2017) 9–25.
- [14] E. Cuevasanta, D. Benchoam, M.N. Möller, S. Carballal, R. Banerjee, B. Alvarez, Hydrogen sulfide and persulfides, in: Redox Chemistry and Biology of Thiols, Elsevier, 2022, pp. 451–486.
- [15] O. Kabil, R. Banerjee, Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H2S catabolism, J. Biol. Chem. 287 (2012) 44561–44567.
- [16] J.N. Fakhoury, D.A. Capdevila, D.P. Giedroc, Protocol for using organic persulfides to measure the chemical reactivity of persulfide sensors, STAR Protoc 3 (2022), 101424.
- [17] J. Shen, B.J.C. Walsh, A.L. Flores-Mireles, H. Peng, Y. Zhang, Y. Zhang, J. C. Trinidad, S.J. Hultgren, D.P. Giedroc, Hydrogen sulfide sensing through reactive sulfur species (RSS) and nitroxyl (HNO) in Enterococcus faecalis, ACS Chem. Biol. 13 (2018) 1610–1620.
- [18] M. Libiad, P.K. Yadav, V. Vitvitsky, M. Martinov, R. Banerjee, Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway, J. Biol. Chem. 289 (2014) 30901–30910.
- [19] T.M. Hildebrandt, M.K. Grieshaber, Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria, FEBS J. 275 (2008) 3352–3361.
- [20] É. Dóka, T. Ida, M. Dagnell, Y. Abiko, N.C. Luong, N. Balog, T. Takata, B. Espinosa, A. Nishimura, Q. Cheng, Y. Funato, H. Miki, J.M. Fukuto, J.R. Prigge, E.E. Schmidt, E.S.J. Arnér, Y. Kumagai, T. Akaike, P. Nagy, Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states, Sci. Adv. 6 (2020), eaax8358.
- [21] A.J. Jones, E. Helmerhorst, G.B. Stokes, The formation of dehydroalanine residues in alkali-treated insulin and oxidized glutathione. A nuclear-magnetic-resonance study, Biochem. J. 211 (1983) 499–502.
- [22] S.M. Bachrach, A. Pereverzev, Competing elimination and substitution reactions of simple acyclic disulfides, Org. Biomol. Chem. 3 (2005) 2095–2101.
- [23] R.S. Asquith, P. Carthew, An investigation of the mechanism of alkaline degradation of cystine in intact protein, Biochim. Biophys. Acta 278 (1972) 8–14.
- [24] D.P. Nelson, L.A. Kiesow, Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H2O2 solutions in the UV), Anal. Biochem. 49 (1972) 474–478.
- [25] J. Bonanata, L. Turell, L. Antmann, G. Ferrer-Sueta, S. Botasini, E. Méndez, B. Alvarez, E.L. Coitiño, The thiol of human serum albumin: acidity,

microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid, Free Radic, Biol. Med. 108 (2017) 952–962.

- [26] E.M. Kosower, N.S. Kosower, Bromobimane probes for thiols, Methods Enzymol. 251 (1995) 133–148.
- [27] C.K. Riener, G. Kada, H.J. Gruber, Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 266–276.
- [28] G.S. Rao, G. Gorin, Reaction of cystine with sodium sulfide in sodium hydroxide solution, J. Org. Chem. 24 (1959) 749–753.
- [29] D. Cavallini, G. Federici, E. Barboni, Interaction of proteins with sulfide, Eur. J. Biochem. FEBS. 14 (1970) 169–174.
- [30] N.E. Francoleon, S.J. Carrington, J.M. Fukuto, The reaction of H(2)S with oxidized thiols: generation of persulfides and implications to H(2)S biology, Arch. Biochem. Biophys. 516 (2011) 146–153.
- [31] S. Portillo-Ledesma, F. Sardi, B. Manta, M.V. Tourn, A. Clippe, B. Knoops, B. Alvarez, E.L. Coitiño, G. Ferrer-Sueta, Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine, Biochemistry 53 (2014) 6113–6125.
- [32] D. Schilling, U. Barayeu, R.R. Steimbach, D. Talwar, A.K. Miller, T.P. Dick, Commonly used alkylating agents limit persulfide detection by converting protein persulfides into thioethers, Angew Chem. Int. Ed. Engl. 61 (2022), e202203684.
- [33] I.R. Younis, M. Elliott, C.J. Peer, A.J.L. Cooper, J.T. Pinto, G.W. Konat, M. Kraszpulski, W.P. Petros, P.S. Callery, Dehydroalanine analog of glutathione: an electrophilic busulfan metabolite that binds to human glutathione S-transferase A1-1, J. Pharmacol. Exp. Therapeut. 327 (2008) 770–776.
- [34] J.W. Donovan, T.M. White, Alkaline hydrolysis of the disulfide bonds of ovomucoid and of low molecular weight aliphatic and aromatic disulfides, Biochemistry 10 (1971) 32–38.
- [35] A. Rios, J.P. Richard, T.L. Amyes, Formation and stability of peptide enolates in aqueous solution, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 8251–8259.
- [36] M.N. Hughes, M.N. Centelles, K.P. Moore, Making and working with hydrogen sulfide: the chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review, Free Radic. Biol. Med. 47 (2009) 1346–1353.
- [37] T.P. Silverstein, S.T. Heller, pKa values in the undergraduate curriculum: what Is the real pKa of water? J. Chem. Educ. 94 (2017) 690–695.
- [38] W.P. Jencks, J. Carriuolo, Reactivity of nucleophilic reagents toward esters, J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 1778–1786.
- [39] L.H. Jones, Dehydroamino acid chemical biology: an example of functional group interconversion on proteins, RSC Chem. Biol. 1 (2020) 298–304.
- [40] H.-J. Kim, S. Ha, H.Y. Lee, K.-J. Lee, ROSics: chemistry and proteomics of cysteine modifications in redox biology, Mass Spectrom. Rev. 34 (2015) 184–208.
 [41] E.S.J. Arnér, Common modifications of selenocysteine in selenoproteins, Essays
- [41] E.S.J. Arner, common momentations of science/sterne in science/rotens, Essays Biochem. 64 (2019) 45–53.
 [42] M.G. Friedrich, Z. Wang, A.J. Oakley, K.L. Schev, R.J.W. Truscott, Hotspots of age-
- [42] M.G. Friedrich, Z. Wang, K.J. Oakey, K.L. Schey, K.J. W. Hustoff, Holpots of agerelated protein degradation: the importance of neighboring residues for the formation of non-disulfide crosslinks derived from cysteine, Biochem. J. 474 (2017) 2475–2487.
- [43] T. Ida, T. Sawa, H. Ihara, Y. Tsuchiya, Y. Watanabe, Y. Kumagai, M. Suematsu, H. Motohashi, S. Fujii, T. Matsunaga, M. Yamamoto, K. Ono, N.O. Devarie-Baez, M. Xian, J.M. Fukuto, T. Akaike, Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111 (2014) 7606–7611.
- [44] P.K. Yadav, M. Martinov, V. Vitvitsky, J. Seravalli, R. Wedmann, M.R. Filipovic, R. Banerjee, Biosynthesis and reactivity of cysteine persulfides in signaling, J. Am. Chem. Soc. 138 (2016) 289–299.
- [45] I. Leibrecht, D. Kessler, A novel L-cysteine/cystine C-S-lyase directing [2Fe-2S] cluster formation of Synechocystis ferredoxin, J. Biol. Chem. 272 (1997) 10442–10447.
- [46] A. Hamamoto, M. Mazelis, The C-S lyases of higher plants : isolation and properties of homogeneous cystine lyase from broccoli (Brassica oleracea var botrytis) buds, Plant Physiol. 80 (1986) 702–706.
- [47] K. de Berg, M. Maeder, S. Clifford, The thermodynamic formation constants for iron(III) thiocyanate complexes at zero ionic strength, Inorg. Chim. Acta. 466 (2017) 249–253.
- [48] S.M. Baumler, W.H.H. V, H.C. Allen, Hydration of ferric chloride and nitrate in aqueous solutions: water-mediated ion pairing revealed by Raman spectroscopy, Phys. Chem. Chem. Phys. 21 (2019) 19172–19180.
- [49] M.W. Lister, D.E. Rivington, Some measurements on the iron (111)-thiocyanate system in aqueous solution, Can. J. Chem. 33 (1955) 1572–1590.
- [50] H.S. Frank, R.L. Oswalt, The stability and light absorption of the complex ion FeSCN++, J. Am. Chem. Soc. 69 (1947) 1321–1325.
- [51] H.E. Bent, C.L. French, The structure of ferric thiocyanate and its dissociation in aqueous solution, J. Am. Chem. Soc. 63 (1941) 568–572.

Supplementary information

Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method

Dayana Benchoam^{1,2,3}, Ernesto Cuevasanta^{1,2,4}, Jonathan A. Semelak⁵, Mauricio Mastrogiovanni^{2,6}, Darío A. Estrin⁵, Matías N. Möller^{2,7} and Beatriz Alvarez^{1,2,*}

 ¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay
 ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay
 ³Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
 ⁴Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay
 ⁵Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, Buenos Aires 1428, Argentina
 ⁶Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay
 ⁷Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

* Corresponding author, beatriz.alvarez@fcien.edu.uy



Figure S1. Reaction of GSH with H₂O₂. GSH (360 μ M) was mixed with H₂O₂ (2.5 mM) in 0.5 M Tris buffer, at pH 7.5 and 25 °C. Aliquots were 10-fold diluted and reacted with 0.3 mM DTNB in the presence of catalase (276 U mL⁻¹, Sigma) in the same buffer. The concentration of TNB was calculated from the absorbance at 412 nm and corrected by dilution. The data was fitted to a single exponential equation obtaining a $k_{obs} = 0.36$ min⁻¹ and a second-order rate constant k = 1.2 M⁻¹ s⁻¹.



Figure S2. Mass spectrometry of the alkaline mixture exposed to H_2O_2. GSSG (12 mM) was incubated in NaOH (52 mM). After 1.5 h, an aliquot was diluted two-fold and exposed to 10 mM H_2O_2 during 15 min in Tris buffer, 0.5 M, pH 7.4. Then, the mixture was derivatized with IAM, submitted to solid phase extraction and analyzed by mass spectrometry as in Figure 4A.



Figure S3. Determination of the incubation time in NH₄OH. Cold cyanolysis was done to mixtures of 16.7 mM H₂S and 3.35 mM GSSG in 0.5 M Tris buffer, at pH 7.4 and 25 °C. Aliquots were taken after 30 min and incubated with NH₄OH and KCN for variable times, from 5 to 55 min. The samples were reacted with Fe³⁺ in acidic pH and the concentration of sulfane sulfur was measured by absorbance at 460 nm.



Scheme S1. Alternative mechanisms for the β -elimination of GSSG by HO⁻. The process could correspond to either a E1, E2 or E1cb elimination mechanism. E1 implies the formation of a carbocation intermediate without engaging HO⁻. E2 constitutes a concerted mechanism; the abstraction of the proton occurs concomitant to bond rearrangement and persulfide release. E1cb is a two-step mechanism; the abstraction of the proton forms a carbonin intermediate which subsequently rearranges to expulse the persulfide.



Figure S4. Decay of DTNB-reactive compounds at physiological pH. GSSG (12 mM) was mixed with NaOH (52 mM) at 25 °C. After 134 min, an aliquot was diluted in 0.5 M Tris buffer with HCl at pH 7.4. Aliquots from the mixture at physiological pH were taken for 30 min. They were 10-fold diluted and reacted with 0.4 mM DTNB. The concentration of TNB was measured. The concentrations corrected by dilution (blue triangles) are overlayed with the concentrations of the mixture in NaOH (Figure 3).

Anexo II. Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide

Artículo publicado en J. Biol. Chem. en 2020

<u>Benchoam D.</u>, Semelak J.A., Cuevasanta E., Mastrogiovanni M., Grassano J.S., Ferrer-Sueta G., Zeida A., Trujillo M., Möller M.N., Estrin D.A., Alvarez B.



Received for publication, June 6, 2020, and in revised form, August 17, 2020 Published, Papers in Press, September 1, 2020, DOI 10.1074/jbc.RA120.014728

Dayana Benchoam^{1,2,‡}, Jonathan A. Semelak^{3,‡}, Ernesto Cuevasanta^{1,2,4}, Mauricio Mastrogiovanni^{2,5}, Juan S. Grassano³, Gerardo Ferrer-Sueta^{2,6}, Ari Zeida^{2,5}, Madia Trujillo^{2,5}, Matías N. Möller^{2,6,*}, Darío A. Estrin^{3,*}, and Beatriz Alvarez^{1,2,*}

From the ¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, and ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay, ³Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires and CONICET, Argentina, ⁴Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, ⁵Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, and ⁶Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay

Edited by F. Peter Guengerich

Persulfides (RSSH/RSS⁻) participate in sulfur trafficking and metabolic processes, and are proposed to mediate the signaling effects of hydrogen sulfide (H₂S). Despite their growing relevance, their chemical properties are poorly understood. Herein, we studied experimentally and computationally the formation, acidity, and nucleophilicity of glutathione persulfide (GSSH/ GSS⁻), the derivative of the abundant cellular thiol glutathione (GSH). We characterized the kinetics and equilibrium of GSSH formation from glutathione disulfide and H₂S. A p K_a of 5.45 for GSSH was determined, which is 3.49 units below that of GSH. The reactions of GSSH with the physiologically relevant electrophiles peroxynitrite and hydrogen peroxide, and with the probe monobromobimane, were studied and compared with those of thiols. These reactions occurred through S_N2 mechanisms. At neutral pH, GSSH reacted faster than GSH because of increased availability of the anion and, depending on the electrophile, increased reactivity. In addition, GSS⁻ presented higher nucleophilicity with respect to a thiolate with similar basicity. This can be interpreted in terms of the so-called α effect, *i.e.* the increased reactivity of a nucleophile when the atom adjacent to the nucleophilic atom has high electron density. The magnitude of the α effect correlated with the Brønsted nucleophilic factor, β_{nucl} for the reactions with thiolates and with the ability of the leaving group. Our study constitutes the first determination of the pK_a of a biological persulfide and the first examination of the α effect in sulfur nucleophiles, and sheds light on the chemical basis of the biological properties of persulfides.

Persulfides $(RSSH/RSS^{-})^{7}$ can be formed in biological systems through several pathways, some of which are dependent on hydrogen sulfide $(H_2S/HS^{-})^{8}$. Beyond its toxicity, H_2S

This article contains supporting information.

[‡]These authors contributed equally to this work.

⁷ The term "persulfide" is used in this text for the mixture of hydropersulfide (RSSH) and persulfide anion (RSS⁻) in aqueous solution. The IUPAC recommended names for RSSH are hydridodisulfide, disulfanyl, and dithiohydroperoxide.

⁸The term "H₂S" is used in this text for the mixture of hydrogen sulfide (H₂S) and hydrosulfide anion (HS⁻) in aqueous solution. The IUPAC recexerts physiological effects with potential health benefits in mammals. Persulfides have been proposed to transduce these effects; the modification of critical protein thiols (RSH/RS⁻) to persulfides would unleash downstream effects of H_2S (1). In addition, persulfides are intermediates in the biosynthesis of iron-sulfur clusters and other cofactors (2). They also constitute intermediates in the mitochondrial oxidation of H_2S (1).

Persulfides can be formed in vivo via reactions of H₂S with oxidized thiol derivatives, i.e. disulfides (RSSR') or sulfenic acids (RSOH) (3), via reactions of thiolates with oxidized sulfur derivatives, *e.g.* polysulfides (HS_nS⁻, n \geq 1) (4), and via free radical-mediated processes (5). Note that H₂S and thiols do not react directly with each other. H₂S-independent pathways for persulfide synthesis also exist, in which the sulfur is donated by thiols or disulfides (6-9). Moreover, there are enzymes capable of producing, transferring, and reacting with persulfides. Sulfide quinone oxidoreductase (SQOR) catalyzes the oxidation of H₂S to glutathione persulfide (GSSH), the persulfide derivative of the very abundant cellular thiol glutathione (GSH), and reduces ubiquinone (10-12). GSSH is the substrate of persulfide dioxygenase (also called ETHE1) (10, 13), an enzyme that oxidizes GSSH to sulfite (SO_3^{2-}) at the expense of O_2 and whose inborn errors are associated with severe clinical conditions (14). Rhodanese can catalyze the reversible reaction between GSSH and sulfite to form GSH and thiosulfate (10, 12, 15). These processes suggest that GSSH plays key roles in vivo; indeed, concentrations of \sim 35 pmol/mg protein (\sim 7 μ M) in mouse liver tissue have been recently reported (16). Despite the growing interest in persulfides, their chemical characteristics are poorly understood.

Hydropersulfides (RSSH) ionize in water to form deprotonated persulfides (RSS⁻). Compared with thiols, a higher acidity is expected for persulfides (1). In fact, the pK_a of 2-[(3aminopropyl)amino]ethane persulfide was estimated to be 6.2 ± 0.1 , which is lower than the pK_a of 7.6 \pm 0.1 determined for the corresponding thiol (17). The pK_a of cumyl persulfide was proposed to be 7 (18), whereas the pK_a of cumyl thiol is

^{*}For correspondence: Matías N. Möller, mmoller@fcien.edu.uy; Darío A. Estrin, dario@qi.fcen.uba.ar; Beatriz Alvarez, beatriz.alvarez@fcien.edu.uy

ommended names are sulfane or dihydrogen sulfide for H_2S , and sulfanide or hydrogen(sulfide)(1–) for HS^- .

likely to be higher than 10 according to the values for similar thiols (19). The p K_a of cysteine persulfide was computationally estimated to be \sim 4 units lower than that of the cysteine thiol (3).

In contrast to thiols, which possess only nucleophilic character, persulfides also have electrophilic character when protonated. The electrophilicity can be ascribed to both sulfur atoms. If the outer sulfur is attacked by a thiolate, the sulfur is transferred and a new persulfide is formed, constituting a transpersulfidation reaction. If the inner sulfur is attacked, H_2S is released and a mixed disulfide is formed.

Persulfides have been proposed to be stronger nucleophiles than thiolates. Enhanced reactivities were observed for arylpersulfides compared with arylthiolates toward alkyl halides in organic solvent (20). Enhanced reactivities were also observed for the persulfides formed in albumin and in the Mycobacterium tuberculosis peroxiredoxin AhpE toward 4,4'-dithiodipyridine compared with the corresponding protein thiols (3, 21). In addition, under certain conditions, GSSH reacted with H_2O_2 whereas GSH did not (7), and persulfide reactions with oneelectron oxidants were faster than those of thiols (18, 22). The high nucleophilicity of persulfides can be understood in terms of the so-called α effect (3, 20, 23, 24). The α effect was first defined as the enhancement of nucleophilicity when the atom adjacent to a nucleophile bears a lone pair of electrons (25). This definition is ambiguous because the α nucleophile can be compared either with a structural analog (e.g. HOO⁻ and HO⁻, NH₂-NH₂ and NH₃, and RSS⁻ and RS⁻) or with a nucleophile of equal basicity, in the context that for several reactions nucleophilicity correlates with Brønsted basicity. Given that the α nucleophile is not always more reactive than the structural analog (26), the α effect is more accurately defined as the positive deviation from the corresponding Brønsted plot (log k versus nucleophile p K_a) (27, 28). For this definition to be valid, the α and reference nucleophiles should react by similar mechanisms (29).

Because of their dual nucleophilic and electrophilic character, persulfides decay in aqueous solution, making their preparation and quantification challenging. Many methods for persulfide determination are either indirect, slow, or unspecific (1). The direct detection by MS is inconvenient because of their instability. Thus, derivatization with different alkylating agents, *e.g.* iodoacetamide, *N*-ethylmaleimide, or monobromobimane (mBrB) (7, 23, 30, 31), has become a common practice in which the rate of the alkylation step is crucial (30).

The reaction between glutathione disulfide (GSSG) and H_2S forms GSSH and GSH in a reversible process (3, 23, 32). This reaction is often used to prepare GSSH *in vitro* (13, 23, 31), and sometimes the concentration of the formed GSSH is estimated from that of the produced GSH or from the initial reactants, assuming stoichiometric relations. Nevertheless, because of the reactivity of persulfides, subsequent reactions are likely to happen and affect the yield, calling for a better characterization of the mixtures.

Considering that persulfides are involved in biosynthesis and catabolism, and that they play roles in cellular signaling, it is important to better understand their chemical properties. Herein, we studied the formation, acidity, and nucleophilicity of GSSH.

A method to quantify GSSH was adapted and subsequently employed to characterize the reaction between GSSG and H₂S, providing kinetic and equilibrium constants. The pK_a of GSSH was determined, representing the first pK_a report for a persulfide formed in biological systems. The nucleophilicity of GSSH toward mBrB, peroxynitrite $(ONOOH/ONOO^{-})^{9}$, and H_2O_2 was investigated. These electrophiles were chosen because there is information available for their reactions with thiols, enabling comparison. In addition, mBrB facilitates monitoring of the reactions by fluorescence, whereas peroxynitrite and H_2O_2 are biologically relevant oxidants. To understand the molecular basis of the differential reactivity, we performed hybrid quantum-classical (quantum mechanics/molecular mechanics, OM/ MM) calculations for the model pair methanethiolate/methanepersulfide anion (MeS⁻/MeSS⁻) toward the same electrophiles. Our results provide the first quantitative study of the nucleophilicity of a persulfide and its comparison with thiols. This constitutes, to our knowledge, the first examination of the α effect in sulfur nucleophiles.

Results and discussion

Quantification of GSSH

A reversed-phase HPLC method based on mBrB derivatization (7, 33-35) was adapted to quantify GSSH in a mixture of species. GSSG and H₂S reacted to form GSH and GSSH, and excess mBrB was added to label H₂S, GSH, and GSSH as the derivatized species B-S-B, GS-B, and GSS-B, respectively (Fig. 1A). A peak with a retention time of 7.7 min was ascribed to GSS-B because it disappeared in the presence of the reductant tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP), and when more mBrB was added, GS-B and B-S-B increased. The peaks corresponding to GSSG, GS-B, and B-S-B were assigned using standards (retention times of 5.8, 7.3, and 9.8 min, respectively) (Fig. 1B). The identities of the four species were confirmed by electrospray ionization MS and MS/MS; the results for GS-B and GSS-B were consistent with a mass increase of 32 Da for the latter (Fig. 1C). Calibration curves at 260 nm for GSSG and at 396 nm for GS-B and B-S-B were performed. Considering that GSS-B and GS-B have the same absorptivity at 396 nm because of the bimane moiety, the calibration curve for GS-B was used to quantify GSS-B.

To measure accurate concentrations, the derivatization step must be faster than the interconversion of species (30). Because reaction rates are the products of rate constants and concentrations, it can be calculated that labeling was \geq 100-fold faster than interconversion in our conditions (3, 30, 35–38). Indeed, the detected concentrations of GSH and GSSH were independent of the amount of mBrB applied (Fig. S1). Furthermore, GSS-B was relatively stable and its decay within 100 min was minor (Fig. S2). In summary, under the conditions employed herein, the concentration of the derivatives represent those present in the original mixtures.

⁹The term "peroxynitrite" is used in this text for the sum of peroxynitrous acid (ONOOH) and peroxynitrite anion (ONOO⁻). The IUPAC recommended names are hydrogen oxoperoxonitrate and oxoperoxonitrate (1–), respectively.



Figure 1. Derivatization with mBrB and characterization of chromatographic peaks. *A*, reactions of GSH, GSSH, and H₂S with mBrB to form GS-B, GSS-B, and B-S-B, respectively. *B*, representative HPLC runs of 1) mBrB (2 mM), 2) GS-B (0.2 mM), 3) GSSG (1 mM), 4) B-S-B (0.2 mM), 5) mixture of GSSG and H₂S (3 mM each, 20 min) diluted 15-fold and incubated with mBrB (2 mM), 6) reduction of 5 with TCEP (4.5 mM), and 7) addition of mBrB (6.9 mM) to 6. Reactions were done in phosphate buffer (0.1 m, pH 7.4, 25 °C). All chromatograms were recorded at 396 nm, except 3 (GSSG) at 260 nm. *C*, mass spectra and fragmentation patterns of the fractions eluting at 7.3 (GS-B, *m/z* 498.2) and 7.7 min (GSS-B, *m/z* 530.1). The product ions of GS-B are ascribable to neutral loss of NH₃ and HCOOH (435.1), minus glycine (360.1), or minus a sulfur-bimane derivative (211.0), loss of glutamate (369.1), and formation of the sulfur-bimane derivative (223.0 and 225.0). The fragmentation pattern of GSS-B showed peaks analogous to GS-B plus 32 (sulfur atom), assigned to the loss of NH₃ and HCOOH (467.1), minus glycine (392.0), or minus the sulfur-bimane derivative (243.0), loss of glutamate (401.1), and the formation of the sulfur-bimane derivative (223.0). The peak at *m/z* 339.1 could correspond to the protonated homolysis product GSS'. Fragments of *m/z* 192 were assigned to the bimane protonated radical as previously observed (7, 30, 36).

Kinetics and thermodynamics of the reaction of GSSG with $\rm H_2S$

Given the feasibility of quantifying GSSG, GSH, GSSH, and H_2S , we first studied the kinetics of the reaction of GSSG and H_2S (Reaction 1).

$$\operatorname{GSSG} + \operatorname{H}_2 \operatorname{S} \rightleftharpoons_{k_{-1}}^{k_1} \operatorname{GSH} + \operatorname{GSSH}$$

Reaction 1

GSSG (5–11 mM) was incubated with H_2S (0.5 mM), and the reactions were stopped at different times by dilution and deri-

vatization with mBrB. Time courses were obtained, and a second-order forward rate constant ($k_{1,pH}$) of 0.23 \pm 0.02 M⁻¹ s⁻¹ (pH 7.46, 24 °C) was determined from H₂S decay (Fig. 2, *A* and *B*). This is in agreement with the reported value of 0.16 \pm 0.01 M⁻¹ s⁻¹ (pH 7.4, 25 °C) previously determined by the methylene blue method (3).

The final concentration of GSSH was always lower than that of GSH. Furthermore, the final concentration of GSSH was lower than the initial concentration of H_2S (the limiting reagent) whereas that of GSH was higher (Fig. 2*A*). Considering that GSSG was in excess, it is proposed that GSSH and GSSG reacted in a second relatively fast reaction to form glutathione trisulfide (GSSSG) and GSH (Reaction 2).





Figure 2. Kinetics and thermodynamics of the reaction of GSSG and H₂S to give GSH and GSSH. *A*, time courses of the reaction between GSSG (11 mM) and H₂S (0.5 mM) in phosphate buffer (0.1 m, pH 7.4, 25 \pm 1 °C). *Solid lines* represent the fitted single exponential or exponential plus linear functions. The rate constants of a model consisting of Reactions 1 and 2 were estimated with COPASI using four independent experiments, obtaining $k_{1,pH} = 0.33 \pm 0.01$, $k_{-1,pH} = 0.51 \pm 0.08$, $k_{2,pH} = 1.6 \pm 0.3$, and $k_{-2,pH} = 9 \pm 2$ M⁻¹ s⁻¹. *Dashed lines* represent simulated time courses for a representative experiment. *B*, exponential rate constants (k_{obs}) of H₂S decay *versus* initial GSSG. The $k_{1,pH}$ obtained from the fit of four independent experiments was 0.23 \pm 0.02 m⁻¹ s⁻¹ (pH 7.46 \pm 0.01, 24 °C). *C*, mixtures of GSSG (5 mM) and H₂S (0.5 mM), preincubated for 1 h in the mentioned buffer, were exposed to 2–12.5 mM GSH, and the reactions were followed by derivatization and HPLC (pH 7.28 \pm 0.05, 25 °C). Using eight independent experiments, COPASI simulations in which $k_{1,pH}$ and the reactions were followed by derivatization of GSSG, GSSH, and H₂S were 3.7 mM, 90 μ M, and 50 μ M, respectively, according to HPLC quantification, yielded $k_{-1,pH} = 1.11 \pm 0.06$, $k_{2,pH} = 2.3 \pm 0.5$, $k_{-2,pH} = 3.1 \pm 0.4 \text{ m}^{-1} \text{ s}^{-1}$, and [GSSSG] = 0.27 \pm 0.01 mM. *Solid lines* represent simulated time courses for two representative experiments. *D*, equilibrium concentrations. GSSG (6–10 mM) and H₂S (0.5 mM) were incubated in the mentioned buffer under shaking. After 2 h, 4 mm mBrB was added and the GSSH-containing mixtures were analyzed by HPLC. The apparent equilibrium constant of Reaction 1 obtained from six independent determinations was 0.194 \pm 0.005 (mean \pm S.D., pH 7.4, 25 °C).

$$\operatorname{GSSH} + \operatorname{GSSG} \rightleftharpoons \operatorname{GSH} + \operatorname{GSSSG}_{k_{-2}}$$

Reaction 2

Accordingly, MS analysis of a mixture of excess GSSG and H_2S derivatized with iodoacetamide presented a peak with a m/z of 645.1, consistent with GSSSG (not shown). This is in agreement with previous reports where the corresponding trisulfides were observed (30, 39). The low sensitivity at 260 nm might have precluded the chromatographic detection of GSSSG. In addition, GSSSG was unlikely to co-elute with the characterized species, because it was not detected in the mass spectra of the chromatogram peaks but appeared in the mass spectrum of the whole mixture.

Rate constants were estimated with the software COPASI (40) using a model consisting of Reactions 1 and 2 and four independent sets of time courses of GSSH, GSH, and H₂S. Values of $k_{1,pH} = 0.33 \pm 0.01$, $k_{-1,pH} = 0.51 \pm 0.08$, $k_{2,pH} = 1.6 \pm 0.3$, and $k_{-2,pH} = 9 \pm 2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ were obtained (Fig. 2*A*). The value of $k_{1,pH}$ was consistent with that obtained from H₂S decay (0.23 M⁻¹ s⁻¹, Fig. 2*B*).

Regarding the physiological relevance of the reaction between GSSG and H_2S , and considering the relatively low rate constant (0.23 M⁻¹ s⁻¹) and concentration of GSSG *in vivo* (<5 μ M in cytosol of yeast (41, 42)), it can be concluded that GSSG is unlikely to constitute a major consumer of H₂S compared with preferential targets. Among the preferential targets of H₂S, SQOR deserves special mention because, in addition to reacting very fast with H₂S ($k_{cat}/K_{m,H2S} = 1.1 \times 10^7$ M⁻¹ s⁻¹, pH 7.4), it can form GSSH as product (11, 12).

To obtain a better estimate of the kinetics of the reverse Reaction 1, GSH (2–12.5 mM) was added to a mixture of GSSG and H₂S (pH 7.28, 25 °C) that had been preincubated for 1 h. At consecutive times, aliquots were analyzed. GSSH time courses showed a fast increase followed by a slower decrease, whereas H₂S increased (Fig. 2C). This is consistent with Reactions 1 and 2, whereby GSSH is rapidly formed by GSH and GSSSG (reverse Reaction 2) and consumed by GSH forming H₂S and GSSG in a slower process (reverse Reaction 1). Because both reactions are reversible, GSSH was not completely consumed. Eight independent time courses of GSSH and H₂S were analyzed with COPASI (40) according to a model consisting of Reactions 1 and 2, yielding $k_{-1,\rm pH}$ = 1.11 ± 0.06, $k_{2,\rm pH}$ = 2.3 ± 0.5, $k_{-2,\rm pH}$ = 3.1 ± 0.4 M⁻¹ s⁻¹, and an initial concentration of GSSSG of 0.27 \pm 0.01 mM (Fig. 2*C*). This experimental design allows a more robust estimation of $k_{-1,pH}$ than that of Fig. 2A. The estimated concentration of GSSSG was consistent with

mass balance considerations that initial H₂S equals the sum of H₂S, GSSH, and GSSSG in equilibrium and with previous observations under conditions of excess GSSG that the concentration of GSSSG is \sim 1/2 GSH in equilibrium (30). In our case, the concentrations of GSSH inferred from these relationships matched by 93 ± 8% (n = 6) those measured by HPLC. Of note, our kinetic analysis contemplated only two reactions. Whereas this simplification is reasonable when excess GSSG is used, other minor processes may probably occur, *e.g.* reaction of GSS⁻ with GSSSG or GSSH.

Reactions with thiolates constitute one of the main decay pathways for persulfides *in vivo* (16, 43, 44). To our knowledge, the value of $k_{-1,pH}$ (1.11 M⁻¹ s⁻¹) is the first report for the rate constant of a reaction between a low molecular weight (LMW) persulfide and a LMW thiolate at physiological pH. While there is an estimation for cysteine persulfide and cysteine of 0.09 \pm 0.01 M⁻¹ s⁻¹ (45), it corresponds to pH 10, a condition in which the carboxylate and amine of cysteine are deprotonated, likely affecting the kinetics of reaction (46).

We also analyzed the composition of the GSSH-containing mixtures once the concentrations remained stationary. GSSG (6–10 mM) and H₂S (0.5 mM) were incubated for 2 h, the reactions were stopped, and the species were quantified (Fig. 2*D*). A concentration quotient of 0.194 \pm 0.005 (pH 7.4, 25 °C, 0.1 M phosphate buffer) was obtained for Reaction 1. Assuming that irreversible processes such as H₂S release, elemental sulfur precipitation, or oxidation by oxygen are insignificant in this time-scale, this quotient reflects the apparent equilibrium constant ($K_{eq1,pH}$) of Reaction 1 at pH 7.4. The value is consistent with $k_{1,pH}$ being lower than $k_{-1,pH}$ and with the apparent equilibrium constant calculated from kinetic experiments ($k_{1,pH}/k_{-1}$, pH = 0.21).

From the apparent $K_{eql,pH}$ of 0.194, the $\Delta G^{\circ'}$ of Reaction 1 can be calculated to be +1.0 kcal/mol (pH 7.4, 25 °C). This agrees with a value of +1.4 kcal/mol estimated from thermochemical calculations for a generic RSSR reacting with HS⁻ to form RSS⁻ and RSH (the predominant species at neutral pH) (47) and supports that the Gibbs energy change is close to zero at physiological pH.

Our results underscore the existence of reverse and consecutive reactions and, together with the fact that persulfides disproportionate, indicate that GSSH cannot be purified in aqueous solutions; instead, it will be stationarily present in a mixture of species. This assertion is supported by several unsuccessful attempts to purify GSSH (not shown). Our results also lead to a note of caution for situations in which the concentration of persulfides is estimated from the thiol formed or from the initial concentration of reactants, because the quantities formed are not stoichiometric.

Acidity of GSSH and kinetics of the reaction with mBrB

After the GSSH-containing mixture had been characterized, the pK_a of GSSH was measured by the pH dependence of the reaction with mBrB, exploiting that mBrB does not accept or release protons within the pH range studied and that the reactions can be followed by product fluorescence. As previously performed for GSH, an initial rate study was performed (37, 48) by reacting low concentrations of a GSSH-containing mixture and mBrB at different pHs at 25 °C. The initial slopes of the fluorescence variations increased with pH according to a one-p K_a function, yielding a p K_a of 5.50 \pm 0.08 (Fig. 3*A*). The contributions of GSH and H₂S to the fluorescence change were calculated from the known rate constants, initial concentrations, and p K_a values, and found to be negligible (*e.g.* 0.015 and 0.007%, respectively, of the contribution of GSSH at pH 6) (30, 35–38).

Furthermore, we studied the pH dependence of the secondorder rate constant $(k_{\rm pH})$ by reacting GSSH-containing mixtures with excess mBrB. The fluorescence increases were biphasic and exponential plus linear functions were fitted. The fast exponential phase was attributed to the reaction of mBrB with GSSH, whereas the slow linear phase was attributed to the reaction with GSH and, secondarily, with H₂S, based on controls and on the rate constants for GSH and H_2S (Fig. 3B) (30, 35-38). Moreover, the amplitude was consistent with independent HPLC determinations of GSS-B, assuming similar fluorescence quantum yield as GS-B. Possibilities such as reaction of mBrB with GSS_nS^- or HS_nS^- ($n \ge 1$) cannot be discarded for the fast exponential phase. However, given that our mixtures had excess GSSG, the concentration of these species, if formed, is likely to be low. The $k_{\rm obs}$ attributed to GSSH increased linearly with mBrB concentration. The k_{pH} had a sigmoid dependence with pH, resulting in a p K_a of 5.45 \pm 0.03 and a pH-independent rate constant (k_{ind}) for the reaction of GSS⁻ with mBrB of $(9.0 \pm 0.2) \times 10^3$ M⁻¹ s⁻¹ (Fig. 3, *C*–*E*). The k_{ind} represents the rate constant that would be measured if all the persulfide were ionized and shows that, with mBrB, the persulfide anion reacts 44 times faster than the thiolate of glutathione (208 M^{-1} s⁻¹) (37). At pH 7.4, GSSH reacted with an apparent rate constant of $(7.02 \pm 0.04) \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, 1200 times faster than that with GSH (Table 1). Importantly, similar pK_a values were obtained from both the initial rate and integral methods.

To sum up, the pK_a of GSSH was 5.45 \pm 0.03, 3.49 units below that of GSH (8.94) (37). This means that at pH 7.4, the availability of the deprotonated species is 2.8% for GSH but 99% for GSSH.

We then performed a computational analysis of the acidity of persulfides and thiols by electronic structure calculations with the aim of understanding the molecular basis of the difference. The ionization equilibrium of an acid XH can be dissected in several steps: XH and H₂O desolvation, homolytic X-H bond cleavage, X[•] electron affinity and hydrogen ionization, H₂O proton affinity, and X^- and H_3O^+ solvation. The energetics of each step can be separately computed at different levels of theory. Then, the standard Gibbs energy change for the global process (ΔG_a) can be calculated as the sum of the individual steps, and the contribution of each step to the global process can be discerned. Gibbs energy calculations were performed with the simplified models methanepersulfide (MeSSH) or methanethiol (MeSH) to avoid the optimization of zwitterionic structures in vacuum. Although the electronic structure method and basis sets used affected the computed values, general trends were maintained (Table S1).





Figure 3. pH dependence of the reaction of GSSH with mBrB. *A*, a mixture containing GSSH (~0.75 μ M) reacted with mBrB (1 μ M) in acetic/MES/tris buffer (pHs 4.16–6.86, 25 °C). Linear functions fitted to initial fluorescence increases ($\lambda_{ex} = 396$ nm, $\lambda_{em} = 472$ nm) yielded slopes (*inset*) that had a sigmoid dependence with pH. The data pooled from two independent experiments gave a p K_a of 5.50 \pm 0.08 (parameter \pm error of the fit). The points shown are quadruplicates of one representative experiment. No interference from the buffer was detected. *B*, representative stopped-flow fluorescence kinetic traces ($\lambda_{ex} = 396$ nm, emission cutoff 435 nm) of the reaction of 118 μ M mBrB with a mixture containing ~1.6 μ M GSSH, ~6.3 μ M GSH, and ~1 μ M H₂S (final concentrations) in phosphate buffer (0.1 m, pH 7.40, 25 °C, 0.1 mM dtpa) (*red*) and with controls of 6.3 μ M GSH (*blue*) or buffer alone (*black*). *C*, GSSH-containing mixtures (~2 μ M GSSH) reacted with 18–81 μ M mBrB in acetic/MES/Tris buffer (pHs 4.19–7.41, 25 °C). Representative stopped-flow fluorescence time courses with 40 μ M mBrB. Exponential plus linear of double exponential plus linear functions were fitted to kinetic traces during 10 half-lives. At the more acidic pHs, an additional fast phase was noted; the origin is unclear but its amplitude was less than 15% of the sum of the amplitudes and was not studied further. *D*, k_{obs} attributed to the reaction of GSSH against mBrB concentration. The *circles* represent the mean \pm 5.D. of repetitions of a representative experiment. *Error bars* are usually smaller than symbols. The slopes of the fits represent the second-order rate constants. At the more alkaline pHs, a small negative *y*-intercept was observed, probably because of reactant impurities or to a fast reaction with a species present in low concentration. *E*, second-order rate constants *versus* pH. A one-p K_a function fitted the data pooled from two independent experiments (*black squares* and *blue*

Table 1

	$k_{\rm pH}^{\rm GSSH}$ (m ⁻¹ s ⁻¹)	$k_{\text{ind}}^{\text{GSSH}} (\text{M}^{-1} \text{s}^{-1})$	$\frac{k_{\rm pH}^{\rm GSSH}}{k_{\rm pH}^{\rm GSHa}}$	$\frac{k_{\rm ind}^{\rm GSSH}}{k_{\rm ind}^{\rm GSHa}}$	$\frac{k_{\text{ind}}^{\text{GSSH}}}{k_{\text{ind}}^{\text{RSH}\text{p}K_a5.45}}$	$eta_{ extsf{nuc}}$ for the reaction with LMW thiolates
mBrB Porovunitrito	$(7.02 \pm 0.04) \times 10^{3b}$ $(1.25 \pm 0.02) \times 10^{5c}$	$(9.0 \pm 0.2) \times 10^{3}$ $(4.7 \pm 0.1) \times 10^{5}$	1200^{b}	44	1670 50	0.52 ± 0.08 0.42 ± 0.06^{d}
H ₂ O ₂	$(1.23 \pm 0.03) \times 10$ 7.5 ± 0.6^{e}	$(4.7 \pm 0.1) \times 10$ 7.7 ± 0.6	22^e	0.24	3.2	0.42 ± 0.06 0.27 ± 0.06

^aReported rate constants for the reactions of GSH with mBrB (37), peroxynitrite (54, 56), and H_2O_2 (37).

^bRate constants at pH 7.40, 25 °C.

^cRate constants at pH 7.23, 37 °C.

 ${}^{d}\beta_{nuc}$ calculated in this paper (see legend to Fig. 6).

^{*e*}Rate constants at pH 7.02, 25 °C.

The thermodynamic relation between the Gibbs energy change and the acidity constant is given by Equation 1, where R is the ideal gas constant and T is the temperature.

$$\Delta G_a^{\circ} = 2.303 \,\mathrm{RT} \,\mathrm{p}K_a \tag{Eq. 1}$$

A difference in pK_a between thiol and persulfide (ΔpK_a) of 7.2 was calculated using Equation 1 and Gibbs energy changes obtained for the global ionization process with the electronic structure coupled cluster singles and doubles method (CCSD)

employing the 6-31 G(d') basis set. However, small errors (\sim 1 kcal/mol) in the computed Gibbs energies would affect the estimated p K_a values. The main difference in the energetics of the individual steps between thiol and persulfide was found in the homolytic S-H bond cleavage, which was \sim 20% lower for MeSSH than for MeSH (Table S1). This is consistent with S-H bond dissociation energies reported for alkyl thiols and persulfides, which differed by 24% (49), and with IR spectra, which showed shifted S-H stretching frequencies (50–52). The acidity of MeSSH was also estimated in the context of the proton-

exchange method previously used to estimate the pK_a of cysteine persulfide (3, 53), yielding a ΔpK_a of 1.7 with CCSD/6-31 G (d'). Considering the pK_a of MeSH, 10.33 (19), a pK_a of 8.6 would be predicted for MeSSH.

Overall, our calculations follow the same trend as the experimental data and suggest that the factor that contributes the most to the lower pK_a of persulfides with respect to thiols is the weaker S-H bond in the persulfide compared with the thiol.

After determining the pK_a of GSSH, we analyzed the pH dependence of the apparent rate and equilibrium constants of Reaction 1 (Table S2 and Fig. S3). At pH 7.4, $k_{1,pH}$ is similar to $k_{1,ind}$ because most H₂S is ionized ($pK_{a \ H2S}$, 6.98) (38). In contrast, only a fraction of $k_{-1,ind}$ (~3600 M⁻¹ s⁻¹) is evidenced at pH 7.4 (1.11 M⁻¹ s⁻¹); $k_{-1,pH}$ decreases by deprotonation of GSSH ($pK_{a \ GSSH}$, 5.45) and protonation of GS⁻ ($pK_{a \ GSH}$, 8.94) (37). Thus, at pH 7.4, the apparent equilibrium constant $K_{eq1,pH \ 7.4}$ is 0.194, whereas $K_{eq1,ind}$ is 8.3 × 10⁻⁵. This value of $K_{eq1,ind}$ corresponds to an endergonic ΔG° of +5.6 kcal/mol. The change in the apparent equilibrium constant at pH 7.4 translates into a difference of -4.6 kcal/mol. In other words, at pH 7.4, deprotonation of GSSH and protonation of GS⁻ drive Reaction 1 to the right.

The fact that $k_{-1,\text{ind}}$ is higher than $k_{1,\text{ind}}$ is consistent with GS⁻ being a better nucleophile than HS⁻ and GS⁻ being a poorer leaving group than HS⁻ (3), because H₂S has a lower pK_a than GSH. Furthermore, the unfavorable thermodynamics can be rationalized by better solvation of HS⁻ than GS⁻ and higher bond dissociation energy for the S-S bond in GSSG than GSSH (47, 49).

Kinetics of the reactions of GSSH with physiological electrophiles

The kinetics of the reactions of GSSH with peroxynitrite and H₂O₂ were studied using a pseudo-first-order excess of GSSH and the other components of the mixture. GSSH-containing mixtures were reacted with peroxynitrite (pH 7.23, 37 °C) and followed by the decrease in absorbance (Fig. 4A). The temperature was chosen to facilitate comparison with data reported for thiols (54). The k_{obs} obtained from peroxynitrite exponential decay correlated linearly with GSSH concentration (Fig. 4B). Precisely, the slope represents the sum of the contributions of the reactions of peroxynitrite with GSSH, GSH, and H₂S. The contributions of GSH and H₂S were calculated and subtracted from the global decay considering the rate constants at the working pH (1.29×10^{3} M⁻¹ s⁻¹ for GSH (54), 7.93×10^{3} M⁻¹ s^{-1} for H₂S (38, 55, 56)) and the concentrations, which were measured separately. Thus, a $k_{\rm pH}$ 7.23 of (1.25 \pm 0.03) \times 10⁵ M^{-1} s⁻¹ was determined for the reaction of peroxynitrite and GSSH, 97 times higher than GSH under the same conditions. Given the pK_as of GSSH (5.45) and ONOOH (6.8) (56), k_{ind} was calculated to be $(4.7 \pm 0.1) \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹ with Equation 2. This value is 1.8 times higher than for GS^- (54, 56) (Table 1).

$$k_{\rm pH} = k_{\rm ind} \left(\frac{K_a^{\rm RSSH}}{K_a^{\rm RSSH} + [{\rm H}^+]} \right) \left(\frac{[{\rm H}^+]}{K_a^{\rm ONOOH} + [{\rm H}^+]} \right) \quad ({\rm Eq. \ 2})$$

The measurements of the kinetics of the reaction with H_2O_2 proved to be challenging, and the best results were obtained when peroxired xin 5 was used as a probe for H_2O_2 . The fluorescence of peroxiredoxin 5 (Prx5) increases as it is oxidized by H₂O₂ (37, 57). Actually, a variant named Prx5v was used. This variant behaves similarly to WT with respect to the reaction with H_2O_2 but the formation of the disulfide from the sulfenic acid and the resolving cysteine is faster, minimizing parallel reactions of the sulfenic acid and improving the performance of the probe (Fig. S4). A GSSH-containing mixture was incubated with H_2O_2 . Aliquots were taken at increasing times, diluted, and mixed with Prx5v. The intrinsic fluorescence of the enzyme, which is proportional to H_2O_2 (Fig. S5), was measured. From the k_{obs} of the decay of H₂O₂ in the presence of the mixture (Fig. 4C), after subtracting the contributions of GSH and H_2S to H_2O_2 decay (37, 38, 58), the k_{pH} 7.02 for the reaction of H_2O_2 and GSSH was determined to be 7.5 \pm 0.6 M^{-1} s⁻¹ (pH 7.02, 25 °C) (Fig. 4C). This value is 22 times higher than that of GSH under the same conditions. The k_{ind} of the reaction of GSS^- and H_2O_2 was calculated with Equation 3 considering that H_2O_2 does not ionize, because it has a p K_a of 11.62 (59). A value of 7.7 \pm 0.6 $^{-1}$ s⁻¹ was obtained, which is 4 times lower than the corresponding reaction of $GS^{-}(37)$ (Table 1).

$$k_{\rm pH} = k_{\rm ind} \left(\frac{K_a^{\rm RSSH}}{K_a^{\rm RSSH} + [{\rm H}^+]} \right)$$
(Eq. 3)

Computational insight into the reactions of persulfides and thiols with electrophiles

To provide a complementary microscopic insight into the reactivity of persulfide anions and thiolates, we studied computationally the reactions of the simplified models, MeS^- and $MeSS^-$, with mBrB, ONOOH, and H_2O_2 . We employed a multi-scale QM/MM approach that allows to treat explicitly the solvent molecules while keeping the quantum nature needed for modeling the reactive species. This realistic representation of a chemical reaction in aqueous solution at room temperature enabled an accurate comparison between the simulations and the experimental data.

Inspection of the Gibbs energy profiles revealed that the transition states for both MeS⁻ and MeSS⁻ were reached early. The geometries were almost identical (Fig. 5, A-C). The linear arrangement of the nucleophilic sulfur, the electrophilic center, and the closest atom of the leaving group suggests typical bimolecular nucleophilic substitutions (S_N2), as shown previously for thiolates (60, 61). A post-transition state proton transfer occurred in the case of H₂O₂ (37, 60, 62). The products were MeS-B/MeSS-B + Br⁻, MeSOH/MeSSOH + NO₂⁻, and MeSO⁻/MeSSO⁻ + H₂O, for the reactions with mBrB, ONOOH and H₂O₂, respectively. The reactions were strongly exergonic (Fig. 5, D-F).

The simulated activation Gibbs energies (ΔG^{\dagger} , obtained from the maxima of the Gibbs energy profiles) for the reactions of MeS⁻/MeSS⁻ were compared with those calculated for GS⁻/GSS⁻ from the experimental pH-independent rate constants k_{ind} according to the Transition State Theory (63) (Table





Figure 4. Kinetics of the reactions between GSSH and peroxynitrite or H_2O_2. *A*, reaction with peroxynitrite. Mixtures containing GSSH (137–191 µM), GSH (5.11 times GSSH), and H_2S (0.57 times GSSH) were mixed with 26 µM peroxynitrite (final concentrations) in phosphate buffer (0.1 *M*, pH 7.23, 37 °C, 0.1 mM dtpa) in a stopped-flow spectrophotometer. Normalized absorbance *versus* time. Representative time courses of peroxynitrite decay at 302 nm in the absence (*black*) or presence of 137 (*red*), 159 (*blue*), and 177 µM GSSH (*green*). Exponential plus linear functions were fitted to the time courses. Kinetic traces presented an increase in absorbance after seven half-lives, probably because of secondary reactions of H₂S (not shown) (55). *B*, *k*_{obs} versus GSSH concentration. The *k*_{obs} of (1.36 ± 0.03) × 10⁵ m⁻¹ s⁻¹ (parameter ± error of the fit) is *k*_{pH GSSH} + 5.11 *k*_{pH GSH} + 6.57 *k*_{pH H25}. Then, the *k*_{pH 723} GSSH was (1.25 ± 0.03) × 10⁵ m⁻¹ s⁻¹. The rate constant without GSSH-containing mixture was 1.13 ± 0.04 s⁻¹ (mean ± S.D.), consistent with peroxynitrite spontaneous decay (99). The experiment shown is representative of four independent experiments. *C.* reaction with H_2O_2 . Decay of 50 µM H_2O_2 in the presence of a mixture containing 0.71 mM GSSH, 2.0 mM GSH, *due*, or 0.37 mM H_2S (*green*) in the same buffer (pH 7.02, 25 °C). Aliquots were diluted 100-fold and mixed with peroxiredoxin Prx5v (2–4 µM). The reactions were followed by the intrinsic fluorescence ($\lambda_{ex} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 340$ nm) of Prx5v in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 25 °C, 0.1 mM dtpa) in a plate reader. The exhibited time courses are representative experiments. The mean ± S.D. of three independent determinations yielded a k_{obs} of (6.2 ± 0.4) × 10⁻³ s⁻¹ for H₂O₂ decay in the presence of the mixture, whereas the k_{obs} corresponding to GSH or H₂S controls were one or two orders of magnitude lower, respectively. Controls of Prx5v and GSH in the absence and pre

S3). The rate constant k relates to ΔG^{\ddagger} through Equation 4, where R is the ideal gas constant, T is the temperature, k_B and h are the Boltzmann and Plank constants, C° is 1 M, and τ is the transmission coefficient, assumed in this case to have a value of one.

$$k \approx \frac{\tau k_{\rm B} \mathrm{T}}{h \mathrm{C}^{\mathrm{o}}} \mathrm{e}^{-\Delta G^{\dagger}/\mathrm{RT}}$$
 (Eq. 4)

The expected trends were observed for the Gibbs activation energies of the reactions with both thiolate and persulfide anion: $\Delta G^{\dagger}_{H2O2} > \Delta G^{\dagger}_{mBrB} > \Delta G^{\dagger}_{ONOOH}$ (Table S3). When comparing MeS $^-$ to MeSS $^-$, the differences in simulated ΔG^{*} were $\Delta\Delta G^{\dagger} = 2.1 \pm 0.9$ for mBrB, 0.2 ± 0.8 for ONOOH, and 1.0 ± 0.8 kcal/mol for H₂O₂. These values are consistent with those determined from the experimental k_{ind} of 2.2, 0.5, and -0.8 kcal/mol, respectively (Table S3), although close to the reliability limit of the computational methodology. In fact, the $\Delta\Delta G^{\dagger}$ of GS⁻/GSS⁻ toward H₂O₂ was computationally estimated as 0.0 \pm 0.5 kcal/mol (not shown). We evaluated the influence of the level of theory by performing calculations using an implicit solvent model with a variety of electronic structure schemes. The density functional theory (DFT) approach using the Perdew-Burke-Ernzerhof (PBE) functional employed in the OM/MM simulations, and more accurate electronic structure methods, showed similar differences when comparing the ΔG^{\dagger} of MeS⁻ and MeSS⁻ (Table S4).

We then evaluated the influence of the electronic structure of the species on the observed trends by monitoring Mulliken populations of selected atoms as a measure of charge distribution along the reactions. At the reactant complex, in the reactions with mBrB, the net -1 e charge was localized in MeS⁻ or MeSS⁻, whereas with ONOOH and H₂O₂, the charge in MeS⁻ or MeSS⁻ was approximately -0.85 to -0.90 e (Fig. 5, *G–I*). In

every case, MeS⁻ exhibited the charge almost completely in its single sulfur atom whereas in MeSS⁻ the charge was partitioned between both sulfur atoms. The largest redistributions of charges were observed around the transition states. The atoms constituting the leaving groups acquired a more negative charge, whereas the sulfur atoms became more positive. At the transition state, the atoms integrating MeS⁻ or MeSS⁻ summed up a charge of approximately -0.59, -0.73, and -0.69 e (mean values for MeS⁻ and MeSS⁻) in the reactions with mBrB, ONOOH, and H₂O₂, respectively (Table S5). The percent charge transferred from the reactant complex to the transition state had the same trend as $\Delta\Delta G^{\dagger}$, mBrB > H₂O₂ > ONOOH (Table S3 and Table S5). Remarkably, the percent charge transferred was higher for MeSS⁻ than MeS⁻ for the three electrophiles. In the case of mBrB, both the experimentally determined increase in nucleophilicity of GSS⁻ versus GS⁻ and the computed charge transferred in the transition state were the highest.

Finally, to monitor potential solvent effects, we computed radial correlation functions centered on the nucleophilic atoms. In the absence of an electrophile, the nucleophilic sulfur atoms of both MeS⁻ and MeSS⁻ yielded the typical solvation patterns of diffuse anions (Fig. S6), consistent with previous work (60, 64). Their solvation structures became looser along the reaction as a consequence of the significant charge redistribution. The same effect was observed, to a lower extent, for the inner sulfur atom of MeSS⁻ (not shown). No significant differences were found between MeS⁻ and MeSS⁻ reactions with respect to the evolution of solvation patterns.

Overall, the relatively good correlation between the experimental and simulated data validates the use of MeS⁻/MeSS⁻ as simplified models. Our results suggest that the reactions occur through similar $S_N 2$ mechanisms and that differences in reactivity are mainly due to electronic structure differences and not to solvent effects.



Figure 5. Transition states, Gibbs energy profiles, and evolution of charges. Reactions of MeS⁻ or MeSS⁻ with mBrB (*panels A, D*, and *G*), ONOOH (*panels B, E,* and *H*), and H₂O₂ (*panels C, F,* and *I*) were studied by umbrella sampling in a QM/MM scheme. *A–C,* representative snapshots of the transition states of the thiolate (*left*) and persulfide anion (*right*). *D–F,* Gibbs energy profiles for MeS⁻ (*blue lines*) or MeSS⁻ (*red lines*). *G–I,* average Mulliken populations as a function of reaction coordinate for MeS⁻ (*dashed lines*) or MeSS⁻ (*solid lines*) reactions. Charges of atoms that exhibited significant variations are shown in the corresponding colors. The regions corresponding to the transition states are indicated with a *yellow box*.

α effect in persulfides

Brønsted plots correlate the nucleophilic capability with the basicity for a certain family of compounds according to Equation 5 (log of k_{ind} versus pK_a of the nucleophile), where β_{nuc} , typically between 0 and 1, is the Brønsted nucleophilic factor and *C* is a constant.

$$\log k_{\rm ind} = \beta_{\rm nuc} \, pK_a + C \tag{Eq. 5}$$

Nucleophiles with high electron density in the atom adjacent to the nucleophilic atom show positive deviations from these plots and exhibit higher reactivity than expected according to their basicity (65). This deviation is known as the α effect.

Using our newly determined rate constants, the pK_a of GSSH, and published data for LMW thiols (37, 54, 56, 66), we constructed Brønsted plots (Fig. 6). Notably, the k_{ind} of GSS⁻ appeared above the trend reported for LMW thiolates with mBrB, ONOOH, and H₂O₂. The nucleophilicity of GSS⁻ was enhanced compared with that predicted for a thiolate with similar basicity by 1670-fold for mBrB, 50-fold for ONOOH, and 3.2-fold for H₂O₂ (Table 1).

The trend in the magnitude of the α effect (mBrB > ONOOH > H₂O₂) correlated with the β_{nuc} for the reactions of thiolates, which are 0.52 for mBrB, 0.42 for ONOOH, and 0.27 for H₂O₂ (37, 54, 66) (Table 1). These correlations have

been previously observed for other nucleophile families (28, 67, 68) and are now observed for these sulfur nucleophiles. In addition, although comparisons between electrophiles of different types (*i.e.* centered in carbon or in oxygen) should be carried out with caution, a correlation was also observed between the α effect and the ability of the leaving group, which is related with the acidity of the conjugated acid (HBr > HNO₂ > H₂O, p*K*_as of -8.8, 3.35, and 14, respectively (69–71)). Note that in the reactions with H₂O₂ the proton transfer takes place after the transition state; thus, OH⁻ is the leaving group (37, 60, 62).

In summary, we evidenced the enhanced nucleophilicity of the biologically relevant persulfide GSS⁻ toward three electrophiles compared with the expected nucleophilicity of a thiolate of equal basicity. To our knowledge, our study represents the first examination of the α effect in sulfur nucleophiles.

Biological implications

The high acidity of GSSH (p K_a 5.45, 3.49 units below GSH), if extrapolated to other persulfide/thiol pairs, means that in biological systems the persulfides will be ionized whereas the thiols will be mainly protonated. The appearance of a negative charge could alter the functional properties of the original thiol. The situation may be different in particular proteins where the local environment may change the pK_a values.



Figure 6. Comparison of the reactivity of GSS⁻ and thiolates with mBrB, ONOOH, and H₂O₂. Brønsted plots depicting the reported pH-independent rate constants (in logarithmic scale) *versus* thiol pK_a for the reactions of several LMW thiolates (*black circles,* GS⁻ in *blue*) with *A*, mBrB at 25 °C ($\beta_{nuc} = 0.52 \pm 0.08$) (37); *B*, ONOOH at 37 °C (plot updated from (66) considering more recent pK_a estimations (37, 56); the fit yielded $\beta_{nuc} = 0.42 \pm 0.06$ and C = 1.7 ± 0.5); and C, H₂O₂ at 25 °C ($\beta_{nuc} = 0.27 \pm 0.06$) (37). The *red circles* show the pH-independent rate constants for GSS⁻ *versus* GSSH pK_a , reported herein.

The enhanced nucleophilic reactivity of GSSH compared with GSH at physiological pH is the result of two aspects, the higher availability of the ionized species due to its lower pK_a and, depending on the electrophile, the increased nucleophilicity of GSS⁻. This is relevant for enzymatic (*i.e.* with persulfide dioxygenase) and nonenzymatic reactions (i.e. with one- and two-electron oxidants and other electrophiles) in which GSSH acts as a nucleophile. Extrapolation to other persulfide/thiol pairs would indicate an enhancement in reactivity of one to three orders of magnitude (Table 1), which could vary depending on the specific molecular environment, the pH, and the electrophilic partner. The relatively high nucleophilic reactivity of persulfides could contribute to the proposed protective effects of persulfidation. Oxidation of persulfides can lead to products (i.e. RSSO₂H and RSSO₃H) that can be reduced by cellular reductants systems, whereas analogous oxidation of thiols vields irreversible oxidation products (i.e. RSO₂H and RSO₃H) (4, 16, 24, 44).

Importantly, the biological properties of persulfides can also be attributed to their electrophilicity, as in transpersulfidation reactions, which is a property absent in thiols. It is likely that both the enhanced nucleophilicity and the electrophilicity contribute to the persulfide-mediated downstream effects of H_2S .

Our analysis of persulfide pK_a and nucleophilicity has implications for the reaction catalyzed by the mitochondrial enzyme SQOR. It has been proposed that this enzyme contains a trisulfide (RSSSR) instead of a disulfide (RSSR) in its two active site cysteines (72). Reaction of H_2S with RSSSR instead of RSSR to form two persulfides could imply an acceleration of ~two orders of magnitude, because persulfide is a better leaving group than thiol because of its lower pK_a (3). In the following step of the reaction, which involves the attack of the enzyme-formed persulfide or thiolate on the electrophilic FAD cofactor, an acceleration of one to three orders of magnitude would be expected for the persulfide. These estimations are based on considerations for LMW species; as is typical with enzymes, specific protein effects could lead to further acceleration factors. In fact, recent computational estimations suggest a rate increase of $\sim 10^5$ -fold for the first step if the active site of SQOR is in the trisulfide instead of the disulfide state (73).

Conclusions

This study reveals several aspects about the formation, acidity, and nucleophilicity of GSSH, summarized as follows. 1) A reversed-phase HPLC method based on mBrB derivatization can be used for quantification of GSSH in mixtures. 2) Excess GSSG and H₂S generate GSSH, GSH, and GSSSG through at least two reversible reactions, Reaction 1 (GSSG + H_2S) and Reaction 2 (GSSG + GSSH). At physiological pH and 25 \pm 1 °C, the rate constants are $k_{1,pH} = 0.23 \pm 0.02$, $k_{-1,pH} = 1.11 \pm 0.06$, $k_{2,pH} = 1.6$ -2.3, and $k_{-2,pH} = 3.1$ -9 M⁻¹ s⁻¹. 3) The apparent equilibrium constant $K_{eq1,pH}$ is 0.194 \pm 0.005 (pH 7.4, 25 \pm 1 °C). 4) The reaction of GSSG with HS⁻ to form GSSH and GS⁻ is endergonic but is driven by -4.6 kcal/ mol through deprotonation of GSSH and protonation of GS at physiological pH. 5) In mixtures of GSSG and H₂S, the formation of GSSH is not stoichiometric with respect to GSH nor to the initial concentration of H₂S because the products undergo subsequent reactions. 6) The pK_a of GSSH is 5.45 \pm 0.03, 3.49 units below the pK_a of GSH. This is, to our knowledge, the first report of the pK_a of a biological persulfide. 7) The higher acidity of persulfides compared with thiols is due mainly to the weaker S-H bond. 8) At physiological pH, GSSH reacts 1200, 97, and 22 times more rapidly than GSH with the electrophiles mBrB, peroxynitrite, and H₂O₂, respectively. This can be explained by the increased availability of the ionized species and, depending on the electrophile, by the increased nucleophilicity. 9) The reactions of GSSH occur through S_N2 mechanisms similar to those of thiols. 10) The differences in reactivity are related to the electronic structures of the species rather than to solvent effects. 11) The α effect is evidenced by the positive deviation in Brønsted plots. 12) The increased reactivity of GSS⁻ compared with a thiolate of similar basicity is 1670-fold with mBrB, 50-fold with ONOOH, and 3.2-fold with H_2O_2 . 13) The magnitude of the α effect varies with the electrophile. It correlates with the β_{nuc} for the reactions with thiolates and with the ability of the leaving groups. An examination of the α effect in sulfur nucleophiles is unprecedented to our knowledge. Overall, our study contributes to the understanding of the basic chemical properties of persulfides, which affects their roles in biosynthesis, catabolism, and H₂S signaling.

Experimental procedures

Reagents and solutions

Solutions of GSSG (AppliChem) were prepared in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4). When specified, the buffer also contained 0.1 mM diethylenetriamine pentaacetic acid (dtpa, ACROS). Depending on the desired final pH, 1.5-2 equivalents of NaOH were added. GSH (ACROS) was dissolved in the mentioned buffer. Crystals of Na₂S·9H₂O (Carlo Erba), stored under argon in a desiccator, were washed with distilled water, dissolved in ultrapure water, and used within a few hours. Solutions containing H₂S were prepared in sealed vials with minimum headspace and manipulated with gas-tight Hamilton syringes. Concentrated stocks of mBrB (Sigma-Aldrich) (50 mM) were prepared in acetonitrile; dilutions ($<120 \mu$ M) were freshly prepared in ultrapure water or buffer and quantified by absorbance at 396 nm (ϵ_{396} = 5300 M⁻¹ cm^{-1}) (74). Solutions of TCEP (Sigma-Aldrich) were prepared in distilled water. Solutions of H₂O₂ (BAKER) were prepared in ultrapure water and quantified by absorbance at 240 nm (ϵ_{240} = $39.4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (75, 76). Peroxynitrite stocks were prepared as previously and quantified by absorbance at 302 nm (ϵ_{302} = 1700 M^{-1} cm⁻¹) (56, 77, 78); dilutions (26 μ M) were freshly prepared in 2 mM NaOH.

Reversed-phase HPLC

Reversed-phase chromatography was performed using a 1260 Infinity HPLC (Agilent) with a diode array UV-visible absorbance detector and a C18 Ascentis column (100 × 4.6 mm, 3 μ m, Sigma-Aldrich). Samples derivatized with mBrB were diluted 2-fold in 0.1% (v/v) TFA (Fluka) prior to injection and eluted with a gradient of 0.1% (v/v) TFA:acetonitrile (100:0 from 0 to 2 min, 60:40 from 8 to 10 min, 5:95 from 12 to 14 min) at a flow rate of 0.8 ml/min. Chromatograms were recorded at 260 and 396 nm.

MS

Fractions collected from the HPLC underwent two cycles of evaporation in a vacuum concentrator to remove the TFA and redissolved in ultrapure water. The aqueous fractions were then diluted in 0.1% (v/v) formic acid and analyzed by direct infusion into a hybrid triple-quadrupole/linear ion trap mass spectrometer (QTRAP4500, AB Sciex). Mass spectrometer parameters were optimized for best signal quality according to the corresponding analyte and method. For molecular ion identification, Q1 mode was employed in positive mode, electrospray voltage and declustering potential were set to 5.5 kV and 70 V, respectively, and the scan speed was set to 1000 Da/s. Fragmentation experiments were performed in the Product Ion mode with a collision energy ramp from 20 to 50 V. Data were acquired with Analyst 1.6.2 software and analyzed with Peak-View 2.2 (AB Sciex).

Kinetics and equilibrium studies followed by HPLC

To study the reaction between GSSG and H_2S , 5–11 mM GSSG and 0.5 mM H_2S were incubated for increasing time periods in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, 25 ± 1 °C). In

another set of experiments, 5 mM GSSG and 0.5 mM H₂S were preincubated for 1 h in the mentioned buffer; then, 2-12.5 mM GSH was added, leaving minimum headspace in the vial. At the end of the experiments, the final pHs of the reaction mixtures were measured. In both sets of experiments, aliquots were taken at different incubation times and the reactions were stopped by 2.5- to 9.5-fold dilution in 4 or 10 mM mBrB, final concentrations, in sodium phosphate buffer (80-95 mM, pH 7.4). The derivatized samples were then analyzed by HPLC. For GSSG, the chromatograms at 260 nm were used, whereas for the other species, the chromatograms at 396 nm corresponding to the bimane derivatives were used. The concentrations of GSSG, GSH, GSSH, and H₂S were determined by measurement of the area under the peaks and comparison with calibration curves of known standards. Considering that the bimane derivatives of GSSH and GSH have the same absorptivity because of the bimane moieties, the calibration curve for GSH was used to quantify GSSH. OriginPro 8.6 was used to analyze data. COPASI (40), a software application for the simulation and analysis of biochemical networks, was used to simulate time courses and fit kinetic parameters. Parameters in COPASI were estimated with the Levenberg-Marquardt algorithm.

To characterize the apparent equilibrium constant, $K_{eq1,pH}$, 6–10 mM GSSG and 0.5 mM H₂S were incubated in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, 25 °C), under shaking, in glass insert tubes inside sealed vials with almost no headspace. After 2 h, 4 mM mBrB was added and the samples were analyzed by HPLC.

Determination of the pK_a of GSSH

The p K_a of GSSH was determined by the pH dependence of the reaction with mBrB using both an initial rate approach, as previously described for thiols, and an integral method under pseudo-first-order conditions with mBrB in excess (48). A three-component, constant ionic strength (I = 0.15 M) buffer was used in the pH range of 4.16–7.41 (79). The buffer (1×) contained 15 mM acetic acid (Dorwil, Argentina), 15 mM MES (Applichem), 30 mM Tris (Applichem), 120 mM NaCl (Applichem), 0.1 mM dtpa, and variable amounts of HCl or NaOH to adjust the pH.

In the initial rate approach, stock solutions of mBrB and mixtures of 10 mM GSSG and 2 mM H₂S, which had been incubated for 1 h in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4) to form GSSH, were freshly diluted in ultrapure water immediately before use. The initial rates of the reaction between 1 μ M mBrB and mixtures that contained $\sim 0.75 \ \mu\text{M}$ GSSH (final concentrations) were measured in a Varioskan Flash plate reader (Thermo Fisher Scientific) at 25 °C. In a 384-well black plate, 11 or 12 reactions at different pHs were prepared in quadruplicate. Each well contained 20 μ l of the three-component buffer 5× and 50 μ l of the diluted GSSH-containing mixture. The reactions were started by the injection of 30 μ l of mBrB using the automatic dispenser of the plate reader. Fluorescence (λ_{ex} = 396 nm, λ_{em} = 472 nm) was measured during 5–13 min and linear functions were fitted to the readings. The obtained slope, which is proportional to the initial rate, was determined for each pH. To evaluate buffer interference, controls without the

GSSH-containing mixture were performed. The pHs of the solutions were measured immediately after the reactions. An aliquot of the GSSH-containing mixture was derivatized with 9 mM mBrB for HPLC analysis.

In pseudo-first-order experiments, rapid kinetics were studied in the presence of excess mBrB in a stopped-flow spectrofluorimeter (Applied Photophysics SX20). To prepare GSSH-containing mixtures, 10 mM GSSG and 2 mM H₂S were preincubated for at least 1 h in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM dtpa) and then diluted in ultrapure water immediately before use. The diluted GSSH-containing mixtures (${\sim}2$ μ M GSSH) were reacted with 18–81 μ M mBrB, final concentrations, prepared in the three-component buffer $2 \times$ at different pHs at 25 °C. The fluorescence (λ_{ex} = 396 nm, emission cutoff 435 nm) of the product was recorded during 18-500 s. The final pHs were measured. At pH 7.40, experiments were also performed in sodium phosphate buffer (0.1 M, 0.1 mM dtpa) and included controls with 118 µM mBrB and 6.3 µM GSH or buffer alone. The data were analyzed with OriginPro 8.6 or Pro-Data SX20 software (Applied Photophysics).

Kinetics of the reaction of GSSH with peroxynitrite

The kinetics of the reaction was studied under pseudo-firstorder conditions with excess GSSH. The decay of peroxynitrite was followed by the decrease in absorbance at 302 nm in the stopped-flow. To prepare GSSH, 10 mM GSSG and 2 mM H₂S were preincubated for 1.5 h in sodium phosphate buffer (0.2 M, pH 7.4, 0.2 mM dtpa) at 25 °C. The GSSH-containing mixtures were diluted up to 1.4-fold in the mentioned buffer (137–191 μ M) minimizing headspace and were reacted with freshly prepared solutions of 26 μ M peroxynitrite, final concentrations, at 37 °C. The pH was measured at the end of each reaction. The peroxynitrite-dependent change in absorbance at 302 nm was recorded for 1 s. Controls of the spontaneous decay of peroxynitrite in buffer alone were performed under the same conditions. In parallel, aliquots of the GSSH-containing mixtures were separated for HPLC quantification of GSSH, GSH, and H_2S . Data were analyzed with the software OriginPro 8.6.

Kinetics of the reaction of GSSH with H₂O₂

The decay of H₂O₂ was monitored using Prx5 as a sensor of H₂O₂ because the intrinsic fluorescence of this enzyme increases with oxidation (37, 57). The Prx5 variant (Prx5v) that was used contained an N-terminal 6×His-Tag and extra residues in the C-terminal end. The molecular mass of this protein was verified by SDS-PAGE and MALDI-TOF MS. The sequence was verified by trypsin digestion and MALDI-TOF MS and MS/MS analysis of the tryptic peptides (4800 MALDI-TOF/TOF, AB Sciex). The fast reaction with H₂O₂ was characterized (Fig. S4). Prx5v reacted with H₂O₂ with a similar rate constant to WT ((2.9 \pm 0.7) \times 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, pH 7.1, 25 °C). Nevertheless, the formation of the disulfide from the sulfenic acid and the resolving cysteine was faster than in WT (127 \pm 2 s⁻¹, pH 7.1, 25 °C, for Prx5v versus 14.7 s⁻¹, pH 7.4, 25 °C (57) or 21 s⁻¹, pH 6.9, 25 °C (37), for WT). This minimizes parallel reactions of the sulfenic acid and improves probe performance.

Acidity and nucleophilicity of glutathione persulfide

To prepare GSSH-containing mixtures, 10 mM GSSG was preincubated with 2 mM H₂S in sodium phosphate buffer (0.1 м, pH 7.4, 0.1 mм dtpa). After 1.5 h, 50 µм H₂O₂ was added. Aliquots of 2 μ l were taken at increasing incubation times and mixed with 198 μ l of reduced Prx5v (2–4 μ M) in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 0.1 mM dtpa). Fluorescence (λ_{ex} = 280, λ_{em} = 340 nm) was immediately measured in a Varioskan Flash plate reader at 25 °C. Then, the pH of the reaction mixtures was measured. Calibration curves of H₂O₂ were simultaneously done in each experiment using the same dilution of reduced Prx5v (Fig. S5). Prior to the reaction with H₂O₂, an aliquot of the GSSH-containing mixture was analyzed by HPLC for quantification of GSSH, GSH, and H₂S. Controls with the concentrations of GSH or H₂S equivalent to those present in the GSSH-containing mixtures were performed under the same conditions. Data were analyzed using the software OriginPro 8.6.

The decay of H_2O_2 in the presence of excess GSSH was studied by two additional methods that yielded rate constants within the same order of magnitude as Prx5v (not shown), namely the formation of oxygen in the presence of catalase in an oxymeter and the fluorescence produced by Amplex UltraRed oxidation by H_2O_2 in the presence of horseradish peroxidase. Methods based on Amplex Red and xylenol orange essays had interference from species present in the mixtures.

Computational methods

MeSH/MeS⁻ and MeSSH/MeSS⁻ were used as models of thiol and persulfide, respectively. Electronic structure calculations were performed with Gaussian09 (80) whereas QM/MM molecular dynamics (MD) simulations were performed using LIO (https://github.com/MALBECC/LIO), a software developed by the Group of Molecular Modeling in the Universidad de Buenos Aires, compiled with Amber14 (81, 82). Dynamics visualizations and molecular drawings were performed with VMD 1.9.1 (83).

Computational comparison of the acidity of persulfides and thiols

All structures were optimized using DFT-based methodology. Computations were performed at the generalized gradient approximation level, using the PBE combination of exchange and correlation functional with a double-zeta plus polarization (dzvp) Gaussian basis set (84, 85). Frequency calculations were performed in each case and Gibbs energy changes were estimated by means of standard statistical mechanics formalism. The polarizable continuum solvent model was employed with the default parameters of aqueous solvation (86). Additionally, electronic structure calculations were performed employing the Møller-Plesset perturbation theory (at the MP2 level) with dzvp basis, and the ω B97x-D and M062X methods combined with a 6-31 G(d') basis set, which have been reported to yield good accuracy for thermochemistry and kinetic applications where noncovalent interactions are significant (87–89). Finally, we repeated the simulations with a more accurate CCSD methodology, also employing a 6-31 G(d') basis set.

Initial survey of the system in vacuum and implicit solvent

Structures of reactant complexes, transition states, and product complexes were optimized in vacuo and using polarizable continuum solvent model with aqueous solvation default parameters (86) at the DFT level. Computations were performed at the generalized gradient approximation level, using the PBE combination of exchange and correlation functional, with a dzvp Gaussian basis set (84, 85). Frequency calculations were performed in each case to ensure that the obtained structures for reactant complexes and product complexes corresponded to minima in the potential energy surface. Transition-state structures were confirmed by exploring the intrinsic reaction coordinate (90). Gibbs energies were estimated by means of standard statistical mechanics formalism, as implemented in the Gaussian09 suite. Single-point calculations on the PBE/ dzvp optimized structures were calculated employing Møller-Plesset perturbation theory (at the MP2 level) with dzvp basis to evaluate activation barrier underestimations inherent to pure DFT functionals. We also employed the ω B97X-D and M062X methods combined with a 6-31 G(d') basis set, which have been reported to yield good accuracy for thermochemistry and kinetics applications where noncovalent interactions are significant (88, 89).

Multi-scale QM/MM MD: preparation of the initial system

Reactants were described by QM at the DFT PBE/dzvp level of theory and solvated with explicit classical (MM) water molecules described with the TIP3P model (91) in a truncated 25-Å octahedral box. Initial structures for the reactants were those previously optimized in Gaussian09 at the same level of theory. Periodic boundary conditions were used. The Lennard-Jones parameters (ϵ and σ) for the QM subsystem atoms were those of the general AMBER force field, i.e. 0.3200, 0.2500, 0.2104, 0.1700, 0.1094, and 0.0157 kcal/mol, and 2.220, 2.000, 1.7210, 1.8240, 1.9080, and 1.4870 Å, for Br, S, O, N, C, and H atoms, respectively (92). The system was relaxed optimizing first only the atoms integrating the QM subsystem, maintaining the MM subsystem fixed, and then optimizing both the QM and MM subsystems. Next, the MM subsystem was heated from 0 to 300 K during 0.1 ns of MM MD with the Berendsen thermostat (93), followed by a 1-ps-long QM/MM MD employing an uncoupled Berendsen thermostat, to ensure a reliable thermalization of the full system and to control the local kinetic energy of the relatively small QM subsystem.

Multi-scale QM/MM MD: Calculation of Gibbs energy profiles

Gibbs energy profiles were obtained with the umbrella sampling method (94, 95). The reaction coordinate was defined as the difference in the distance between the nucleophilic sulfur atom and the electrophilic center (the carbon atom bound to bromine in mBrB and the H-bonded oxygen in ONOOH and H_2O_2) and the distance between the electrophilic center and the closest atom of the leaving group.

Initial structures for the umbrella sampling calculations were extracted from a 25-ps-long steered QM/MM MD using a force

constant of 200 kcal/mol/Å². Windows were centered at different reaction coordinate reference values, spaced by 0.1 Å in most cases. Then, a quadratic bias potential function also centered in the reference values was added to the reaction coordinate, and the windows were carefully relaxed following a protocol that combined classical MD and QM/MM optimizations to improve solvation sampling at an affordable computational cost (96). A 5-ps-long QM/MM MD simulation was generated of each window with the uncoupled Berendsen thermostat, and then another 5-ps QM/MM MD simulation was performed employing the stochastic Langevin thermostat to ensure a canonical distribution (97). Finally, Gibbs energy profiles were computed employing the Langevin MD data and the umbrella integration method (98).

Data availability

The data that support the findings of this study are contained within this article and in the supporting information. Raw data are available upon request (mmoller@fcien.edu.uy, dario@qi. fcen.uba.ar, beatriz.alvarez@fcien.edu.uy).

Acknowledgments—We thank Adriana Cassina and Stephanie Portillo-Ledesma (Universidad de la República) for help with oximetry and Prx5v experiments, respectively.

Author contributions—D. B., J. A. S., E. C., G. F.-S., M. N. M., and B. A. investigation; D. B., J. A. S., and B. A. writing-original draft; D. B., J. A. S., E. C., G. F.-S., A. Z., M. T., M. N. M., D. A. E., and B. A. writing-review and editing; E. C., G. F.-S., A. Z., M. T., M. N. M., D. A. E., and B. A. conceptualization; E. C., A. Z., M. T., D. A. E., and B. A. supervision; M. M., J. S. G., G. F.-S., M. N. M., and D. A. E. methodology; D. A. E. and B. A. funding acquisition; D. A. E. and B. A. project administration.

Funding and additional information—This work was supported in part by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Grants GRUPOS 2014 C632-348, GRU-POS_2018_47, I+D_2016_541 (to B. A.) and I+D 2016_367 (to M. T.), Espacio Interdisciplinario, Universidad de la República, Grant Centros_2015, Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII), Uruguay, Grant FCE_1_2017_1_136043 (to M. N. M), Fondo Vaz Ferreira, Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay, Grants I/FVF2017/069 (to E. C.) and I/FVF2017/185 (to A. Z.), Universidad de Buenos Aires Grant UBACYT 20020130100097BA, Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, Argentina, Grants PICT 2014-1022 and PICT 2015-2761, and Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina, Grant 11220150100303CO. D. B., E. C., and M. M. were partially supported by Comisión Académica de Posgrado, Universidad de la República, and by PEDECIBA, Uruguay. J. A. S. was partially supported by Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina, and Programa Escala Docente, Asociación de Universidades Grupo Montevideo. The computer simulations were performed at CECAR and Instituto de Química Física de los Materiales, Medio Ambiente y Energía (INQUIMAE) clusters, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.



Conflict of interest—The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

Abbreviations—The abbreviations used are: RSSH, hydropersulfide; GSH, glutathione; GSSH, glutathione persulfide; GSSG, glutathione disulfide; GSSG, glutathione trisulfide; mBrB, monobromobimane; GS-B, GSH derivatized with mBrB; GSS-B, GSSH derivatized with mBrB; B-S-B, H₂S derivatized with mBrB; MeSH, methanethiol; MeSSH, methane hydropersulfide; MeS⁻, methanethiolate; MeSS⁻, methanepersulfide anion; ONOOH, peroxynitrous acid; LMW, low molecular weight; SQOR, sulfide quinone oxidoreductase; Prx5, peroxiredoxin 5; Prx5v, peroxiredoxin 5 variant; QM, quantum mechanics; MM, molecular mechanics; MD, molecular dynamics; CCSD, coupled cluster singles and doubles method; DFT, density functional theory; dzvp, double-zeta plus polarization; PCM, polarizable continuum model; TCEP, tris(2-carboxyethyl) phosphine; dtpa, diethylenetriamine pentaacetic acid; PBE, Perdew-Burke-Ernzerhof.

References

- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018) Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation. *Chem. Rev.* 118, 1253–1337 CrossRef Medline
- Mueller, E. G. (2006) Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat. Chem. Biol.* 2, 185–194 CrossRef Medline
- Cuevasanta, E., Lange, M., Bonanata, J., Coitiño, E. L., Ferrer-Sueta, G., Filipovic, M. R., and Alvarez, B. (2015) Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. *J. Biol. Chem.* 290, 26866–26880 CrossRef Medline
- Greiner, R., Pálinkás, Z., Bäsell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., and Dick, T. P. (2013) Polysulfides link H₂S to protein thiol oxidation. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1749–1765 CrossRef Medline
- Zhang, D., Macinkovic, I., Devarie-Baez, N. O., Pan, J., Park, C.-M., Carroll, K. S., Filipovic, M. R., and Xian, M. (2014) Detection of protein S-sulfhydration by a tag-switch technique. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 53, 575–581 CrossRef Medline
- Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M., and Banerjee, R. (2013) Structure and kinetic analysis of H₂S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. *J. Biol. Chem.* 288, 20002–20013 CrossRef Medline
- Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M., *et al.* (2014) Reactive cysteine persulfides and S-polythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 7606–7611 CrossRef Medline
- Yadav, P. K., Martinov, M., Vitvitsky, V., Seravalli, J., Wedmann, R., Filipovic, M. R., and Banerjee, R. (2016) Biosynthesis and reactivity of cysteine persulfides in signaling. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 289–299 CrossRef Medline
- Akaike, T., Ida, T., Wei, F.-Y., Nishida, M., Kumagai, Y., Alam, M. M., Ihara, H., Sawa, T., Matsunaga, T., Kasamatsu, S., Nishimura, A., Morita, M., Tomizawa, K., Nishimura, A., Watanabe, S., *et al.* (2017) CysteinyltRNA synthetase governs cysteine polysulfidation and mitochondrial bioenergetics. *Nat. Commun.* 8, 1177 CrossRef Medline
- Hildebrandt, T. M., and Grieshaber, M. K. (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. *FEBS J.* 275, 3352–3361 CrossRef Medline
- Jackson, M. R., Melideo, S. L., and Jorns, M. S. (2012) Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. *Biochemistry* 51, 6804– 6815 CrossRef Medline
- Libiad, M., Yadav, P. K., Vitvitsky, V., Martinov, M., and Banerjee, R. (2014) Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway. *J. Biol. Chem.* 289, 30901–30910 CrossRef Medline

- Kabil, O., and Banerjee, R. (2012) Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H2S catabolism. *J. Biol. Chem.* 287, 44561–44567 CrossRef Medline
- Tiranti, V., Viscomi, C., Hildebrandt, T., Di Meo, I., Mineri, R., Tiveron, C., Levitt, M. D., Prelle, A., Fagiolari, G., Rimoldi, M., and Zeviani, M. (2009) Loss of ETHE1, a mitochondrial dioxygenase, causes fatal sulfide toxicity in ethylmalonic encephalopathy. *Nat. Med.* 15, 200–205 Cross-Ref Medline
- Melideo, S. L., Jackson, M. R., and Jorns, M. S. (2014) Biosynthesis of a central intermediate in hydrogen sulfide metabolism by a novel human sulfurtransferase and its yeast ortholog. *Biochemistry* 53, 4739–4753 CrossRef Medline
- Dóka, É., Ida, T., Dagnell, M., Abiko, Y., Luong, N. C., Balog, N., Takata, T., Espinosa, B., Nishimura, A., Cheng, Q., Funato, Y., Miki, H., Fukuto, J. M., Prigge, J. R., Schmidt, E. E., *et al.* (2020) Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. *Sci. Adv.* 6, eaax8358 CrossRef Medline
- Everett, S. A., Folkes, L. K., Wardman, P., and Asmus, K. D. (1994) Freeradical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation. *Free Radic. Res.* 20, 387–400 CrossRef
- Chauvin, J.-P. R., Griesser, M., and Pratt, D. A. (2017) Hydropersulfides: H-atom transfer agents par excellence. J. Am. Chem. Soc. 139, 6484– 6493 CrossRef Medline
- 19. Serjeant, E. P., and Dempsey, B. (1979) *Ionisation constants of organic acids in aqueous solution*. Pergamon Press, New York
- Benaïchouche, M., Bosser, G., Paris, J., and Plichon, V. (1990) Relative nucleophilicities of aryldisulphide and thiolate ions in dimethylacetamide estimated from their reaction rates with alkyl halides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2 1421–1424 CrossRef
- Cuevasanta, E., Reyes, A. M., Zeida, A., Mastrogiovanni, M., De Armas, M. I., Radi, R., Alvarez, B., and Trujillo, M. (2019) Kinetics of formation and reactivity of the persulfide in the one-cysteine peroxiredoxin from *Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem.* **294**, 13593–13605 CrossRef Medline
- Everett, S. A., and Wardman, P. (1995) Perthiols as antioxidants: radicalscavenging and prooxidative mechanisms. *Methods Enzymol.* 251, 55–69 CrossRef Medline
- Francoleon, N. E., Carrington, S. J., and Fukuto, J. M. (2011) The reaction of H(2)S with oxidized thiols: generation of persulfides and implications to H(2)S biology. *Arch. Biochem. Biophys.* **516**, 146–153 CrossRef Medline
- 24. Ono, K., Akaike, T., Sawa, T., Kumagai, Y., Wink, D. A., Tantillo, D. J., Hobbs, A. J., Nagy, P., Xian, M., Lin, J., and Fukuto, J. M. (2014) Redox chemistry and chemical biology of H₂S, hydropersulfides, and derived species: implications of their possible biological activity and utility. *Free Radic. Biol. Med.* 77, 82–94 CrossRef Medline
- Gold, V. (1983) Glossary of terms used in physical organic chemistry. *Pure Appl. Chem.* 55, 1281–1371 CrossRef
- Garver, J. M., Gronert, S., and Bierbaum, V. M. (2011) Experimental validation of the α-effect in the gas phase. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 13894– 13897 CrossRef Medline
- 27. Edwards, J. O., and Pearson, R. G. (1962) The factors determining nucleophilic reactivities. J. Am. Chem. Soc. 84, 16–24 CrossRef
- 28. Hoz, S. (1982) The α effect: on the origin of transition-state stabilization. *J. Org. Chem.* **47**, 3545–3547 CrossRef
- 29. Um, I.-H., Im, L.-R., and Buncel, E. (2010) Pitfalls in assessing the α -effect: Reactions of substituted phenyl methanesulfonates with HOO-, OH-, and substituted phenoxides in H₂O. *J. Org. Chem.* **75**, 8571–8577 CrossRef Medline
- 30. Bogdándi, V., Ida, T., Sutton, T. R., Bianco, C., Ditrói, T., Koster, G., Henthorn, H. A., Minnion, M., Toscano, J. P., van der Vliet, A., Pluth, M. D., Feelisch, M., Fukuto, J. M., Akaike, T., and Nagy, P. (2019) Speciation of reactive sulfur species and their reactions with alkylating agents: do we have any clue about what is present inside the cell? *Br. J. Pharmacol.* **176**, 646–670 CrossRef Medline
- Pan, J., and Carroll, K. S. (2013) Persulfide reactivity in the detection of protein S-sulfhydration. ACS Chem. Biol. 8, 1110–1116 CrossRef Medline

- Vasas, A., Dóka, É., Fábián, I., and Nagy, P. (2015) Kinetic and thermodynamic studies on the disulfide-bond reducing potential of hydrogen sulfide. *Nitric Oxide Biol. Chem.* 46, 93–101 CrossRef Medline
- 33. Kosower, N. S., Kosower, E. M., Newton, G. L., and Ranney, H. M. (1979) Bimane fluorescent labels: labeling of normal human red cells under physiological conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 3382–3386 CrossRef Medline
- Newton, G. L., Dorian, R., and Fahey, R. C. (1981) Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 114, 383–387 CrossRef Medline
- 35. Wintner, E. A., Deckwerth, T. L., Langston, W., Bengtsson, A., Leviten, D., Hill, P., Insko, M. A., Dumpit, R., VandenEkart, E., Toombs, C. F., and Szabo, C. (2010) A monobromobimane-based assay to measure the pharmacokinetic profile of reactive sulphide species in blood. *Br. J. Pharmacol.* 160, 941–957 CrossRef Medline
- 36. Ditrói, T., Nagy, A., Martinelli, D., Rosta, A., Kožich, V., and Nagy, P. (2019) Comprehensive analysis of how experimental parameters affect H₂S measurements by the monobromobimane method. *Free Radic. Biol. Med.* **136**, 146–158 CrossRef Medline
- Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry* 53, 6113–6125 CrossRef Medline
- Hughes, M. N., Centelles, M. N., and Moore, K. P. (2009) Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 1346–1353 CrossRef Medline
- Bianco, C. L., Akaike, T., Ida, T., Nagy, P., Bogdandi, V., Toscano, J. P., Kumagai, Y., Henderson, C. F., Goddu, R. N., Lin, J., and Fukuto, J. M. (2019) The reaction of hydrogen sulfide with disulfides: formation of a stable trisulfide and implications for biological systems. *Br. J. Pharmacol.* 176, 671–683 CrossRef Medline
- 40. Hoops, S., Sahle, S., Gauges, R., Lee, C., Pahle, J., Simus, N., Singhal, M., Xu, L., Mendes, P., and Kummer, U. (2006) COPASI—a COmplex PAthway SImulator. *Bioinformatics*. **22**, 3067–3074 CrossRef Medline
- Østergaard, H., Tachibana, C., and Winther, J. R. (2004) Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J. Cell Biol.* 166, 337– 345 CrossRef Medline
- Morgan, B., Ezerina, D., Amoako, T. N., Riemer, J., Seedorf, M., and Dick, T. P. (2013) Multiple glutathione disulfide removal pathways mediate cytosolic redox homeostasis. *Nat. Chem. Biol.* 9, 119–125 CrossRef Medline
- Dóka, É., Pader, I., Bíró, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballagó, K., Prigge, J. R., Pastor-Flores, D., Dick, T. P., Schmidt, E. E., Arnér, E. S. J., and Nagy, P. (2016) A novel persulfide detection method reveals protein persulfideand polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. *Sci. Adv.* 2, e1500968 CrossRef Medline
- Zivanovic, J., Kouroussis, E., Kohl, J. B., Adhikari, B., Bursac, B., Schott-Roux, S., Petrovic, D., Miljkovic, J. L., Thomas-Lopez, D., Jung, Y., Miler, M., Mitchell, S., Milosevic, V., Gomes, J. E., Benhar, M., et al. (2019) Selective persulfide detection reveals evolutionarily conserved antiaging effects of S-sulfhydration. *Cell Metab.* **30**, 1152–1170.e13 CrossRef Medline
- Liu, D. K., and Chang, S. G. (1987) Kinetic study of the reaction between cystine and sulfide in alkaline solutions. *Can. J. Chem.* 65, 770–774 CrossRef
- Singh, R., and Whitesides, G. M. (1993) Thiol—disulfide interchange. in *Sulphur-Containing Functional Groups* (Patai, S., and Rappoport, Z. eds.), pp. 633–658, John Wiley & Sons, CrossRef
- Koppenol, W. H., and Bounds, P. L. (2017) Signaling by sulfur-containing molecules. Quantitative aspects. *Arch. Biochem. Biophys.* 617, 3–8 CrossRef Medline
- Sardi, F., Manta, B., Portillo-Ledesma, S., Knoops, B., Comini, M. A., and Ferrer-Sueta, G. (2013) Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. *Anal. Biochem.* 435, 74–82 CrossRef Medline

- 49. Benson, S. W. (1978) Thermochemistry and kinetics of sulfur-containing molecules and radicals. *Chem. Rev.* **78**, 23–35 CrossRef
- Bailey, T. S., Zakharov, L. N., and Pluth, M. D. (2014) Understanding hydrogen sulfide storage: probing conditions for sulfide release from hydrodisulfides. *J. Am. Chem. Soc.* 136, 10573–10576 CrossRef Medline
- Bailey, T. S., and Pluth, M. D. (2015) Reactions of isolated persulfides provide insights into the interplay between H₂S and persulfide reactivity. *Free Radic. Biol. Med.* 89, 662–667 CrossRef Medline
- 52. Kawamura, S., Horii, T., and Tsurugi, J. (1971) Aryl hydrodisulfides. J. Org. Chem. **36**, 3677–3680 CrossRef
- Yu, H.-Z., Yang, Y.-M., Zhang, L., Dang, Z.-M., and Hu, G.-H. (2014) Quantum-chemical predictions of pKa's of thiols in DMSO. J. Phys. Chem. A. 118, 606–622 CrossRef Medline
- 54. Trujillo, M., and Radi, R. (2002) Peroxynitrite reaction with the reduced and the oxidized forms of lipoic acid: new insights into the reaction of peroxynitrite with thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**, 91– 98 CrossRef Medline
- 55. Cuevasanta, E., Zeida, A., Carballal, S., Wedmann, R., Morzan, U. N., Trujillo, M., Radi, R., Estrin, D. A., Filipovic, M. R., and Alvarez, B. (2015) Insights into the mechanism of the reaction between hydrogen sulfide and peroxynitrite. *Free Radic. Biol. Med.* **80**, 93–100 CrossRef Medline
- Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballal, S., Romero, N., Alvarez, B., and Radi, R. (2018) Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem. Rev.* 118, 1338–1408 CrossRef Medline
- 57. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J.-P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 467, 95–106 CrossRef Medline
- Hoffmann, M. R. (1977) Kinetics and mechanism of oxidation of hydrogen sulfide by hydrogen peroxide in acidic solution. *Environ. Sci. Technol.* 11, 61–66 CrossRef
- 59. Haynes, W. M. (2014) *CRC Handbook of Chemistry and Physics*, 95th ed, CRC Press, Oakville
- Zeida, A., Babbush, R., González Lebrero, M. C., Trujillo, M., Radi, R., and Estrin, D. A. (2012) Molecular basis of the mechanism of thiol oxidation by hydrogen peroxide in aqueous solution: challenging the SN2 paradigm. *Chem. Res. Toxicol.* 25, 741–746 CrossRef Medline
- Zeida, A., Lebrero, M. C. G., Radi, R., Trujillo, M., and Estrin, D. A. (2013) Mechanism of cysteine oxidation by peroxynitrite: an integrated experimental and theoretical study. *Arch. Biochem. Biophys.* 539, 81–86 CrossRef Medline
- 62. Zeida, A., Reyes, A. M., Lebrero, M. C. G., Radi, R., Trujillo, M., and Estrin, D. A. (2014) The extraordinary catalytic ability of peroxiredoxins: a combined experimental and QM/MM study on the fast thiol oxidation step. *Chem. Commun.* **50**, 10070–10073 CrossRef Medline
- Eyring, H. (1935) The activated complex in chemical reactions. J. Chem. Phys. 3, 107–115 CrossRef
- Awoonor-Williams, E. and Rowley, C. N. (2018) The hydration structure of methylthiolate from QM/MM molecular dynamics. *J. Chem. Phys.* 149, 045103 CrossRef Medline
- 65. Jencks, W. P., and Carriuolo, J. (1960) Reactivity of nucleophilic reagents toward esters. J. Am. Chem. Soc. 82, 1778–1786 CrossRef
- Ferrer-Sueta, G., Manta, B., Botti, H., Radi, R., Trujillo, M., and Denicola, A. (2011) Factors affecting protein thiol reactivity and specificity in peroxide reduction. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 434–450 CrossRef Medline
- Fina, N. J., and Edwards, J. O. (1973) The alpha effect. A review. Int. J. Chem. Kinet. 5, 1–26 CrossRef
- Buncel, E., and Um, I.-H. (2004) The α-effect and its modulation by solvent. *Tetrahedron*. 60, 7801–7825 CrossRef
- Trummal, A., Lipping, L., Kaljurand, I., Koppel, I. A., and Leito, I. (2016) Acidity of strong acids in water and dimethyl sulfoxide. *J. Phys. Chem. A.* 120, 3663–3669 CrossRef Medline
- Williams, M. (2006) The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. (O'Neil, M. J. ed.) 14th ed., Merck Inc., Whitehouse Station/Rahway, New Jersey CrossRef



- Silverstein, T. P., and Heller, S. T. (2017) pKa values in the undergraduate curriculum: what is the real pKa of water? *J. Chem. Educ.* 94, 690–695 CrossRef
- 72. Landry, A. P., Moon, S., Kim, H., Yadav, P. K., Guha, A., Cho, U.-S., and Banerjee, R. (2019) A catalytic trisulfide in human sulfide quinone oxidoreductase catalyzes coenzyme A persulfide synthesis and inhibits butyrate oxidation. *Cell Chem. Biol.* 26, 1515–1525.e4 CrossRef Medline
- Landry, A. P., Moon, S., Bonanata, J., Cho, U. S., Coitiño, E. L., and Banerjee, R. (2020) Dismantling and rebuilding the trisulfide cofactor demonstrates its essential role in human sulfide quinone oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.* 142, 14295–14306 CrossRef
- Kosower, E. M., and Kosower, N. S. (1995) Bromobimane probes for thiols. *Methods Enzymol.* 251, 133–148 CrossRef Medline
- Nelson, D. P., and Kiesow, L. A. (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 °C (with molar extinction coefficients of H2O2 solutions in the UV). *Anal. Biochem.* 49, 474–478 CrossRef Medline
- 76. Bonanata, J., Turell, L., Antmann, L., Ferrer-Sueta, G., Botasini, S., Méndez, E., Alvarez, B., and Coitiño, E. L. (2017) The thiol of human serum albumin: acidity, microenvironment and mechanistic insights on its oxidation to sulfenic acid. *Free Radic. Biol. Med.* **108**, 952–962 CrossRef Medline
- 77. Saha, A., Goldstein, S., Cabelli, D., and Czapski, G. (1998) Determination of optimal conditions for synthesis of peroxynitrite by mixing acidified hydrogen peroxide with nitrite. *Free Radic. Biol. Med.* 24, 653–659 CrossRef Medline
- Bohle, D. S., Hansert, B., Paulson, S. C., and Smith, B. D. (1994) Biomimetic synthesis of the putative cytotoxin peroxynitrite, ONOO-, and its characterization as a tetramethylammonium salt. J. Am. Chem. Soc. 116, 7423–7424 CrossRef
- Ellis, K. J., and Morrison, J. F. (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. *Methods Enzymol.* 87, 405–426 CrossRef Medline
- Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B., Petersson, G., et al. (2009) *Gaussian 09.* Gaussian Inc., Wallingford, Connecticut
- Nitsche, M. A., Ferreria, M., Mocskos, E. E., and González Lebrero, M. C. (2014) GPU accelerated implementation of density functional theory for hybrid QM/MM simulations. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 959–967 CrossRef Medline
- Marcolongo, J. P., Zeida, A., Semelak, J. A., Foglia, N. O., Morzan, U. N., Estrin, D. A., González Lebrero, M. C., and Scherlis, D. A. (2018) Chemical reactivity and spectroscopy explored from QM/MM molecular dynamics simulations using the LIO code. *Front. Chem.* 6, 70 CrossRef Medline
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics. J. Mol. Graph. 14, 33–38 CrossRef Medline
- Godbout, N., Salahub, D. R., Andzelm, J., and Wimmer, E. (1992) Optimization of Gaussian-type basis sets for local spin density functional calculations. Part I. Boron through neon, optimization technique and validation. *Can. J. Chem.* **70**, 560–571 CrossRef

- Perdew, J. P., Burke, K., and Ernzerhof, M. (1996) Generalized gradient approximation made simple. *Phys. Rev. Lett.* 77, 3865–3868 CrossRef Medline
- Tomasi, J., Mennucci, B., and Cammi, R. (2005) Quantum mechanical continuum solvation models. *Chem. Rev.* 105, 2999–3094 CrossRef Medline
- Neves, R. P. P., Fernandes, P. A., Varandas, A. J. C., and Ramos, M. J. (2014) Benchmarking of density functionals for the accurate description of thiol–disulfide exchange. *J. Chem. Theory Comput.* **10**, 4842– 4856 CrossRef Medline
- Chai, J.-D., and Head-Gordon, M. (2008) Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom–atom dispersion corrections. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **10**, 6615–6620 CrossRef Medline
- Walker, M., Harvey, A. J., Sen, A., and Dessent, C. E. (2013) Performance of M06, M06-2X, and M06-HF density functionals for conformationally flexible anionic clusters: M06 functionals perform better than B3LYP for a model system with dispersion and ionic hydrogen-bonding interactions. *J. Phys. Chem. A.* **117**, 12590–12600 CrossRef Medline
- 90. Fukui, K. (1981) The path of chemical reactions the IRC approach. *Acc. Chem. Res.* **14**, 363–368 CrossRef
- Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., and Klein, M. L. (1983) Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* **79**, 926–935 CrossRef
- Wang, J., Wolf, R. M., Caldwell, J. W., Kollman, P. A., and Case, D. A. (2004) Development and testing of a general amber force field. *J. Comput. Chem.* 25, 1157–1174 CrossRef Medline
- Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F., DiNola, A., and Haak, J. R. (1984) Molecular dynamics with coupling to an external bath. J. Chem. Phys. 81, 3684–3690 CrossRef
- Torrie, G. M., and Valleau, J. P. (1977) Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: umbrella sampling. *J. Comput. Phys.* 23, 187–199 CrossRef
- Kästner, J. (2011) Umbrella sampling. WIREs Comput. Mol. Sci. 1, 932– 942 CrossRef
- Semelak, J. A., Battistini, F., Radi, R., Trujillo, M., Zeida, A., and Estrin, D. A. (2019) Multi-scale modeling of thiol overoxidation in peroxiredoxins by hydrogen peroxide. *J. Chem. Inf. Model.* CrossRef Medline
- Schneider, T., and Stoll, E. (1978) Molecular-dynamics study of a threedimensional one-component model for distortive phase transitions. *Phys. Rev. B.* 17, 1302–1322 CrossRef
- Kästner, J., and Thiel, W. (2005) Bridging the gap between thermodynamic integration and umbrella sampling provides a novel analysis method: "Umbrella integration". J. Chem. Phys. 123, 144104 CrossRef Medline
- Gerasimov, O. V., and Lymar, S. V. (1999) The yield of hydroxyl radical from the decomposition of peroxynitrous acid. *Inorg. Chem.* 38, 4317– 4321 CrossRef
- 100. Declercq, J. P., Evrard, C., Clippe, A., Stricht, D. V., Bernard, A., and Knoops, B. (2001) Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **311**, 751–759 CrossRef Medline

SUPPORTING INFORMATION

Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide

Dayana Benchoam^{1,2,‡}, Jonathan A. Semelak^{3,‡}, Ernesto Cuevasanta^{1,2,4}, Mauricio Mastrogiovanni^{2,5}, Juan S. Grassano³, Gerardo Ferrer-Sueta^{2,6}, Ari Zeida^{2,5}, Madia Trujillo^{2,5}, Matías N. Möller^{2,6,*}, Darío A. Estrin^{3,*}, and Beatriz Alvarez^{1,2,*}

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay

³Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física, INQUIMAE-CONICET, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, Ciudad Universitaria, Pabellón 2, Buenos Aires 1428, Argentina

⁴Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

⁵Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo 11800, Uruguay

⁶Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo 11400, Uruguay

[‡]These authors contributed equally.

*Corresponding authors: M.N. Möller, D.A. Estrin, B. Alvarez

E-mails: mmoller@fcien.edu.uy, dario@qi.fcen.uba.ar, beatriz.alvarez@fcien.edu.uy

Running title: Acidity and nucleophilicity of glutathione persulfide

List of supplemental materials:

Figure S1. Quantification of GSH and GSSH derivatized with increasing concentrations of mBrB.

Figure S2. Stability of GSS-B.

Table S1. Computed Gibbs energy changes (kcal/mol) of the processes involved in the proton dissociation of MeSH and MeSSH by means of electronic structure methods and PCM solvation models.

Table S2. pH-dependency of the apparent rate and equilibrium constants of Reaction 1.

Figure S3. Dependence of apparent kinetic and equilibrium constants of Reaction 1 with pH.

Figure S4. Characterization of the peroxiredoxin Prx5 variant (Prx5v) used for H₂O₂ quantification.

Figure S5. Calibration curve of H₂O₂ with reduced Prx5v.

Table S3. Gibbs energy barriers (ΔG^{\ddagger} , kcal/mol) for the reactions of MeS⁻ or MeSS⁻ with mBrB, ONOOH, and H₂O₂ obtained from umbrella sampling-QM/MM Gibbs energy profiles (level of theory PBE/dzvp) and comparison with those estimated from experimental measurements.

Table S4. Thermodynamic properties (kcal/mol) for MeS⁻ and MeSS⁻ reactions towards ONOOH and H_2O_2 , both *in vacuo* and with PCM solvated species.

Table S5. Evolution of Mulliken charges (*e*) for the reactions of MeS⁻ or MeSS⁻ with mBrB, ONOOH, and H_2O_2 obtained from umbrella sampling-QM/MM Gibbs energy profiles.

Figure S6. Evolution of solvation patterns of the reactions of MeS^- and $MeSS^-$ with mBrB, ONOOH, and H_2O_2 .



Figure S1. Quantification of GSH and GSSH derivatized with increasing concentrations of mBrB. A mixture of GSSG (3 mM) and H_2S (3 mM) was incubated in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM dtpa) at 25 °C for 35 min. Then, aliquots were 15-fold diluted in the presence of mBrB (1.8-10.3 mM, final concentrations). A. Reversed-phase HPLC of the samples. The asterisks represent contaminants present in mBrB. B. Concentrations of GSH (blue) and GSSH (red) in the mixture derivatized with different concentrations of mBrB. Minimum differences in the detected GSH and GSSH can be explained by the baseline shift that occurs when the concentration of mBrB increases.



Figure S2. Stability of GSS-B. A mixture of GSSG (9 mM) and H_2S (0.5 mM) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4), was incubated at 25 °C for 2 h and derivatized with mBrB (4 mM). The mixture was injected in the reversed-phase HPLC and the peak corresponding to GSS-B (retention time 7.7 min) was collected. Aliquots of the collected peak were re-injected immediately, after 52 min, and after 100 min at 25 °C.

Table S1. Computed Gibbs energy changes (kcal/mol) of the processes involved in the proton dissociation of MeSH and MeSSH by means of electronic structure methods and PCM solvation models.

ХН	Method	XH and H ₂ O desolvation ^a	X-H bond cleavage ^b	X' electron affinity and hydrogen ionization ^c	H ₂ O proton affinity ^d	X ⁻ and H ₃ O ⁺ solvation ^e	Global process ^f
	PBE/dzvp	7.7	73.5	277.5	-156.4	-146.3	56.0
	MP2/dzvp	8.6	64.1	285.5	-153.6	-146.2	58.4
MeSH	$\omega B97x\text{-}D/6\text{-}31~G(d')$	8.0	73.6	283.2	-164.4	-147.1	53.3
	M062X/6-31 G(d')	7.9	75.5	277.5	-162.3	-146.6	52.0
	CCSD/6-31 G(d')	8.1	65.0	293.4	-163.5	-145.4	57.6
	PBE/dzvp	7.9	56.4	278.9	-156.4	-140.5	46.3
	MP2/dzvp	8.9	51.2	283.0	-153.6	-140.7	48.8
MeSSH	$\omega B97x\text{-}D/6\text{-}31~G(d')$	8.3	59.9	280.6	-164.4	-141.6	42.8
	M062X/6-31 G(d')	8.1	59.9	276.8	-162.3	-141.1	41.4
	CCSD/6-31 G(d')	8.4	52.3	290.3	-163.5	-139.8	47.7
Relative difference MeSH-MeSSH	CCSD/6-31 G(d')	-3.7 %	19.5 %	1.1 %	N/A	3.9 %	17.2 %

XH $(aq) + H_2O (aq)$	$\stackrel{f}{\rightleftharpoons}$	$X^{-}(aq) + H_{3}O^{+}(aq)$
a a		↓ e
$XH(g) + H_2O(g)$		$X(g) + H_3O^+(g)$
1 b	C	$\int d$
$\mathbf{X}^{\bullet}(\mathbf{g}) + \mathbf{H}^{\bullet}(\mathbf{g}) + \mathbf{H}_{2}\mathbf{O}(\mathbf{g})$	$\stackrel{c}{\rightleftharpoons}$	$\mathbf{X}^{-}(\mathbf{g}) + \mathbf{H}^{+}(\mathbf{g}) + \mathbf{H}_{2}\mathbf{O}(\mathbf{g})$

	Reacting species	Rate or equilibrium constant at pH 7.4	Equation ^{<i>a,b</i>}
<i>k</i> ₁	HS ⁻ + GSSG	0.23 M ⁻¹ s ⁻¹	$k_{1,\text{pH}} = k_{1,\text{ind}} \frac{K_{a}^{\text{H}_2\text{S}}}{K_{a}^{\text{H}_2\text{S}} + [\text{H}^+]}$
<i>k</i> -1	GS ⁻ + GSSH	1.11 M ⁻¹ s ⁻¹	$k_{-1,\text{pH}} = k_{-1,\text{ind}} \frac{K_{a}^{\text{GSH}}}{K_{a}^{\text{GSH}} + [\text{H}^{+}]} \frac{[\text{H}^{+}]}{K_{a}^{\text{GSSH}} + [\text{H}^{+}]}$
K _{eq1}	HS ⁻ + GSSG GS ⁻ + GSSH	0.194	$K_{eq1,pH} = K_{eq1,ind} \frac{K_{a}^{H_{2}S} \left(K_{a}^{GSH} + [H^{+}]\right) \left(K_{a}^{GSSH} + [H^{+}]\right)}{\left(K_{a}^{H_{2}S} + [H^{+}]\right) K_{a}^{GSH} [H^{+}]}$

Table S2. pH-dependency of the apparent rate and equilibrium constants of Reaction 1.

^{*a*} p*K*_as: H₂S, 6.98 (1); GSH, 8.94 (2); GSSH, 5.45.

^{*b*} k_{pH} and $K_{eq,pH}$ refer to the apparent rate and equilibrium constants, respectively, at a particular pH, *e.g.* 7.4; k_{ind} and $K_{eq,ind}$ are the pH-independent rate and equilibrium constants, respectively, *i.e.* the constants corresponding to the protonation states adequate for reaction.



Figure S3. Dependence of apparent kinetic and equilibrium constants of Reaction 1 with pH. A. pH profile for $k_{1,pH}$ (HS⁻ + GSSG, $k_{pH 7.4} = 0.23$ M⁻¹ s⁻¹) and $k_{-1,pH}$ (GS⁻ + GSSH, $k_{pH 7.4} = 1.11$ M⁻¹ s⁻¹); $k_{1,pH}$ (black) increases as the pH increases owing to the higher availability of the ionized species (HS⁻), while $k_{-1,pH}$ (red) presents a bell shaped profile, since one species needs to be deprotonated (GS⁻) and the other one protonated (GSSH) for the reaction to occur. **B.** pH profile for $K_{eq1,pH}$.



Figure S4. Characterization of the peroxiredoxin Prx5 variant (Prx5v) used for H₂O₂ quantification. The coding sequence of human Prx5 (GenBank accession number: NM 012094NM 001202431) was synthesized and cloned into a pET-15b vector with NdeI and XhoI by Genescript. The plasmid includes a N-terminal 6×His-Tag and thrombin site which results in 21 additional residues. The coding sequence also included 22 extra residues in the C-terminal end. Prx5v was expressed in Escherichia coli and purified as previously described (3). A. The protein migrated as a single band in SDS-PAGE. B. The kinetics of the reaction of reduced protein (0.5 µM) in acetic/MES/tris buffer, pH 7.1, 25 °C towards H₂O₂ (0.02-7.5 mM) was studied by the increase in intrinsic fluorescence ($\lambda_{ex} = 280$ nm, emission cut-off 320 nm) in a stoppedflow spectrofluorimeter. As in the case of the wild-type protein, the plot of k_{obs} versus H₂O₂ concentration was hyperbolic (2, 4). From the plot, a second-order rate constant of reaction with H₂O₂ to form sulfenic acid was calculated to be $(2.9 \pm 0.7) \times 10^5$ M⁻¹ s⁻¹, similar to that of the wild type, 3.0×10^5 M⁻¹ s⁻¹ (pH 7.4, 25 °C (4), $4.3 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 6.9, 25 °C) (2). The plateau, which can be interpreted to represent disulfide formation from sulfenic acid and the resolving cysteine (4), had a value of 127 ± 2 s⁻¹. This is higher than that of the wild type, 14.7 s⁻¹ (pH 7.4, 25 °C) (4), 21 s⁻¹ (pH 6.9, 25 °C) (2), thus, Prx5v minimizes parallel reactions of the sulfenic acid. C. The sequence of the protein was verified by MALDI-TOF MS and MS/MS of tryptic fragments, with 91 % coverage. MALDI-TOF experiments were performed in the facility of the Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay.



Figure S5. Calibration curve of H₂O₂ with reduced Prx5v. H₂O₂ (0-0.5 μ M) was exposed to reduced Prx5v (2 μ M) in phosphate buffer (50 mM, pH 7.4, 0.1 mM dtpa). The fluorescence increase (λ_{ex} = 280 nm, λ_{em} = 340 nm) was measured at 25 °C.

Table S3. Gibbs energy barriers (ΔG^{\ddagger} , kcal/mol) for the reactions of MeS⁻ or MeSS⁻ with mBrB, ONOOH, and H₂O₂ obtained from umbrella sampling-QM/MM Gibbs energy profiles (level of theory PBE/dzvp) and comparison with values estimated from experimental measurements.

	Gibbs energy profiles			Estimated ^{<i>a</i>}				
	∆ <i>G</i> [‡] MeS ⁻	ΔG^{\ddagger} MeSS ⁻	$\Delta\Delta G^{\ddagger b}$	$\Delta G^{\ddagger} \operatorname{GS}^{-}$	$\Delta G^{\ddagger} \text{GSS}^{-}$	$\Delta\Delta G^{\ddagger b}$		
mBrB	6.5 ± 0.6	4.4 ± 0.3	2.1 ± 0.9	14.3	12.1	2.2		
ONOOH	2.7 ± 0.3	2.5 ± 0.5	0.2 ± 0.8	10.6	10.1	0.5		
H_2O_2	6.7 ± 0.4	5.7 ± 0.4	1.0 ± 0.8	15.4	16.2	-0.8		

^{*a*} Estimated from the experimental k_{ind} for GS⁻ and GSS⁻ according to the Transition State Theory, $k = \frac{\tau k_B T}{hC^{\circ}} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT}$ (R, ideal gas constant; T, temperature; k_B and h, Boltzmann and Plank constants; C° , 1 M; τ , transmission coefficient).

^b Values of $\Delta\Delta G^{\ddagger}$ correspond to $\Delta G^{\ddagger}_{\text{thiolate}} - \Delta G^{\ddagger}_{\text{persulfide.}}$

Mathad	MeS ⁻ + (ONOOH	MeSS ⁻ +	ONOOH	$\Delta\Delta G^{a}$	
Methou	ΔG^{\ddagger}	$\Delta G_{ m reac}$	ΔG^{\ddagger}	$\Delta G_{ m reac}$	$\Delta\Delta G^{\ddagger}$	$\Delta\Delta G_{ m reac}$
PBE/dzvp/in vacuo	4.1	-39.9	1.8	-42.8	2.3	2.9
MP2/dzvp/in vacuo	15.6	-57.5	12.4	-56.9	3.2	-0.6
ωB97x-D/6-31 G(d')/ <i>in vacuo</i>	14.5	-45.5	10.5	-47.5	4.1	2.0
M062X/6-31 G(d')/in vacuo	16.2	-48.4	12.5	-49.2	3.7	0.8
PBE/dzvp/PCM	3.2	-43.7	2.5	-44.1	0.7	0.4
MP2/dzvp/PCM	14.6	-61.0	9.7	-59.7	5.0	-1.3
ωB97x-D/6-31 G(d')/PCM	12.8	-48.8	10.2	-47.7	2.6	-1.1
M062X/6-31 G(d')/PCM	14.9	-50.9	11.4	-49.4	3.5	-1.4
Mothod	MeS ⁻ + I	H_2O_2	MeSS ⁻ +	H_2O_2	$\Delta\Delta G^a$	
Method	$MeS^{-} + H$ ΔG^{\ddagger}	H_2O_2 ΔG_{reac}	$\frac{MeSS^{-}+}{\Delta G^{\ddagger}}$	H ₂ O ₂ ΔG _{reac}	$\Delta\Delta G^a$ $\Delta\Delta G^{\ddagger}$	$\Delta\Delta G_{ m reac}$
Method PBE/dzvp/ <i>in vacuo</i>	MeS⁻ + H Δ <i>G</i> [‡] 12.5	$\frac{\mathbf{L}_{2}\mathbf{O}_{2}}{\Delta G_{\text{reac}}}$ -33.8	$\frac{MeSS^{-}+}{\Delta G^{\ddagger}}$ 9.5	H ₂ O ₂ ΔG _{reac} -42.2	$ \Delta \Delta G^a $ $ \Delta \Delta G^{\ddagger} $ 3.0	$\frac{\Delta\Delta G_{\text{reac}}}{8.4}$
Method PBE/dzvp/in vacuo MP2/dzvp/in vacuo	MeS ⁻ + H Δ <i>G</i> [‡] 12.5 20.3	H₂O₂ Δ <i>G</i> _{reac} -33.8 -43.1	MeSS⁻+ Δ <i>G</i> [‡] 9.5 18.4	H_2O_2 ΔG_{reac} -42.2 -47.8	ΔΔG ^a ΔΔG [‡] 3.0 1.9	ΔΔ <i>G</i> _{reac} 8.4 4.7
Method PBE/dzvp/in vacuo MP2/dzvp/in vacuo ωB97x-D/6-31 G(d')/in vacuo	MeS ⁻ + H ΔG [‡] 12.5 20.3 25.2	$ I_2O_2 \Delta G_{reac} -33.8 -43.1 -30.7 $	MeSS⁻+ Δ <i>G</i> [‡] 9.5 18.4 24.2	$ H_2O_2 \Delta G_{reac} -42.2 -47.8 -34.2 $	ΔΔG ^a ΔΔG [‡] 3.0 1.9 1.0	ΔΔG _{reac} 8.4 4.7 3.5
Method PBE/dzvp/in vacuo MP2/dzvp/in vacuo ωB97x-D/6-31 G(d')/in vacuo M062X/6-31 G(d')/in vacuo	MeS ⁻ + F ΔG [‡] 12.5 20.3 25.2 28.6	$ \begin{array}{r} \mathbf{H}_{2}\mathbf{O}_{2} \\ $	MeSS ⁻ + ΔG [‡] 9.5 18.4 24.2 27.9	H_2O_2 ΔG_{reac} -42.2 -47.8 -34.2 -33.8	ΔΔG^a ΔΔG[‡] 3.0 1.9 1.0 0.7	ΔΔ <i>G</i> _{reac} 8.4 4.7 3.5 2.3
Method PBE/dzvp/in vacuo MP2/dzvp/in vacuo ωB97x-D/6-31 G(d')/in vacuo M062X/6-31 G(d')/in vacuo PBE/dzvp/PCM	MeS ⁻ + F ΔG [‡] 12.5 20.3 25.2 28.6 8.4	$ I_2O_2 \Delta G_{reac} -33.8 -43.1 -30.7 -31.5 -39.7 $	MeSS⁻+ Δ <i>G</i> [‡] 9.5 18.4 24.2 27.9 7.5	H ₂ O ₂ ΔG _{reac} -42.2 -47.8 -34.2 -33.8 -44.1	ΔΔG^a ΔΔG[‡] 3.0 1.9 1.0 0.7 0.9	ΔΔ <i>G</i> _{reac} 8.4 4.7 3.5 2.3 4.4
Method PBE/dzvp/in vacuo MP2/dzvp/in vacuo ωB97x-D/6-31 G(d')/in vacuo M062X/6-31 G(d')/in vacuo PBE/dzvp/PCM MP2/dzvp/PCM	MeS ⁻ + F ΔG [‡] 12.5 20.3 25.2 28.6 8.4 15.6	$ \begin{array}{r} I_2O_2 \\ \Delta G_{reac} \\ -33.8 \\ -43.1 \\ -30.7 \\ -31.5 \\ -39.7 \\ -49.4 \\ \end{array} $	MeSS ⁻ + ΔG [‡] 9.5 18.4 24.2 27.9 7.5 15.2	H_2O_2 ΔG_{reac} -42.2 -47.8 -34.2 -33.8 -44.1 -50.5	ΔΔG^a ΔΔG[‡] 3.0 1.9 1.0 0.7 0.9 0.4	ΔΔG _{reac} 8.4 4.7 3.5 2.3 4.4 1.1
Method PBE/dzvp/in vacuo MP2/dzvp/in vacuo ωB97x-D/6-31 G(d')/in vacuo M062X/6-31 G(d')/in vacuo PBE/dzvp/PCM MP2/dzvp/PCM ωB97x-D/6-31 G(d')/PCM	MeS ⁻ + H ΔG [‡] 12.5 20.3 25.2 28.6 8.4 15.6 20.6	$\begin{array}{r} \textbf{H}_2\textbf{O}_2 \\ \hline \Delta G_{reac} \\ \hline -33.8 \\ -43.1 \\ -30.7 \\ -31.5 \\ -39.7 \\ -49.4 \\ -35.3 \end{array}$	MeSS ⁻ + ΔG [‡] 9.5 18.4 24.2 27.9 7.5 15.2 20.9	H_2O_2 ΔG_{reac} -42.2 -47.8 -34.2 -33.8 -44.1 -50.5 -36.0	ΔΔG ^a ΔΔG [‡] 3.0 1.9 1.0 0.7 0.9 0.4 -0.3	ΔΔG _{reac} 8.4 4.7 3.5 2.3 4.4 1.1 0.7

Table S4. Thermodynamic properties (kcal/mol) for MeS⁻ and MeSS⁻ reactions towards ONOOH and H₂O₂, both *in vacuo* and with PCM solvated species.

^{*a*} Values of $\Delta\Delta G$ correspond to $\Delta G_{\text{thiolate}} - \Delta G_{\text{persulfide}}$.

Table S5.	Evolution	of Mulliken	charges (e)	for the	reactions	of MeS	or	MeSS ⁻	with	mBrB,
ONOOH,	and H ₂ O ₂ o	obtained from	ı umbrella s	ampling-	QM/MM	Gibbs en	ergy	y profile	es ^a .	

	mBrB		ONOOI	H	H_2O_2	
	MeS ⁻	MeSS ⁻	MeS ⁻	MeSS ⁻	MeS ⁻	MeSS ⁻
Reactant complex	-0.97	-0.99	-0.84	-0.86	-0.85	-0.90
Transition state	-0.60	-0.57	-0.74	-0.72	-0.68	-0.70
Product complexes	0.09	0.01	0.14	0.18	0.20	0.20
% Charge transferred in the transition state	38	42	12	16	20	22

^{*a*} Average values were computed from windows centered in each reaction stage.


Figure S6. Evolution of solvation patterns of the reactions of MeS⁻ and MeSS⁻ with mBrB, ONOOH, and H_2O_2 . Radial correlation function centered on the nucleophilic sulfur atoms of MeS⁻ (blue) and MeSS⁻ (red), computed from a 50 ps long QM/MM MD with the stochastic Langevin thermostat. A. Free reactant, **B**, reactant complex, **C**, transition state, and **D**, product complex.

References

- 1. Hughes, M. N., Centelles, M. N., and Moore, K. P. (2009) Making and working with hydrogen sulfide: The chemistry and generation of hydrogen sulfide in vitro and its measurement in vivo: a review. *Free Radic. Biol. Med.* **47**, 1346–1353
- Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. *Biochemistry*. 53, 6113–6125
- 3. Declercq, J. P., Evrard, C., Clippe, A., Stricht, D. V., Bernard, A., and Knoops, B. (2001) Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **311**, 751–759
- 4. Trujillo, M., Clippe, A., Manta, B., Ferrer-Sueta, G., Smeets, A., Declercq, J.-P., Knoops, B., and Radi, R. (2007) Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 95–106

Anexo III. Acidity of persulfides and its modulation by the protein environments in sulfide quinone oxidoreductase and thiosulfate sulfurtransferase

Manuscrito aceptado (condicional a revisiones menores) para ser publicado en *J. Biol. Chem.*

Benchoam D., Cuevasanta E., Roman J.V., Banerjee R., Alvarez B.

Acidity of persulfides and its modulation by the protein environments in sulfide quinone oxidoreductase and thiosulfate sulfurtransferase

Dayana Benchoam^{1,2,3}, Ernesto Cuevasanta^{1,2,4,5}, Joseph V. Roman⁶, Ruma Banerjee⁶, and Beatriz Alvarez^{1,2,*}

¹Laboratorio de Enzimología, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ²Centro de Investigaciones Biomédicas (CEINBIO), Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ³Graduate Program in Chemistry, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁴Unidad de Bioquímica Analítica, Centro de Investigaciones Nucleares, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁵Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁵Laboratorio de Fisicoquímica Biológica, Instituto de Química Biológica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; ⁶Department of Biological Chemistry, University of Michigan Medical School, Ann Arbor, 48109 MI, USA.

Running title: Acidity of persulfides and its modulation in SQOR and TST

Keywords: persulfide, thiol, alpha effect, sulfide quinone oxidoreductase, thiosulfate sulfurtransferase, pK_a , rhodanese, hydrogen sulfide

Abstract

Persulfides (RSSH/RSS⁻) participate in sulfur metabolism and are proposed to transduce hydrogen sulfide (H₂S) signaling. Their biochemical properties are poorly understood. Herein, we studied the acidity and nucleophilicity of several low molecular weight persulfides using the alkylating agent, monobromobimane. The different persulfides presented similar pK_a values (4.6-6.3) and pH-independent rate constants $(3.2-9.0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1})$, indicating that the substituents in persulfides affect properties to a lesser extent than in thiols because of the larger distance to the outer sulfur. The persulfides had higher reactivity than thiols with the same pK_a , providing evidence for the alpha effect (enhanced nucleophilicity by the presence of a contiguous atom with high electron density). Additionally, we investigated two enzymes from the human mitochondrial H₂S oxidation pathway that form catalytic persulfide intermediates, sulfide quinone oxidoreductase (SQOR) and thiosulfate sulfurtransferase (TST, rhodanese). The pH dependence of the activities of both enzymes were measured using sulfite and/or cyanide as sulfur acceptors. The TST-catalyzed half-reactions were also studied by stopped-flow fluorescence spectroscopy. Both persulfidated enzymes relied on protonated groups for reaction with the acceptors. Persulfidated SQOR appeared to have a pK_a of 7.8 ± 0.2. Persulfidated TST presented a pK_a of 9.38 \pm 0.04, probably due to a critical active site residue rather than the persulfide itself. The apparent pK_a for the TST thiol was 6.5 ± 0.1 and it reacted in the anionic state with thiosulfate. Overall, our study contributes to a fundamental understanding of persulfide properties and their modulation by protein environments.

Introduction

Persulfides are compounds with the general formula RSSH/RSS⁻. Unlike thiols (RSH/RS⁻) and hydrogen sulfide (H_2S/HS^-), persulfides possess a sulfane sulfur atom, *i.e.* a sulfur bonded to either two sulfurs or to a sulfur and an ionizable hydrogen (1). The term *persulfide* is used in this text for the mixture of hydropersulfide (RSSH) and persulfide anion (RSS⁻) in aqueous solution.

Prominent roles have been assigned to persulfides in biological systems; they participate in sulfur trafficking, biosynthesis and catabolism, and are considered potential transducers of the beneficial physiological effects of H₂S in mammals (2-4). They are endogenously synthesized through H₂S-dependent and -independent pathways. The reaction of H_2S with an oxidized thiol derivative, such as disulfide, sulfenic acid or trisulfide, gives a persulfide in addition to a thiol, water or another persulfide, respectively (5). Additionally, thiols can react with oxidized derivatives of H₂S, such as thiosulfate (SSO₃²⁻), persulfides and polysulfides (HS_nSH, RS_nSH, RS_nSSR, $n \ge 1$) to form persulfides (6). The transfer of sulfur from persulfides to thiols to form new persulfides at the attacking thiol is called transpersulfidation. Other routes for persulfide formation involve free radical-mediated processes (7). Regarding H₂Sindependent pathways, there are several enzymes capable of producing persulfides with sulfur donated by thiols or disulfides (8-10). Persulfides can occur in low molecular weight (LMW) compounds as well as in cysteine residues of proteins. In this sense, micromolar levels of glutathione persulfide (GSSH), cysteine persulfide (CysSSH) and protein persulfides have been reported (10-12).

The extra sulfur in persulfides in comparison with thiols confers unique properties. Protonated persulfides (RSSH) ionize in aqueous solution to give the corresponding anionic species (RSS⁻). LMW persulfides have been found to be more acidic than the analogous thiols due to their weaker S-H bond (13–15). For example, the pK_a of GSSH is 5.45 (13) while that of glutathione (GSH) is 8.94 (16). Thus, at physiological pH, the availability of GSS⁻ is 99 % but that of GS⁻ is oly 2.8 %. Moreover, persulfides possess enhanced nucleophilicity compared to thiols at physiological pH, which results from the combination of two factors. The first factor is the availability of the anionic species (which is a better nucleophile than the protonated one), and the second factor is the high nucleophilic reactivity of the anionic species due to the alpha effect (13), which is caused by the presence of high electron density in the atom adjacent to the nucleophilic atom (17, 18). Furthermore, unlike thiols, persulfides are also electrophilic. Both sulfur atoms are susceptible, and depending on the site of the nucleophilic attack, H₂S or thiol is eliminated. Given the dual reactivity, persulfides decay in aqueous solution. Hence, in vitro preparations of LMW persulfide also contain other species such as thiols, H₂S, disulfides and polysulfides (13, 19). Considering that electrophilicity is mainly ascribed to the protonated species, whose abundance is very low at physiological pH based on the low pK_as reported for LMW persulfides, persulfides are expected to play roles as nucleophiles in biological systems, as in the reaction between GSSH and the enzyme persulfide dioxygenase (or ETHE1). However, some protein persulfides play prominent roles as electrophiles, for example, in the catalytic cycles of the mitochondrial H₂S oxidation enzymes, sulfide quinone oxidoreductase (SQOR, EC 1.8.5.8) and thiosulfate sulfurtransferase (TST, also called rhodanese, EC 2.8.1.1).

SQOR catalyzes the first step of the H₂S oxidation pathway in mitochondria. This step consists of the transfer of sulfur from H₂S to a LMW thiophilic acceptor with the concomitant formation of reduced coenzyme Q₁₀ (CoQ₁₀), which then enters the electron transport chain (20). Human SQOR is a flavoenzyme with a cysteine trisulfide (Cys₃₇₉-S-S-Cys₂₀₁) in the active site (21, 22). Three substrates are involved in its activity, H₂S as sulfur donor, a sulfur acceptor, and CoQ₁₀. The proposed mechanism (21) begins with the attack of HS⁻ on the trisulfide to form two persulfides, one at Cys $_{\rm 379}$ and another at Cys $_{\rm 201},$ which forms a transient charge transfer (CT) complex with the FAD cofactor (Figure 1A, reaction a). The persulfide in Cys₃₇₉ is attacked by a thiophilic acceptor that extracts the sulfane sulfur and releases a thiolate in Cys379, while the CT complex at Cys₂₀₁ is presumed to evolve to a C4a covalent adduct (Figure 1A, reaction b). The thiolate in Cys₃₇₉ attacks the adduct, regenerating the trisulfide and producing FADH₂ (Figure 1A, reaction c). Then, CoQ₁₀ is reduced by FADH₂ to complete the catalytic cycle (Figure 1A, reaction d). Regarding the thiophilic acceptor, GSH has been proposed to be the physiologically preferred substrate, which would lead to GSSH formation (23-25). However, human SQOR exhibits remarkable substrate promiscuity (20). Additional in vitro sulfur acceptors include sulfite (SO_3^{2-}) , cyanide (CN^-) , a second H₂S, methanethiol and coenzyme A, which produce thiosulfate, thiocyanate (SCN⁻), H₂S₂, methane persulfide and coenzyme A persulfide, respectively (20, 21, 23-27). GSSH can be further converted to sulfite by persulfide dioxygenase at the expense of O₂ (23, 28), or to thiosulfate by TST at the expense of sulfite (24).

TST catalyzes the transfer of a sulfane sulfur from a donor to an acceptor using a ping-pong mechanism. The minimal reaction mechanism comprises a first step of nucleophilic attack by an active site cysteine (Cys₂₄₈) on a sulfane sulfur donor, resulting in the release of the first product and formation of a cysteine persulfide on the enzyme (Figure 1B, reaction e). In the second step, the persulfide is attacked by a thiophilic acceptor, releasing the second product and restoring the enzyme to its resting state (Figure 1B, reaction f). Possible sulfur donors include thiosulfate and GSSH (producing sulfite and GSH, respectively), while possible sulfur acceptors include cyanide, sulfite and GSH (generating thiocyanate, thiosulfate and GSSH, respectively) (23, 24, 29). The best characterized reaction is with thiosulfate and cyanide as substrates. The enzyme mechanism can include additional steps, such as the formation of a non-covalent Michaelis complex with thiosulfate before sulfur transfer (30, 31).

In a previous work, we studied the reactions of GSSH with different electrophiles, leading to the determination of the pK_a of GSSH and to quantitative evidence for the enhanced nucleophilicity of GSSH compared to that of a thiolate with the same pK_a , *i.e.* the alpha effect (13). In this work, we extended the investigation to determine the pK_a values of several LMW persulfides, including the cysteine derivative, CysSSH. Considering that the pKa of cysteine as a free amino acid in aqueous solution is different from that of protein cysteine residues, differences are also expected in the pK_a of free CysSSH compared to persulfides formed in proteins. Thus, we aimed to determine the pK_a of the persulfides formed at Cys379 on human SQOR and at Cys248 on human TST. The activities of both enzymes were measured at different pHs using sulfite or cyanide as sulfur acceptors. In addition, the half-reactions between TST persulfide and both sulfur acceptors were studied, representing the first pre-steady state kinetic characterization of TST to our knowledge. Our study elucidates the acidity of various LMW persulfides and reaffirms the alpha effect. It also provides a comparison between free and protein-bound persulfides, revealing that the protein environment can modulate persulfide properties.

Results

LMW persulfides

The pK_a values of several LMW persulfides were studied through the pH-dependency of the reactions with the alkylating agent monobromobimane (mBrB), as described previously for GSSH (13). We took advantage that mBrB produces fluorescent products, is uncharged, and does not accept or release protons within the pH range studied. Additionally, mBrB can be used in pseudo-first order excess, abrogating the need to know the exact persulfide concentration.

Mixtures containing CysSSH, homocysteine persulfide (HcySSH), cysteamine persulfide (CystSSH), β mercaptoethanol persulfide (β -MESSH) or cysteine methyl ester persulfide (CysOMeSSH), produced from H₂S and the corresponding symmetrical LMW disulfide (13), were exposed to excess mBrB at different pH values at 25 °C. The fluorescent time courses were biphasic; the rapid exponential phases were attributed to the reactions with the persulfides, while the linear phases were attributed to those with the corresponding thiols present in the

mixtures, and secondarily, with H₂S (13). Exponential plus straight line functions were fitted, and observed rate constants (kobs) were obtained for each pH and mBrB concentration. The k_{obs} increased linearly with the concentration of mBrB, yielding apparent second-order rate constants at each pH (k_{pH}). All persulfides exhibited the same behavior. Representative plots of the reaction with CysSSH are shown (Figure 2A,B). For each persulfide, the k_{pH} increased sigmoidally with pH, confirming that the anionic species reacts with mBrB (Figure 2C-G). The pK_a values of the persulfides and the pH-independent rate constants (kind) for the reactions with mBrB were determined from these graphs; the k_{ind} value corresponds to the rate constant with completely ionized persulfide. Single- pK_a functions were fitted to the sigmoidal plots, with the exception of the CysOMeSSH data, where a two-p K_a function was fitted, obtaining two microscopic pK_a and k_{ind} that were assigned to the ammonium- and the aminopersulfide anion (Figure 2G). Microscopic pK_{as} have also been reported for reactions of mBrB with several thiols (16, 32).

Our data are summarized in Table 1 and compared to data for thiols. The persulfides had similar pK_a values, 4.6-6.3, and similar k_{ind} for the reaction with mBrB, 3.2-9.0 × $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

SQOR

The acidity of the persulfidated SQOR was evaluated by the pH-dependence of the steady-state rates. For enzymes that catalyze reactions with one substrate, the kinetic parameter k_{cat}/K_m (specificity constant), is an apparent second-order rate constant that reports on the properties of the free enzyme and the free substrate (33). k_{cat}/K_m can be calculated from the kinetic parameters k_{cat} and K_m obtained from typical Michaelis-Menten analysis (Eq. 1). Alternatively, k_{cat}/K_m can be determined by measuring the steady-state reaction rate at low substrate concentrations, and dividing the rate by the enzyme and the initial substrate concentration, [E]_T and [S]_T, respectively (Eq. 2) (34).

$$V_{0} = \frac{V_{max}[S]_{T}}{\kappa_{m} + [S]_{T}} = \frac{k_{cat}[S]_{T}[E]_{T}}{\kappa_{m} + [S]_{T}}$$
Equation 1
When $[S]_{T} << \kappa_{m}, V_{0} = \frac{k_{cat}}{\kappa_{m}}[S]_{T}[E]_{T}$ Equation 2

SQOR uses three substrates: H₂S, a sulfur acceptor and CoQ (Figure 1A). At saturating concentrations of H₂S and CoQ, the k_{cat}/K_m^{Acc} represents the apparent rate constant for the reaction between the sulfur acceptor and the Cys₃₇₉SSH of the bis-persulfidated SQOR, and its pHdependency reports on the pK_a of both free species. Although the pH dependence of human SQOR activity has been reported, the pH dependence of k_{cat}/K_m is unavailable (25). The steady-state activity of SQOR was determined by monitoring the reduction of coenzyme Q1 (CoQ1) at 278 nm at varying pH at 25 °C. Sulfite or cyanide was used as the sulfur acceptor, and saturating concentrations of H_2S (150 μ M) and CoQ₁ (69 μ M, K_m^{CoQ1} = 19 μ M, pH 7.5 (25)) were used. Note that this concentration of H₂S is saturating for the first step of the catalysis (Figure 1A, reaction *a*), K_m^{H2S} $^{(Donor)}$ = 13 μ M at pH 7.5 (25), but not for the second step with H₂S acting as the sulfur acceptor (Figure 1A, reaction b), $K_{\rm m}^{\rm H2S}$ (Acceptor) = 350 μM at pH 7.4 (27). The reaction between the persulfidated enzyme and H_2S (k_{cat}/K_m^{H2S} $^{(Acceptor)}$ = 1.8 × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, pH 7.4) is negligible in the

presence of sulfite ($k_{cat}/K_m^{sulfite} = 2.0 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$, pH 7.4) but comparable to the reaction with cyanide ($k_{cat}/K_m^{cyanide}$ = 5.1 × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, pH 8.5) (25, 27). Therefore, in the experiments with cyanide, the reactions were started with cyanide instead of SQOR so that the contribution of SQOR with H₂S alone could be subtracted.

In experiments with sulfite, steady-state time courses with varying concentrations of sulfite (0.01-8 mM) were recorded, and linear functions were fitted to the first 15-40 s following SQOR addition (Figure 3A). The slope before SQOR addition was subtracted to correct for the background non-enzymatic reduction of CoQ₁, which was minimal. From the hyperbolic fit of the activity versus sulfite concentration plot, (Figure 3B), the kinetic parameters $k_{\rm cat}$ ^{sulfite} and $K_{\rm m}$ ^{sulfite} were obtained, and the $k_{cat}/K_{m}^{sulfite}$ for each pH were calculated. As expected, when the $k_{cat}/K_m^{sulfite}$ were plotted against pH, a bell-shaped profile was obtained (Figure 3C), consistent with a reaction between a deprotonated species and a protonated one. An equation with two pK_a was fitted to the data (Eq. 3), assuming that deprotonated sulfite and protonated SQOR persulfide were the reacting species. From this analysis, a pK_a value of 6.8 ± 0.5 was obtained for sulfite, which is remarkably consistent with the reported value of 6.91 (35). The pK_a attributed to the protonated persulfide on SQOR was 7.7 \pm 0.4. Since sulfite reacts with the persulfide on Cys₃₇₉, it can be inferred that this pK_a corresponds to Cys₃₇₉SSH. Although the assignment to another catalytic residue present in the bis-persulfidated SQOR cannot be excluded, it is unlikely to correspond to the persulfide formed in Cys₂₀₁, since this persulfide is engaged with the FAD cofactor in the formation of the CT complex. The bellshaped fit also revealed a pH-independent $k_{cat}/K_m^{sulfite}$ of $(2.9 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The maximum $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{sulfite}}$ was observed at pH 7.25. Both $k_{\text{cat}}^{\text{sulfite}}$ and $K_{\text{m}}^{\text{sulfite}}$ varied with pH (Figure S1A,B). Of note, the results obtained in these experiments are consistent with previous measurements in potassium phosphate at pH 7.4, which showed a $k_{cat}/K_m^{sulfite}$ of 2.1 × 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ (25 °C) and a second-order rate constant between the enzyme CT complex and sulfite of $3.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (4 °C) (25, 27).

$$k_{\text{pH}} = k_{\text{ind}} \left(\frac{\kappa_{a}^{\text{Acc}^{-}}}{\kappa_{a}^{\text{Acc}^{-}} + [\text{H}^{+}]} \right) \left(\frac{[\text{H}^{+}]}{\kappa_{a}^{\text{RSSH}} + [\text{H}^{+}]} \right)$$
 Equation 3

Kinetic traces with cyanide (Figure 3D) were recorded at varying pH using 90 μ M cyanide, which is lower than the $K_{\rm m}^{\rm cyanide}$ (650 μ M at pH 8.5 (25)). The steady-state rates were obtained from linear fits to the data during the first 4-20 s following cyanide addition, and the slopes before cyanide addition were subtracted. The $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ at each pH was calculated according to Eq. 2 using the enzyme (50 nM) and cyanide (90 µM) initial concentrations. The pHdependence of $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ exhibited bell-shaped behavior and Eq. 3 was fitted to the data (Figure 3E). A p K_a of 8.9 ± 0.2 was obtained for the deprotonated species, consistent with the pK_a of 8.97 expected for HCN under these conditions (I = 0.15 M, 25 °C) (36). It should be noted that the pK_a of HCN changes considerably with temperature and ionic strength; the values often cited, 9.21 and 9.36, correspond to / = 0 at 25 and 20 °C, respectively (36). For the persulfidated enzyme, a pK_a of 7.9 \pm 0.1 was obtained, in excellent agreement with the results with sulfite (7.7 ± 0.4). Furthermore, the pH-independent $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ was $(1.5 \pm 0.8) \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Note that only a small fraction of the pH-independent constant was observed (~7 % at pH

8.4) (Figure 3E), since cyanide, which needs to be deprotonated, has a higher pK_a than the persulfidated enzyme that appears to be protonated for catalysis.

Controls confirmed that the low activities seen at the extreme pH values with sulfite and cyanide were due to reversible changes in protonation states instead of irreversible denaturation of SQOR (Figure S1B). Additionally, the concentrations of H_2S and CoQ_1 used were observed to be saturating at all pHs (Figure S1C).

Attempts to use GSH as sulfur acceptor to assess $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{GSH}}$ at different pHs were unsuccessful. When relatively low concentrations of GSH were used, SQOR reacted with H₂S as acceptor ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{H2S}}$ (A_{cceptor}) = 1.8 × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹, pH 7.4) rather than with GSH ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{GSH}}$ = 1.1 × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹, pH 7.4) (27). On the other hand, construction of Michaelis-Menten hyperbolas required high concentrations of GSH ($K_{\text{m}}^{\text{GSH}}$ = 8 mM, pH 7.4 (27)), which altered the pH of the reaction mixtures, and could not be compensated without changing the ionic strength.

Note that in the pK_a determination experiments chloride (Cl⁻) was avoided since it was found to be a reversible competitive inhibitor of SQOR. At neutral pH with sulfite as sulfur acceptor, relatively similar apparent k_{cat} ^{sulfite} were achieved in the presence and absence of 120 mM chloride, but the apparent K_m ^{sulfite} increased ~20-fold (estimated K_i for chloride was ~7.4 mM) (Figure S1D).

To sum up, the pH experiments with SQOR, summarized in Table 2, suggest that the Cys₃₇₉ persulfide reacts in the protonated state with the nucleophilic sulfur acceptor and has a pK_a of 7.8 ± 0.2.

TST

We first measured TST activity by monitoring formation of thiocyanate at varying pH at 25 °C. Saturating concentrations of thiosulfate (300 mM, $K_m^{\text{thiosulfate}}$ = 18-45 mM (30, 31)) and cyanide concentrations lower than the $K_{\rm m}^{\rm cyanide}$ (300 μ M, $K_{\rm m}^{\rm cyanide}$ = 1.8-2.8 mM, (31) and this work) were used so that the global rates would be limited by the last step of the catalytic mechanism (Figure 1B, reaction f). which involves the rate constant of the reaction between the persulfidated enzyme and cyanide, $k_{cat}/K_{m}^{cyanide}$. The spontaneous reaction between the substrates at different pH was found to be negligible under our conditions, in accordance with reported data (37). A sigmoidal increase in activity with pH was observed, with an apparent pK_a of 8.47 ± 0.06 and a maximum apparent rate constant of (4.0 \pm 0.1) \times 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ at alkaline pH (Figure 4A). Control experiments excluded irreversible enzyme inactivation (Figure S2A). Additionally, controls performed at the most acidic and alkaline pH confirmed that the concentration of thiosulfate was saturating and that the concentration of cyanide was below $K_m^{cyanide}$ (Figure S2B). Of note, the buffer system affected the enzyme activity; with a 300 mM Tris buffer with 120 mM NaCl the activity was < 40 % of that obtained with the ACES/Tris/ethanolamine buffer at the same pH, which contained 15.6 mM Tris and 120 mM NaCl.

Stopped-flow kinetic studies were performed on the isolated half-reactions between TST persulfide and sulfur acceptors. Preformed stocks of TST persulfide were used to monitor its reaction with sulfite or cyanide at varying pH at 25 °C. The reactions were followed by the changes in the intrinsic fluorescence of TST, taking advantage of the higher fluorescence in the thiol versus the persulfidated state, as reported for the bovine enzyme (38). The decrease in fluorescence appears to be due to energy

transfer involving tryptophans and the persulfide, without major folding rearrangements (39), hence it likely reports on persulfide formation.

TST persulfide was exposed to a pseudo-first order excess of sulfite (15 and 75 μ M) or cyanide (25 and 100 μ M), and the increases in the intrinsic fluorescence were recorded (Figure 5A,B). Single exponential functions were fitted to the time courses. The k_{obs} values were divided by the sulfite or cyanide concentration and the second order rate constants, k_{pH} , were determined at each pH. The k_{DH} for both sulfur acceptors showed bell-shape profiles, and the Eq. 3 was fitted (Figure 5C,D). In the case of sulfite, the fit yielded a pK_a of 6.89 ± 0.09 for the deprotonated species, consistent with sulfite ($pK_a = 6.91$ (35)), and a pK_a of 9.38 ± 0.07 for the protonated species. The pHindependent rate constant, k_{ind} , was (2.5 ± 0.1) × 10⁵ M⁻¹ s⁻ ¹ (Figure 5C). With cyanide on the other hand, the fit gave a pK_a of 8.87 \pm 0.06 for the deprotonated species, in agreement with cyanide ($pK_a = 8.97$ (36)), and a pK_a of 9.37 \pm 0.05 for the protonated species. The k_{ind} was $(1.0 \pm 0.1) \times$ $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figure 5D). Notably, the pK_a value for the protonated species (9.37 and 9.38) was the same with both sulfur acceptors and thus, it can be attributed to persulfidated TST. In the case of the bovine enzyme, a previous report suggested pKas of 5.9 and 9.4 for the persulfide derivative (30); our results are in good agreement with the alkaline value.

The k_{ind} for the reaction of TST persulfide with cyanide, $(1.0 \pm 0.1) \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, is 25-fold higher than the maximum rate constant obtained from the activity measurements with 300 mM thiosulfate and 300 μ M cyanide, $4.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Figure 4A). The lower value obtained in the activity measurements can be explained by inhibition at high concentrations of thiosulfate which leads to formation of a dead-end complex between the persulfidated enzyme and thiosulfate (30, 31) (Figure 4B). In fact, with 312 μ M cyanide, 30 mM thiosulfate can already cause inhibition (31). Therefore, the steady-state rates measured herein were strongly affected by thiosulfate inhibition. The extent to which $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ (k₃ in Figure 4B) was affected by thiosulfate inhibition depends on the thiosulfate concentration as well as on the dissociation constant of the dead-end complex K₄, defined as k_{-4}/k_4 (Figure 4B); the observed $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ is given by $k_3/(1+[thiosulfate]/K_4)$. Thus, the pH-dependency of K_4 can influence the experiment, complicating the interpretation. Human TST can be activated by cyanide at high millimolar concentrations (31), which is unlikely to affect our results. Of note, the values of $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ reported for the bovine and human enzymes are $6.0 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (pH 8.7, 40 °C) and 9.5 \times 10 4 M^{-1} s $^{-1}$ (pH 8.5, 0 °C), respectively, under noninhibited conditions (30, 31). At pH 8.5, our stopped-flow estimation of the rate constant between the persulfidated enzyme and cyanide is higher, 2.7×10^6 M⁻¹ s⁻¹ (25 °C), and deserves further exploration. It is worth noting that a reaction between TST persulfide and mBrB was explored at varying pH, to allow comparison with LMW persulfides. However, no such reaction was detected under our conditions.

The kinetics of the reaction of TST thiol with pseudofirst order concentrations of thiosulfate (200 μ M) was investigated in a pH range of 3.68-8.75 and 25 °C. Since thiosulfate does not accept or release protons within the pH range studied, the pH-dependence of the reaction should reveal the pK_a of the TST thiol. The decrease in the intrinsic fluorescence of TST due to persulfide formation. was recorded (Figure 6A). The kinetic traces followed single or double exponential functions, which is consistent with the formation of TST persulfide in two steps, with a noncovalent intermediate (Figure 4B). The smaller k_{obs} , which corresponded to the larger amplitude, was found to increase with pH (Figure 6B), consistent with the thiolate enzyme, rather than the protonated thiol, being the species reacting with thiosulfate. The data followed a twopKa sigmoidal function, indicating the presence of two reacting species with pK_a values of 4.6 ± 0.1 and 6.5 ± 0.1, and second-order rate constants of $\sim 3 \times 10^4$ and $\sim 6 \times 10^4$ M^{-1} s⁻¹ (estimated by dividing the maximal k_{obs} obtained from the fit, 5.9 and 11.5 s⁻¹, respectively, by thiosulfate concentration). This result suggests that the ionization state of a neighboring residue affects the pK_a of the thiol. Our estimated pK_a of 6.5 ± 0.1 can be compared to previous reports; a pK_a of 7.8 was reported for the thiol alone in bovine TST (40), while pK_a values of 6.5 and 6.75-7.05 were reported for the thiol in complex with thiosulfate and with substrate analogs, respectively (30, 40). In human 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase, the thiol was reported to have a pK_a of 5.2 (41). Regarding the rate constants for the reaction of TST thiol with thiosulfate, our value ($\sim 6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) can be compared to the value of $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{thiosulfate}}$ of $1.7 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (40 °C, pH 8.7) reported for the bovine enzyme (30, 31). The $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}^{\text{thiosulfate}}$ parameter represents an algebraic combination of the kinetic constants corresponding to the first and second steps of the mechanism, k_2k_1/k_{-1} (Figure 4C). Last, the kinetic analysis was extended to higher pH values, and a decrease in k_{obs} with a p K_a of ~10 was observed (Figure 6C). This pK_a is comparable to the value of 9.9 reported for an increase in $K_m^{\text{thiosulfate}}$ (i.e., k_1/k_1) at alkaline pH in the bovine enzyme (30), and likely reflects the effect of deprotonation of one or more residues other than the thiol, decreasing the reaction between thiosulfate and the thiolate.

The results with TST are summarized in Table 2. Taken together, our results reveal that the reaction of persulfidated TST with sulfur acceptors is dependent on a protonated residue with a pK_a of 9.38 ± 0.04. In contrast, the TST thiol reacts with thiosulfate in the anionic state, with a pK_a of 6.5 ± 0.1.

Discussion

In this study, the acidity and rate constants of the reaction between mBrB and a series of LMW alkyl persulfides were measured and compared with those of the corresponding thiols. Remarkably, the persulfides studied presented similar acidity, with pK_a values around 5.4. Despite the similarity, when sorted by pK_a , the resulting order was the same as that of the analogous thiols (Table 1). These low pKa values confirm that LMW persulfides exist predominately in the anionic state at physiological pH. Furthermore, the pH-independent rate constants (k_{ind}) for the reaction between the different nucleophilic persulfides with mBrB were similar, $\sim 10^3 \, \text{M}^{-1}$ s^{-1} (Table 1). In contrast, for thiols, both the acidity and the k_{ind} values are spread over a larger range. These results can be visualized in the Brønsted plot shown in Figure 7, which depicts the k_{ind} in logarithmic scale as a function of pK_a for both persulfides and thiols. Clearly, our results demonstrate that substituents exert a limited effect on the pK_a of persulfides in comparison to thiols, likely because of the presence of an additional sulfur, which increases the distance between the substituents and the outer sulfur.

The term alpha effect refers to the increased reactivity of a nucleophile that has an adjacent atom with high electron density in comparison to a normal nucleophile with similar pK_a (17, 18). In the case of persulfides, the positive deviations in the Brønsted plot with respect to the trend followed by the thiolates (Figure 7) (i.e. higher rate constants for persulfides) constitute evidence for the alpha effect in the reaction of alkyl persulfides with mBrB, as previously assessed for GSS⁻ (13). Increased nucleophilicity has also been reported for aromatic persulfides versus thiolates (42), and polysulfides (HS_n⁻) versus HS⁻ (43), although not for zinc polysulfide versus zinc thiolate compounds (44). In addition, higher reactivity of persulfides has been observed in proteins such as human serum albumin and the peroxiredoxin AhpE when reacting with unspecific electrophiles (5, 45). Computational studies also support a higher reactivity for HSS⁻ versus HS⁻, or RSS⁻ versus RS⁻ (5, 13, 46), although the extent of acceleration has been questioned (47). The magnitude of the alpha effect depends not only on the nucleophile but also on the electrophile. For example, GSS⁻ reacts 1670-fold faster than a thiolate with similar basicity with mBrB, but only 3.2-fold faster with hydrogen peroxide (13). The origin of the alpha effect remains elusive; possible explanations include transition state stabilization, ground state destabilization and solvation differences. With persulfides, an attractive hypothesis is the increased stabilization of the biradical character of the transition state (48). In this regard, the free radicals derived from the one-electron oxidation of persulfides are more stable than those derived from thiols (14, 15).

The slope of the Brønsted plot is called β_{nuc} . While the estimation of the β_{nuc} for persulfides was subject to high uncertainty due to the clustered persulfide values in the Brønsted plot, it was lower than the β_{nuc} for thiols ($\beta_{nuc}^{RSSH} = 0.2 \pm 0.1$, $\beta_{nuc}^{RSH} = 0.52 \pm 0.08$) (Figure 7). This is reminiscent of the β_{nuc} difference between oximates and phenoxides (49). Additional studies are needed to understand the basis of the differences in β_{nuc} between persulfides and thiols.

The data on persulfidated SQOR and TST underscore the scope for modulating reactivity by the protein scaffold. The pH-dependence of the SQOR steady-state reaction under conditions that report on the persulfidated enzyme and free sulfite or cyanide, suggest that the persulfide on Cys₃₇₉ is in the protonated state for reaction with the sulfur acceptors and has a p K_a of 7.8 ± 0.2. This increase in p K_a in comparison to a LMW persulfide ($pK_a \sim 5.4$) favors a larger fraction of protonated persulfide on Cys379, which would promote the electrophilic character of the outer sulfur and avoid repulsion with the negative charge of either sulfite or cyanide. The crystal structure of bis-persulfidated SQOR (PDB 6OIB) shows that the Cys379SSH is located in an electropositive cavity that is exposed to solvent (21). No clear hydrogen-bonding partners for the outer sulfur are seen, and the proximity to the anionic persulfide located in Cys₂₀₁ would promote an uncharged Cys₃₇₉SSH (Figure 8).

A serendipitous finding of our work was that SQOR is inhibited by chloride, which competes with sulfite ($K_i \sim 7.4$ mM). Since the chloride concentration in the mitochondrial matrix is estimated to be ~4.2 mM (50), it is possible that SQOR is partially inhibited by chloride *in vivo*.

Interpretation of the steady-state kinetic data on TST is complicated by substrate inhibition by thiosulfate. The pH-dependency of the half reactions indicates that persulfidated TST must be protonated to react with the nucleophilic acceptor with a pK_a of 9.38 ± 0.04. The thiol form of TST has a p K_a of 6.5 ± 0.1 and reacts as an anionic thiolate with thiosulfate. The thiol pK_a in TST is lower than that of a thiol in a typical peptide (\sim 9.1) (51). Although the assignment of the pK_a value of 6.5 \pm 0.1 to a catalytic residue other than the thiol cannot be excluded, the low value is consistent with modulation by the local environment to favor the thiolate form, promoting the nucleophilic attack on the sulfur donor in the first halfreaction. The low pK_a is also consistent with a role as leaving group in the second half-reaction, since leaving group potential correlates with acidity. From a structural point of view, the thiol acidity is likely sustained by hydrogen bonds formed between the thiolate and surrounding water, backbone and sidechain groups (52). Regarding persulfidated TST, the available structural information for the bovine enzyme (PDB 1RHD and 1BOH) (Figure 8) suggests that the persulfide remains in the anionic state due to the establishment of hydrogen bonds (52, 53). The conformational differences between the thiolate and persulfide forms of TST appear to be minimal based on the crystal structures (52). Based on this analysis, it is likely that the pK_a of 9.38 \pm 0.04 corresponds to a different active site residue, which needs to be protonated for the reaction to occur. A potential candidate is Lys₂₅₀, that is located two residues apart from the critical Cys₂₄₈ and has been reported to be important for activity (54). Provision of a positive charge by Lys₂₅₀ would help stabilize the negative charges on the sulfur acceptor and the anionic persulfide.

In summary, our results provide evidence for the existence of the alpha effect in nucleophilic reactions in a series of LMW persulfides and demonstrate that their pK_a values and rate constants lie within a narrow range, consistent with the substituents being farther away from the outer sulfur than in thiols. Our results also reveal that the low pK_a values obtained for the LMW persulfides cannot be extrapolated to protein persulfides where the active site environments modulate the acidity and tune the reactivity.

Experimental procedures

Reagents, solutions and buffer systems

Stocks of cystine (Sigma) and homocystine (Sigma) were dissolved in 0.1 M NaOH and used immediately. Solutions of cystamine (Fluka), hydroxyethyl disulfide (HED, Aldrich) and cystine dimethyl ester (Aldrich) were prepared in 0.1 M sodium phosphate with 0.1 mM diethylenetriamine pentaacetic acid (DTPA, Acros). Stocks of H₂S were prepared from crystals of Na₂S·9H₂O (Carlo Erba or Sigma) stored under argon in a desiccator; they were washed with distilled water and dissolved in ultrapure water the day of the experiment. Concentrated stocks of mBrB (Sigma) were prepared in acetonitrile (Applichem); dilutions were freshly prepared in buffer and quantified by absorbance at 396 nm ($\epsilon_{396} = 5,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (55). Stocks of 10 % 1,2-diheptanoyl-sn-glycero-3phosphocholine (DHPC, Avanti Polar Lipids) were prepared in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8. Solutions of sodium sulfite (Sigma), sodium thiosulfate (Amresco) and potassium cyanide (Sigma or Biopack) were freshly prepared in ultrapure water. For TST activity assays, thiosulfate and cyanide were prepared in the assay buffer. Potassium thiocyanate (Fluka) standards were prepared in buffer.

Different three-component buffers with constant ionic strength (I = 0.15 M) and variable pH were used, depending on the experiment (56). The acetic/MES/Tris buffer 1× contained 15 mM acetic acid (Dorwil), 15 mM MES (AppliChem or Sigma), 30 mM Tris (AppliChem), 120 mM NaCl (Fluka or Sigma), 0.1 mM DTPA, and varying amounts of HCl or NaOH to adjust the pH in the 3.65-8.75 range. The MES/Tris/ethanolamine buffer 1× consisted of 20 mM MES, 10.4 mM Tris, 10.4 mM ethanolamine (Sigma), 43 mM sodium sulfate (Sigma), 0.1 mM DTPA, and varying amounts of H₂SO₄ or NaOH to adjust the pH in a range of 5.65-9.93. The ACES/Tris/ethanolamine buffer 1× contained 30 mM ACES (Applichem), 15.6 mM Tris, 15.6 mM ethanolamine, 120 mM NaCl, 0.1 mM DTPA, and varying amounts of HCl or NaOH to adjust the pH in the 5.60-10.38 range.

pK_a determination of LMW persulfides by the pHdependence of reactions with mBrB

The p K_a values of CysSSH, HcySSH, CystSSH, β -MESSH and CysOMeSSH were determined by the pH-dependence of the reactions with mBrB, as previously described for GSSH (13).

Persulfide-containing mixtures were prepared by preincubation of the corresponding symmetrical LMW disulfides with substoichiometric amounts of H₂S for 30-60 min at room temperature in sodium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.4, 0.1 mM DTPA) (13). Specifically, 3 mM cystine, 5 mM homocystine, 3 mM cystamine, 40 mM HED or 2 mM cystine dimethyl ester were mixed with 0.6, 1, 0.6, 8 and 0.4 mM H₂S, to form mixtures containing CysSSH, HcySSH, CystSSH, β -MESSH and CysOMeSSH, respectively. The disulfides were chosen based on their commercial availability and on the considerable variations in the pK_a of the corresponding thiols (16). The concentrations of the disulfides and H₂S in each case were chosen according to the rate constant of each reaction (5).

The kinetics of the reactions of LMW persulfides with mBrB were followed in a stopped-flow spectrofluorimeter (Applied Photophysics SX20) under pseudo-first-order conditions with mBrB in excess. Persulfide-containing mixtures were 50-fold diluted in ultrapure water and reacted with 50-170 μ M mBrB (final concentrations), prepared in acetic/MES/Tris buffer 2× with varying pH. The fluorescence (λ_{ex} = 396 nm, emission cut-off 435 nm) of the products was recorded at 25 °C. The final pH values of the reaction mixtures were measured. The data were analyzed with OriginPro 2021.

SQOR activity assays

Human SQOR was expressed and purified as reported previously (24, 25). SQOR concentration was determined from the FAD absorbance at 450 nm, using $\varepsilon = 11,500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (25). Daily stocks of 0.4 μ M SQOR were prepared in 50 mM Tris buffer with 100 mM sulfate and 0.03 % DHPC, pH 8.0.

The activity of SQOR was measured at different pHs in a temperature-controlled spectrophotometer (Shimadzu UV-2600 or UV-1900i). The steady-state rate of reduction of CoQ_1 (Sigma-Aldrich or Cayman Chemical),

was followed at 278 nm (ϵ = 12,000 M⁻¹ cm⁻¹ (25)) in MES/Tris/ethanolamine buffer with pH in the 5.65-9.93 range at 25 °C.

In experiments with sulfite as the sulfur acceptor, the reactions contained the corresponding buffer with 69 μ M CoQ₁, 0.03 % DHPC, 0.06 mg/mL BSA, 150 μ M H₂S, 1 nM SQOR, and varying concentrations of sulfite (0.01-8 mM), in a total volume of 1.2 mL with minimum headspace. The reactions were initiated by addition of SQOR. The cuvette was capped during the experiment to avoid H₂S leakage. At the end of each experiment, the final pH values of the reaction mixtures were measured. The steady-state rates were calculated from the linear fits after SQOR was added; the small slopes before addition of SQOR were subtracted.

Experiments with cyanide as the sulfur acceptor were carried out similarly, but using 90 μ M cyanide instead of sulfite, and 50 nM SQOR. Reactions were started with cyanide instead of enzyme.

To ensure that CoQ1 and H2S were saturating at all pH values, the activity of SQOR at the extreme pH values was measured using 0.8 or 4 mM sulfite and 1 or 2 nM SQOR, and compared to the activity with higher concentrations of either H_2S (300 μ M) or CoQ₁ (108 μ M). To control for the lack of irreversible inactivation at the extreme pHs, 6 nM preincubated SQOR was for 20-40 s in MES/Tris/ethanolamine buffer at pH 5.65, 7.25 or 9.43 with 0.03 % DHPC in a total volume of 200 µL. Then, the activity was measured as in a typical assay but using the preincubated enzyme and 0.8 mM sulfite in 82 mM Tris buffer with 82 mM sulfate, pH 7.4 (final concentrations).

Experiments in the presence of chloride were performed as in the regular assay with sulfite as the sulfur acceptor but in the acetic/MES/Tris buffer (pH 7.17), which contained 120 mM NaCl instead of sulfate.

TST activity assays

Human TST was expressed and purified as described previously (24). The concentration was estimated using an absorption coefficient calculated from the amino acid sequence (ϵ_{280} = 53,400 M⁻¹ cm⁻¹) (57).

The activity of TST was measured at different pH values and 25 °C by the steady-state rate of thiocyanate formation. The enzyme (5-100 nM) was reacted with 300 μM thiosulfate and 300 mΜ cyanide in ACES/Tris/ethanolamine buffer in a pH range of 7.03-10.12. After 30-90 s, the reactions were stopped by removing 305 µL aliquots, and mixing them with 20 µL of 38 % formaldehyde (Biopack) and 25 μ L of 140 mM FeCl₃·6H₂O (Sigma-Aldrich) diluted in 32.5 % HNO₃ (Dorwil). Absorbances at 460 nm (Varian Cary 60, Agilent) were recorded immediately and interpolated into a 0-30 μ M thiocyanate calibration curve. The thiocyanate standards were prepared daily in ACES/Tris/ethanolamine buffer, pH 7.8, and underwent the same procedures as the samples (1).

To ensure that the thiosulfate concentration was saturating and that the cyanide concentration was below the K_m^{cyanide} , TST activity was measured at the most acidic and alkaline pHs tested, using 400 mM thiosulfate and 300 μ M cyanide or 300 mM thiosulfate and 150 μ M cyanide, at pH 7.1 and 9.7. To control for the lack of irreversible inactivation, 5 nM TST was incubated with 300 mM thiosulfate and 300 μ M cyanide at pH 7.1, in a total volume of 1.39 mL. After 220 s, 5 μ L of 5 M NaOH were added,

changing the pH to 8.5. The concentrations of thiocyanate produced at 252 and 310 s were measured as described.

Stopped-flow kinetics of TST reactions

The pH-dependency of the reactions of TST persulfide with sulfur acceptors and of TST thiol with thiosulfate were studied by following changes in the intrinsic fluorescence (λ_{ex} = 295 nm, US 360 nm bandpass filter) in the stopped-flow spectrofluorimeter.

To prepare persulfidated TST, stocks (~20 μ M) were incubated with ~150 μ M thiosulfate for 15 min at room temperature. The remaining thiosulfate and the formed sulfite were removed with a PD MidiTrap G-25 column (Cytiva) equilibrated with 10 mM Tris buffer, pH 8.5. The persulfidated TST was diluted in ultrapure water (0.8-1 μ M, ~1 mM Tris) and reacted with sulfite (15 and 75 μ M) or cyanide (25 and 100 μ M, final concentrations) prepared in ACES/Tris/ethanolamine buffer 2× in a pH range of 5.60-10.38, at 25 °C. The increase in intrinsic fluorescence due to thiol formation, was recorded between 0.025-10 s. The final pH of the reaction mixtures was measured.

To prepare TST thiol, ~100 μ M thiosulfate was added to TST stocks (~20 μ M) at room temperature. After 15 min, ~200 μ M cyanide was added and left to react for 10 min. The remaining LMW compounds were removed with a PD MidiTrap G-25 column equilibrated with 10 mM Tris buffer, pH 8.5. The TST thiol was diluted in ultrapure water (0.9-1 μ M) and reacted with thiosulfate (200 μ M, final concentrations) prepared in either acetic/MES/Tris buffer 2× (pH 3.68-8.75) or in ACES/Tris/ethanolamine buffer 2× (pH 6.68-10.34), at 25 °C. The decrease in the intrinsic fluorescence caused by persulfide formation, was recorded between 0.8-5 s, and the final pH was measured.

Data Availability

All data are contained within the manuscript and in the supporting information.

Supporting information

This article contains supporting information.

Acknowledgements

We thank Aaron Landry (University of Michigan, USA) and Mariana Bonilla (Institut Pasteur de Montevideo, Uruguay) for help with the SQOR and TST experiments, respectively. We thank Gerardo Ferrer-Sueta, Matías Möller and Jenner Bonanata (Universidad de la República, Uruguay), and Jonathan Semelak and Darío Estrin (Universidad de Buenos Aires, Argentina) for helpful discussions.

Funding and additional information

This work was supported in part by grants from the Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República to B.A., E.C. and D.B., from the ECOS Sud program to B.A. (U20B01), and from the National Institutes of Health to R.B. (R35-GM130183) and to J.V.R. (F32-GM144988). D.B. was partially supported by Comisión Académica de Posgrado (CAP), Universidad de la República, by PEDECIBA (Uruguay) and by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology (ASBMB, PROLAB award).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- 1. Wood, J. L. (1987) Sulfane sulfur. Meth. Enzymol. 143, 25–29
- Bouillaud, F., and Blachier, F. (2011) Mitochondria and sulfide: a very old story of poisoning, feeding, and signaling? Antioxid. Redox Signal. 15, 379–391
- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018) Chemical biology of H2S signaling through persulfidation. Chem. Rev. 118, 1253–1337
- Mueller, E. G. (2006) Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. Nat. Chem. Biol. 2, 185–194
- Cuevasanta, E., Lange, M., Bonanata, J., Coitiño, E. L., Ferrer-Sueta, G., Filipovic, M. R., and Alvarez, B. (2015) Reaction of hydrogen sulfide with disulfide and sulfenic acid to form the strongly nucleophilic persulfide. J. Biol. Chem. 290, 26866–26880
- Greiner, R., Pálinkás, Z., Bäsell, K., Becher, D., Antelmann, H., Nagy, P., and Dick, T. P. (2013) Polysulfides link H2S to protein thiol oxidation. Antioxid. Redox Signal. 19, 1749–1765
- Zhang, D., Macinkovic, I., Devarie-Baez, N. O., Pan, J., Park, C.-M., Carroll, K. S., Filipovic, M. R., and Xian, M. (2014) Detection of protein S-sulfhydration by a tag-switch technique. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 53, 575–581
- Yadav, P. K., Yamada, K., Chiku, T., Koutmos, M., and Banerjee, R. (2013) Structure and kinetic analysis of H2S production by human mercaptopyruvate sulfurtransferase. J. Biol. Chem. 288, 20002– 20013
- Ida, T., Sawa, T., Ihara, H., Tsuchiya, Y., Watanabe, Y., Kumagai, Y., Suematsu, M., Motohashi, H., Fujii, S., Matsunaga, T., Yamamoto, M., Ono, K., Devarie-Baez, N. O., Xian, M., Fukuto, J. M., and Akaike, T. (2014) Reactive cysteine persulfides and Spolythiolation regulate oxidative stress and redox signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 7606–7611
- Yadav, P. K., Martinov, M., Vitvitsky, V., Seravalli, J., Wedmann, R., Filipovic, M. R., and Banerjee, R. (2016) Biosynthesis and reactivity of cysteine persulfides in signaling. J. Am. Chem. Soc. 138, 289– 299
- Dóka, É., Ida, T., Dagnell, M., Abiko, Y., Luong, N. C., Balog, N., Takata, T., Espinosa, B., Nishimura, A., Cheng, Q., Funato, Y., Miki, H., Fukuto, J. M., Prigge, J. R., Schmidt, E. E., Arnér, E. S. J., Kumagai, Y., Akaike, T., and Nagy, P. (2020) Control of protein function through oxidation and reduction of persulfidated states. Sci Adv. 6, eaax8358
- Dóka, É., Pader, I., Bíró, A., Johansson, K., Cheng, Q., Ballagó, K., Prigge, J. R., Pastor-Flores, D., Dick, T. P., Schmidt, E. E., Arnér, E. S. J., and Nagy, P. (2016) A novel persulfide detection method reveals protein persulfide- and polysulfide-reducing functions of thioredoxin and glutathione systems. Sci Adv. 2, e1500968
- Benchoam, D., Semelak, J. A., Cuevasanta, E., Mastrogiovanni, M., Grassano, J. S., Ferrer-Sueta, G., Zeida, A., Trujillo, M., Möller, M. N., Estrin, D. A., and Alvarez, B. (2020) Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide. J. Biol. Chem. 295, 15466– 15481
- Chauvin, J.-P. R., Griesser, M., and Pratt, D. A. (2017) Hydropersulfides: H-atom transfer agents par excellence. J. Am. Chem. Soc. 139, 6484–6493
- Everett, S. A., Folkes, L. K., Wardman, P., and Asmus, K. D. (1994) Free-radical repair by a novel perthiol: reversible hydrogen transfer and perthiyl radical formation. Free Radic. Res. 20, 387– 400

- Portillo-Ledesma, S., Sardi, F., Manta, B., Tourn, M. V., Clippe, A., Knoops, B., Alvarez, B., Coitiño, E. L., and Ferrer-Sueta, G. (2014) Deconstructing the catalytic efficiency of peroxiredoxin-5 peroxidatic cysteine. Biochemistry. 53, 6113–6125
- 17. Jencks, W. P., and Carriuolo, J. (1960) Reactivity of nucleophilic reagents toward esters. J. Am. Chem. Soc. 82, 1778–1786
- Edwards, J. O., and Pearson, R. G. (1962) The factors determining nucleophilic reactivities. J. Am. Chem. Soc. 84, 16–24
- Benchoam, D., Cuevasanta, E., Semelak, J. A., Mastrogiovanni, M., Estrin, D. A., Möller, M. N., and Alvarez, B. (2023) Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method. Free Radic Biol Med. 207, 63–71
- Landry, A. P., Ballou, D. P., and Banerjee, R. (2021) Hydrogen Sulfide Oxidation by Sulfide Quinone Oxidoreductase. Chembiochem. 22, 949–960
- Landry, A. P., Moon, S., Kim, H., Yadav, P. K., Guha, A., Cho, U.-S., and Banerjee, R. (2019) A catalytic trisulfide in human sulfide quinone oxidoreductase catalyzes coenzyme A persulfide synthesis and inhibits butyrate oxidation. Cell Chem Biol. 26, 1515-1525.e4
- Jackson, M. R., Loll, P. J., and Jorns, M. S. (2019) X-Ray structure of human sulfide:quinone oxidoreductase: Insights into the mechanism of mitochondrial hydrogen sulfide oxidation. Structure. 27, 794-805.e4
- Hildebrandt, T. M., and Grieshaber, M. K. (2008) Three enzymatic activities catalyze the oxidation of sulfide to thiosulfate in mammalian and invertebrate mitochondria. FEBS J. 275, 3352– 3361
- Libiad, M., Yadav, P. K., Vitvitsky, V., Martinov, M., and Banerjee, R. (2014) Organization of the human mitochondrial hydrogen sulfide oxidation pathway. J. Biol. Chem. 289, 30901–30910
- Jackson, M. R., Melideo, S. L., and Jorns, M. S. (2012) Human sulfide:quinone oxidoreductase catalyzes the first step in hydrogen sulfide metabolism and produces a sulfane sulfur metabolite. Biochemistry. 51, 6804–6815
- Landry, A. P., Ballou, D. P., and Banerjee, R. (2018) Modulation of Catalytic Promiscuity during Hydrogen Sulfide Oxidation. ACS Chem. Biol. 13, 1651–1658
- Landry, A. P., Ballou, D. P., and Banerjee, R. (2017) H2S oxidation by nanodisc-embedded human sulfide quinone oxidoreductase. J. Biol. Chem. 292, 11641–11649
- Kabil, O., and Banerjee, R. (2012) Characterization of patient mutations in human persulfide dioxygenase (ETHE1) involved in H2S catabolism. J. Biol. Chem. 287, 44561–44567
- Melideo, S. L., Jackson, M. R., and Jorns, M. S. (2014) Biosynthesis of a central intermediate in hydrogen sulfide metabolism by a novel human sulfurtransferase and its yeast ortholog. Biochemistry. 53, 4739–4753
- Schlesinger, P., and Westley, J. (1974) An Expanded Mechanism for Rhodanese Catalysis. Journal of Biological Chemistry. 249, 780–788
- Jarabak, R., and Westley, J. (1974) Human liver rhodanese. Nonlinear kinetic behavior in a double displacement mechanism. Biochemistry. 13, 3233–3236
- Sardi, F., Manta, B., Portillo-Ledesma, S., Knoops, B., Comini, M. A., and Ferrer-Sueta, G. (2013) Determination of acidity and nucleophilicity in thiols by reaction with monobromobimane and fluorescence detection. Anal Biochem. 435, 74–82
- Fersht, A. (1999) The meaning of kcat/KM: The specificity constant (Chapter 3: The Basic Equations of Enzyme Kinetics). in Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding, pp. 110–111, W. H. Freeman

- Park, C. (2022) Visual Interpretation of the Meaning of kcat/KM in Enzyme Kinetics. J. Chem. Educ. 99, 2556–2562
- Rhee, J. S., and Dasgupta, P. K. (1985) The second dissociation constant of sulfur dioxide.water. J. Phys. Chem. 89, 1799–1804
- Verhoeven, P., Hefter, G., and May, P. M. (1990) Dissociation constant of hydrogen cyanide in saline solutions. Mining, Metallurgy & Exploration. 7, 185–188
- Kurashova, I., and Kamyshny, A. (2019) Kinetics of Thiocyanate Formation by Reaction of Cyanide and Its Iron Complexes with Thiosulfate. Aquat Geochem. 25, 219–236
- Horowitz, P., and Criscimagna, N. L. (1983) The use of intrinsic protein fluorescence to quantitate enzyme-bound persulfide and to measure equilibria between intermediates in rhodanese catalysis. J. Biol. Chem. 258, 7894–7896
- Cannella, C., Berni, R., Rosato, N., and Finazzi-Agrò, A. (1986) Active site modifications quench intrinsic fluorescence of rhodanese by different mechanisms. Biochemistry. 25, 7319– 7323
- Weng, L., Heinrikson, R. L., and Westley, J. (1978) Active site cysteinyl and arginyl residues of rhodanese. A novel formation of disulfide bonds in the active site promoted by phenylglyoxal. Journal of Biological Chemistry. 253, 8109–8119
- Lec, J.-C., Boutserin, S., Mazon, H., Mulliert, G., Boschi-Muller, S., and Talfournier, F. (2018) Unraveling the mechanism of cysteine persulfide formation catalyzed by 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases. ACS Catal. 8, 2049–2059
- 42. Benaïchouche, M., Bosser, G., Paris, J., and Plichon, V. (1990) Relative nucleophilicities of aryldisulphide and thiolate ions in dimethylacetamide estimated from their reaction rates with alkyl halides. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2. 8, 1421–1424
- Haag, W. R., and Mill, T. (1988) Some reactions of naturally occurring nucleophiles with haloalkanes in water. Environmental Toxicology and Chemistry. 7, 917–924
- Seo, W. T. M., Ballesteros, M. I., and Tsui, E. Y. (2022) Sulfane Decreases the Nucleophilic Reactivity of Zinc Thiolates: Implications for Biological Reactive Sulfur Species. J. Am. Chem. Soc. 144, 20630–20640
- Cuevasanta, E., Reyes, A. M., Zeida, A., Mastrogiovanni, M., De Armas, M. I., Radi, R., Alvarez, B., and Trujillo, M. (2019) Kinetics of formation and reactivity of the persulfide in the one-cysteine peroxiredoxin from Mycobacterium tuberculosis. J. Biol. Chem. 294, 13593–13605
- 46. Ren, Y., and Yamataka, H. (2006) The alpha-effect in gas-phase SN2 reactions revisited. Org Lett. 8, 119–121
- 47. Hansen, T., Vermeeren, P., Bickelhaupt, F. M., and Hamlin, T. A. (2021) Origin of the α -Effect in SN2 Reactions. Angewandte Chemie International Edition. 60, 20840–20848
- 48. Hoz, S. (1982) The α effect: on the origin of transition-state stabilization. J. Org. Chem. 47, 3545–3547
- 49. Buncel, E., and Um, I.-H. (2004) The α -effect and its modulation by solvent. Tetrahedron. 60, 7801
- Jahn, S. C., Rowland-Faux, L., Stacpoole, P. W., and James, M. O. (2015) Chloride concentrations in human hepatic cytosol and mitochondria are a function of age. Biochem Biophys Res Commun. 459, 463–468
- Harris, T. K., and Turner, G. J. (2002) Structural basis of perturbed pKa values of catalytic groups in enzyme active sites. IUBMB Life. 53, 85–98
- Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K. H., and Hol, W. G. (1979) The structure of bovine liver rhodanese. II. The active site in the sulfursubstituted and the sulfur-free enzyme. J. Mol. Biol. 127, 149–162

- Trevino, R. J., Gliubich, F., Berni, R., Cianci, M., Chirgwin, J. M., Zanotti, G., and Horowitz, P. M. (1999) NH2-terminal Sequence Truncation Decreases the Stability of Bovine Rhodanese, Minimally Perturbs Its Crystal Structure, and Enhances Interaction with GroEL under Native Conditions *. Journal of Biological Chemistry. 274, 13938–13947
- Luo, G. X., and Horowitz, P. M. (1994) The sulfurtransferase activity and structure of rhodanese are affected by site-directed replacement of Arg-186 or Lys-249. J Biol Chem. 269, 8220–8225
- 55. Kosower, E. M., and Kosower, N. S. (1995) Bromobimane probes for thiols. Meth. Enzymol. 251, 133–148
- Ellis, K. J., and Morrison, J. F. (1982) Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes. Meth. Enzymol. 87, 405–426
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., and Bairoch, A. (2005) Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. in The Proteomics Protocols Handbook (Walker, J. M. ed), pp. 571–607, Springer Protocols Handbooks, Humana Press, Totowa, NJ, 10.1385/1-59259-890-0:571
- Smith, R. M., Martell, A. E., and Motekaitis, R. J. (1993) NIST Critical stability constants of metal complexes database, NIST standard reference database, U.S. Dept. of Commerce, National Institute of Standards and Technology, Standard Reference Data Program
- Serjeant, E. P., and Dempsey, B. (1979) Ionisation constants of organic acids in aqueous solution, Pergamon Press, Oxford; New York
- Sehnal, D., Bittrich, S., Deshpande, M., Svobodová, R., Berka, K., Bazgier, V., Velankar, S., Burley, S. K., Koča, J., and Rose, A. S. (2021) Mol* Viewer: modern web app for 3D visualization and analysis of large biomolecular structures. Nucleic Acids Research. 49, W431–W437

Figures and Tables



Figure 1. Proposed catalytic mechanisms for human SQOR and TST. (A) The active site cysteine trisulfide in SQOR is attacked by H_2S to form two persulfides, at Cys_{379} and at Cys_{201} ; the latter engages in a transient charge transfer (CT) complex with the FAD cofactor (reaction *a*). Then, a thiophilic acceptor (Acc⁻) attacks $Cys_{379}SSH$ and the sulfane sulfur is transferred, generating AccSH and $Cys_{379}SH$ while the CT complex is proposed to evolve to a transient C4a adduct (reaction *b*). Then, $Cys_{379}SH$ attacks the adduct, regenerating the trisulfide and producing FADH₂ (reaction *c*). Finally, FADH₂ reduces CoQ to CoQH₂, restoring SQOR to its resting state (reaction *d*) (21). **(B)** The active site $Cys_{248}SH$, in TST attacks a sulfane sulfur donor (DS), resulting in the formation of $Cys_{248}SSH$ and release of the first product (D⁻) (reaction *e*). Next, a thiophilic acceptor (Acc⁻) attacks $Cys_{248}SSH$ producing AccSH and restoring the resting enzyme (reaction *f*).



Figure 2. pK_a of LMW persulfides and their reactivity with mBrB. (A) Representative stopped-flow fluorescence kinetic traces (λ_{ex} = 396 nm, emission cut-off 435 nm) of the reaction of CysSSH-containing mixtures with 57.5 μ M mBrB in acetic/MES/Tris buffer (pH 3.65-8.15, 25 °C). Exponential plus straight line functions were fitted to the time courses over 10 half-lives. In some cases, where double exponential plus straight line functions were fitted, the exponential phase with the lower observed rate constant (kobs) and larger amplitude was attributed to the reaction of the persulfide with mBrB. (B) Linear dependence of k_{obs} of CysSS⁻ with mBrB concentration. Circles are quintuplates of k_{obs} obtained for every pH and mBrB concentration. The slope at each pH represents the apparent second-order rate constants, $k_{\rm pH}$. At the more alkaline pH values, a small negative y-intercept was observed, as seen previously with GSSH (13). (C) For CysSS⁻, a single-pK_a function was fitted to the plot of k_{pH} versus pH with data obtained in three independent experiments (black circles, blue squares, and green triangles). A pKa of 5.2 ± 0.1 and a pH-independent second-order rate constant, k_{ind} , of (3.2 ± 0.1) × 10³ M⁻¹ s⁻¹ (parameters ± standard errors of the fit) were determined. As seen previously with GSSH (13), a small decrease of unknown origin in the k_{oH} at the more alkaline pH values was observed. (D-G) The p K_a and k_{ind} of the reactions with mBrB for other LMW persulfides were determined analogously. Plots of k_{pH} versus pH for HcySS⁻ (D), CystSS⁻ (E), β-MESS⁻ (F), and CysOMeSS⁻ (G). In the case of CysOMeSS⁻, a two-pK_a function was fitted, resulting in two sets of pK_a and k_{ind} values that were attributed to the ammonium- and amino-persulfide anion. The obtained values are summarized in Table 1.

		рK _a			k _{ind} with mBrB	
Persulfide	Structure	Persulfide	Analog thiol	∆p <i>K</i> _a	Persulfide (× 10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)	Analog thiol $(M^{-1} s^{-1})$
Cysteine methyl ester (CysOMeSS [−])	[−] S、S → O NH ₃ ⁺	4.6 ± 0.1	6.45 ^a	1.8	3.8 ± 0.4	N.D.
	-s s NH2	6.3 ± 0.6	N.D.	N.D.	5.4 ± 0.8	N.D.
Cysteamine (CystSS ⁻)	$-S^{S}$ NH_{3}^{+}	4.87 ± 0.09	8.21 ^b	3.34	3.9 ± 0.2	N.D.
Cysteine (CysSS [_])	^{-S} s , NH ₃ ⁺ O ⁻	5.2 ± 0.1	8.29 ^c	3.1	3.2 ± 0.1	105 ^c
Glutathione (GSS⁻)	$-O \xrightarrow{O}_{NH_3^+} O \xrightarrow{N}_{H} O \xrightarrow{S^-}_{O} N \xrightarrow{O}_{O^-}$	5.45 ± 0.03 ^d	8.94 ^c	3.49	9.0 ± 0.2 ^d	208 ^c
Homocysteine (HcySS [–])	-s ^{-S}	5.63 ± 0.06	9.1 ^c	3.5	5.4 ± 0.1	N.D.
β-Mercaptoethanol (β-MESS [−])	^{−S} `s∕∕OH	5.8 ± 0.1	9.6 ^c	3.8	7.5 ± 0.4	519 ^c
2-(3-aminopropyl- amino)ethane	-S ^{-S} NH ₂ NH ₂	6.2 ± 0.1 ^e	7.6 ^e	1.4	N.D.	N.D.
Cumyl	-s.s	7.0 ^f	> 10 ^g	> 3	N.D.	N.D.

Table 1. pK_a values of LMW persulfides and the corresponding thiols, and k_{ind} of the reactions with mBrB, at <i>I</i> =	= 0.15 and
25 °C.	

Reported data from a (5), b (58), c (16), d (13), e (15), f (14), g predicted value based on similar thiols (59). N.D., not determined.



Figure 3. pH-dependence of SQOR activity. The steady-state rate of reduction of CoQ₁ was followed by the decrease in absorbance at 278 nm. The assays included 69 μ M CoQ₁, 0.03 % DHPC, 0.06 mg/mL BSA, 150 μ M H₂S and variable concentrations of sulfite or cyanide in MES/Tris/ethanolamine buffer (pH 5.65-9.93, 25 °C). (A) The reactions with sulfite (0.01-8 mM) were started by the addition of 1 nM SQOR. Representative absorbance kinetic traces of CoQ_1 reduction at pH 7.57. The steady-state rates were calculated from the linear fits to the data between 15-30 s after SQOR was added (subtracting the slopes before addition of SQOR). (B) SQOR activity versus sulfite concentration at different pH values. Representative experiments at pH 8.68 (black circles), 7.57 (blue squares), 6.65 (green triangles), and 5.65 (red diamonds). Michaelis-Menten hyperbolas were fitted and yielded the kinetic parameters $K_m^{sulfite}$ (Figure S1A), $k_{cat}^{sulfite}$ (Figure S1B) and $k_{cat}/K_m^{sulfite}$ for each pH. (C) pH-dependence of $k_{cat}/K_m^{sulfite}$. Eq. 3 was fitted to the data obtaining two pK_as, 6.8 \pm 0.5 for the deprotonated species and 7.7 \pm 0.4 for the protonated one. A pH-independent $k_{cat}/K_{m}^{sulfite}$ of 2.9 ± 0.2 × 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ was obtained for the reaction of sulfite with the persulfidated SQOR. (D) The reactions with cyanide (90 µM) contained 50 nM SQOR and were initiated by the addition of cyanide. Representative time courses at different pHs. To calculate the steady-state rates, the slopes in the absence of cyanide were subtracted from those obtained 4-20 s after the addition of cyanide. The $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ at each pH was calculated using Eq. 2. (E) pH-dependence of $k_{cat}/K_m^{cyanide}$. Eq. 3 plus an offset was fitted to the data, yielding a pK_a of 8.9 ± 0.2 for the deprotonated species, a pK_a of 7.9 ± 0.1 for the protonated species, an offset of (-10 ± 5) × 10³ M⁻¹ s⁻¹, and a pHindependent $k_{cat}/K_m^{cyanide}$ of 1.5 ± 0.8 × 10⁶ M⁻¹ s⁻¹ for the reaction of cyanide with the persulfidated SQOR. Values are parameters ± standard errors of the fits.



Figure 4. pH-dependence of TST activity. (A) The steady-state activity of TST (5-100 nM) was measured by the formation of thiocyanate in the presence of thiosulfate (300 mM) and cyanide (300 μ M, lower than K_m^{cyanide}) in ACES/Tris/ethanolamine buffer in the pH range of 7.03-10.12 and 25 °C. A sigmoidal function was fitted to the data of two independent experiments (black circles and blue squares), and yielded an apparent pK_a of 8.47 ± 0.06 and a maximum apparent rate constant of $(4.0 \pm 0.1) \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (parameters ± standard errors of the fit). **(B)** TST catalytic mechanism using thiocyanate and cyanide as substrates and depicting inhibition by high concentrations of thiosulfate (30, 31). **(C)** Steady-state rate equation assuming fast equilibrium for thiosulfate binding and steady-state for the persulfidated enzyme.



Figure 5. Stopped-flow kinetics of TST persulfide with sulfur acceptors. (A,B) Representative fluorescence time courses ($\lambda_{ex} = 295$ nm, US 360 nm bandpass filter) of TST persulfide (0.8-1 µM) exposed to 75 µM sulfite (A) or 25 µM cyanide (B), in ACES/Tris/ethanolamine buffer (pH 5.60-10.38, 25 °C). Single exponential functions were fitted and the derived k_{obs} was divided by the concentration of sulfite or cyanide to give the corresponding k_{pH} . **(C,D)** pH-dependence of k_{pH} . Bell-shaped functions (Eq. 3 or Eq. 3 plus an offset) were fitted to the data, yielding pK_a values of 6.89 ± 0.09 (deprotonated species) and 9.38 ± 0.07 (protonated species), an offset of (3.5 ± 0.9) × 10⁴ M⁻¹ s⁻¹, and a k_{ind} of (2.5 ± 0.1) × 10⁵ M⁻¹ s⁻¹ for the reaction with sulfite (C) and pK_a values of 8.87 ± 0.06 (deprotonated species) and 9.37 ± 0.05 (protonated species), and a k_{ind} of (1.0 ± 0.1) × 10⁷ M⁻¹ s⁻¹ for the reaction with cyanide (parameters ± standard errors of the fits).



Figure 6. Stopped-flow kinetics of TST thiol with thiosulfate. (A) Representative fluorescence time courses ($\lambda_{ex} = 295$ nm, US 360 nm bandpass filter) of TST thiol (0.9 µM) exposed to 200 µM thiosulfate in acetic/MES/Tris buffer (pH 3.68-8.75, 25 °C). Single or double exponential functions were fitted to the data. **(B)** pH-dependence of k_{obs} for a representative experiment. For the double exponential fits, the smaller k_{obs} values, which corresponded to the larger amplitude, were used. Using data from three independent experiments, a two-p K_a sigmoidal function was fitted yielding p K_a values of 4.6 ± 0.1 and 6.5 ± 0.1, and k_{obs} of 5.9 ± 0.6 and 11.5 ± 0.3 s⁻¹, respectively (parameters ± standard errors of the fit). **(C)** pH-dependence of the k_{obs} at alkaline pH values. The reactions were performed as described previously but in ACES/Tris/ethanolamine buffer (pH 6.68-10.34, 25 °C) and a single plus straight line function was fitted to the data to obtain the k_{obs} . Representative of two independent experiments, 5 replicates each.



Figure 7. Comparison of the reactivity of LMW persulfide anions and thiolates with mBrB. Brønsted plot exhibiting pH-independent rate constants (in logarithmic scale) versus pK_a for the reactions of persulfide anions or thiolates with mBrB (I = 0.15 and 25 °C). Red circles: CysOMeSS⁻ (NH₃⁺) (1), CystSS⁻ (2), CysSS⁻ (3), GSS⁻ (4), HcySS⁻ (5), β -MESS⁻ (6), and CysOMeSS⁻(NH₂) (7); $\beta_{nuc} = 0.2 \pm 0.1$ (R² 0.31). The values are depicted in Table 1. Black squares: reported data for LMW thiolates; $\beta_{nuc} = 0.52 \pm 0.08$ (R² 0.85) (16).

	p <i>K</i> a	pH-independent rate constant (M ⁻¹ s ⁻¹)					
		Sulfite	Cyanide	Thiosulfate			
SQOR persulfide	7.8 ± 0.2 ^{<i>a</i>}	$(2.9 \pm 0.2) \times 10^{6}$	$(1.5 \pm 0.8) \times 10^{6}$	No reaction			
TST persulfide	9.38 ± 0.04 ^{<i>a</i>}	$(2.5 \pm 0.1) \times 10^{5}$	$(1.0 \pm 0.1) \times 10^7$	No reaction			
TST thiol	6.5 ± 0.1	No reaction	No reaction	$\sim 6 \times 10^4$			

Table 2. pK_a and rate constants for SQOR and TST, at I = 0.15 and 25 °C.

^{*a*} Values represent mean ± propagated error of the results obtained with sulfite and cyanide.



Figure 8. Persulfides in SQOR and TST. (A) Close-up of the bis-persulfide in the SQOR structure (PDB 6OIB). Residues within 5 Å from $Cys_{379}SSH$, the FAD cofactor and the CoQ substrate are depicted in sticks. (B) Close-up of the persulfide in the bovine TST structure (PDB 1RHD). Residues within 5 Å from Cys_{248} are depicted in sticks. Figures were constructed with Mol* (60).



Figure S1. SQOR activity with sulfite as sulfur acceptor. SQOR activity was measured by monitoring the steady-state rate of reduction of CoQ₁ at 25 °C (see Figure 3B). The assays included CoQ₁, DHPC, BSA, H₂S and sulfite, and were started by the addition of SQOR. **(A)** pH-dependence of the K_m^{sulfite} obtained from the hyperbolic fits in Figure 3B ($K_m^{\text{sulfite}} \pm \text{standard errors of the fits}$). **(B)** $k_{\text{cat}}^{\text{sulfite}}$ of SQOR *versus* pH. Black circles: pH-dependence of the $k_{\text{cat}}^{\text{sulfite}}$ in experiments with MES/Tris/ethanolamine buffer, the values were obtained from the hyperbolic fits in Figure 3B ($k_{\text{cat}}^{\text{sulfite}} \pm \text{standard}$ errors on the fits). Red diamonds: control for lack of irreversible inactivation at the extreme pHs; SQOR was preincubated for 20-40 s in MES/Tris/ethanolamine buffer at pH 5.65, 7.25 or 9.43. The activities of the preincubated SQOR were measured with saturating sulfite (0.8 mM) in 82 mM Tris buffer, final pH of 7.21, 7.36 and 7.48, respectively. Three independent experiments for each pH were conducted. **(C)** Controls to confirm saturating concentrations of H₂S and CoQ₁ at the extreme pHs. The activities of SQOR with 150 μ M H₂S, 69 μ M CoQ₁ and 0.8 or 4 mM sulfite at pH 5.75 or 9.36, respectively (black circles) were compared to the activities using 300 μ M H₂S and 69 μ M CoQ₁ (blue squares) or 150 μ M H₂S and 108 μ M CoQ₁ (red diamonds). The bars represent the mean \pm standard deviation of 3-4 independent experiments per condition. **(D)** SQOR inhibition by chloride. The activity in acetic/MES/Tris buffer containing 120 mM NaCl at pH 7.17 gave an apparent k_{cat}^{sulfite} of (3.1 \pm 0.1) \times 10² s⁻¹ and an apparent K_m^{sulfite} of 2.4 \pm 0.2 mM (parameters \pm standard errors of the fit).



Figure S2. Controls for the pH-dependence of TST activity. The steady-state rate of formation of thiocyanate was measured in ACES/Tris/ethanolamine buffer at 25 °C. **(A)** Control for lack of irreversible inactivation at the most acidic pH tested. TST (5 nM) was incubated with 300 mM thiosulfate and 300 μ M cyanide at pH 7.1. After 220 s, NaOH was added to change the pH to 8.5 and the concentration of thiocyanate was measured at 252 and 310 s. The dashed and solid lines represent the estimated rates. **(B)** Controls to confirm saturating thiosulfate and cyanide concentrations below the K_m^{cyanide} at the extreme pH values. The activities of TST (5 or 10 nM) with 300 mM thiosulfate and 300 μ M cyanide at pH 7.1 and 9.7 (black circles) were compared to the activities in the presence of 300 mM thiosulfate and 150 μ M cyanide (blue squares) or 400 mM thiosulfate and 300 μ M cyanide (red diamonds). The bars represent the mean of two independent measurements per condition.

Anexo IV. Autorización de coautores para realizar una tesis por compendio de artículos

Dear co-authors,

ī am in the process of finishing my Ph.D. thesis. According the to regulations of PEDECIBA-Química from Universidad de la República, Uruguay, I am obliged to ask for permission to include the papers you co-authored in a cumulative Ph.D. thesis as well as to exclude the possibility of using them in other cumulative theses. The thesis will subsequently be available in the electronic database of the university.

I would therefore like to ask for your permission to use the following research articles in my thesis:

Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method; *Free. Radic. Biol. Med.*; published in 2023; Benchoam D., Cuevasanta E., Semelak J.A., Mastrogiovanni M., Estrin D.A., Möller M.N., Alvarez B.

Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide; *J. Biol. Chem.*; published in 2020, Benchoam D., Semelak J.A., Cuevasanta E., Mastrogiovanni M., Grassano J.S., Ferrer-Sueta G., Zeida A., Trujillo M., Möller M.N., Estrin D.A., Alvarez B.

Acidity of persulfides and its modulation by the protein environments in sulfide quinone oxidoreductase and thiosulfate sulfurtransferase; *J. Biol. Chem.*; accepted (subject to minor corrections) in 2023; Benchoam D., Cuevasanta E., Roman J.V., Banerjee R., Alvarez B.

Thank you in advance,

Dayana Benchoan

By signing this document, as a co-author, I authorize Dayana Benchoam to use the research articles mentioned above in her thesis and I agree not to use them in future cumulative theses:



Beatriz Alvarez

Statut Wart

Ernesto Coevasanta

Matías N. Möller

Madia Trujillo

Gerardo Ferrer-Sueta

Jonathan A. Semelak

Ari Zeida Darío A. Estrin

iricio Mastrogiovanni

Ruma Baneriee

Joseph V. Roman

Juan S. Grassano

Anexo V. Actividades adicionales durante el desarrollo de la tesis

La investigación de esta tesis dio lugar a la publicación o aceptación para publicación de los siguientes artículos en revistas arbitradas internacionales:

- <u>Benchoam, D.</u>, Cuevasanta, E., Semelak, J.A., Mastrogiovanni, M., Estrin, D.A., Möller, M.N., Alvarez, B. (2023) *Disulfides form persulfides at alkaline pH leading to potential overestimations in the cold cyanolysis method.* Free Radic. Biol. Med., 207, 63–71.
- <u>Benchoam, D.</u>, Semelak, J.A., Cuevasanta, E., Mastrogiovanni, M., Grassano, J.S., Ferrer-Sueta, G., Zeida, A., Trujillo, M., Möller, M.N., Estrin, D.A., Alvarez, B. (2020) *Acidity and nucleophilic reactivity of glutathione persulfide.* J. Biol. Chem., 295, 15466–15481. <u>Según Scopus, este artículo</u> <u>cuenta con 63 citas hasta la fecha.</u>
- <u>Benchoam D.</u>, Cuevasanta E., Roman J.V., Banerjee R., Alvarez B. Acidity of persulfides and its modulation by the protein environments in sulfide quinone oxidoreductase and thiosulfate sulfurtransferase. Aceptado por J. Biol. Chem. en 2023 sujeto a revisiones menores.

A lo largo de los años, los resultados de esta tesis fueron presentados en congresos nacionales e internacionales, se realizaron 3 presentaciones orales y 15 presentaciones en formato de póster. La *Society for Redox Biology and Medicine* reconoció el trabajo en dos oportunidades, otorgando el premio "SfRBM Trainee Award" en 2020 y 2021.

En el marco de esta tesis, se realizó una pasantía de dos meses durante 2022 en el laboratorio de la Dra. Banerjee de la Universidad de Michigan en Ann Arbor, Estados Unidos. Se obtuvo una beca PROLAB (*Promoting Research Opportunities for Latin American Biochemists*) de la *American Society for Biochemistry and Molecular* para financiar parte de la pasantía.

En respuesta a un artículo publicado en 2019 por investigadores de las Universidades de Shandong y Washington State con resultados no confiables que se solapaban parcialmente con esta tesis, participé en un comentario que fue publicado en la misma revista que el artículo original:

• Cuevasanta, E., <u>Benchoam, D.</u>, Ferrer-Sueta, G., Zeida, A., Denicola, A., Alvarez, B., Möller, M.N. (2019) *Commentary on "Using resonance synchronous spectroscopy to characterize the reactivity and electrophilicity*

of biologically relevant sulfane sulfur". Evidence that the methodology is inadequate because it only measures unspecific light scattering. **Redox Biol.**, 26, 101281.

Durante el desarrollo de esta tesis participé en la publicación de tres revisiones y dos capítulos de libro relacionados al tema de esta tesis:

- <u>Benchoam, D.</u>, Cuevasanta, E., Möller, M.N., Alvarez, B. (2019) *Hydrogen* sulfide and persulfides oxidation by biologically relevant oxidizing species. **Antioxid. Basel Switz.**, 8.
- <u>Benchoam, D.</u>, Cuevasanta, E., Möller, M.N., Alvarez, B. (2020) *Persulfides, at the crossroads between hydrogen sulfide and thiols.* **Essays Biochem.**, 64, 155–168.
- Cuevasanta, E., <u>Benchoam, D.</u>, Semelak, J.A., Möller, M.N., Zeida, A., Trujillo, M., Alvarez, B., Estrin, D.A. (2022) *Possible molecular basis of the biochemical effects of cysteine-derived persulfides*. Front. Mol. Biosci., 9, 975988.
- <u>Benchoam, D.</u>, Cuevasanta, E., Möller, M.N., Alvarez, B. (2022) *Persulfides and their reactions in biological contexts.* Capítulo en "Hydrogen Sulfide: Chemical Biology Basics, Detection Methods, Therapeutic Applications, and Case Studies", **John Wiley & Sons, Ltd**, 49–76.
- Cuevasanta, E., <u>Benchoam, D.</u>, Möller, M.N., Carballal, S., Banerjee, R., Alvarez, B. (2022) *Hydrogen Sulfide and Persulfides.* Capítulo en "Redox chemistry and biology of thiols", **Elsevier**, 451–486.

En el transcurso de esta tesis, se obtuvo financiación y se ejecutó el siguiente proyecto:

• Iniciación a la Investigación 2021, modalidad 1. *Acidez y reactividad de persulfuros biológicos* (abril de 2022 a setiembre 2023). Responsable: Lic. Dayana Benchoam.

En paralelo, se publicó un artículo con los resultados obtenidos en el marco de mi tesina de grado:

 <u>Benchoam, D.</u>, Cuevasanta, E., Julió Plana, L., Capece, L., Banerjee, R., Alvarez, B. (2021) *Heme-thiolate perturbation in cystathionine β-synthase by mercury compounds*. **ACS Omega**, 6, 2192–2205.

Se coorientó una tesina:

• Tesina de grado de la Licenciatura en Bioquímica de la Bach. Janina Lenzi. *Reacción del omeprazol y sulfuro de hidrógeno.* Orientadora: Dra. Beatriz Alvarez, coorientadora: Lic. Dayana Benchoam. Se realizaron tareas de gestión y cogobierno en PEDECIBA-Química:

- Delegada suplente por el orden estudiantil del Consejo Científico del Área Química (febrero a diciembre de 2020).
- Integrante del Comité Organizador y de la Comisión de Logística del Séptimo Encuentro Nacional de Química (ENAQUI 7) (noviembre de 2021).

Entre 2018 y 2023, se realizaron tareas de actividad docente en el curso de grado y posgrado "Enzimología", dictado en la Facultad de Ciencias, UdelaR.

Bibliografía

- [1] Wood, J.L. Sulfane Sulfur. *Methods Enzymol.*, **1987**, *143*, 25–29.
- [2] Wedmann, R.; Onderka, C.; Wei, S.; Szijártó, I.A.; Miljkovic, J.L.; Mitrovic, A.; Lange, M.; Savitsky, S.; Yadav, P.K.; Torregrossa, R.; Harrer, E.G.; Harrer, T.; Ishii, I.; Gollasch, M.; Wood, M.E.; Galardon, E.; Xian, M.; Whiteman, M.; Banerjee, R.; Filipovic, M.R. Improved Tag-Switch Method Reveals That Thioredoxin Acts as Depersulfidase and Controls the Intracellular Levels of Protein Persulfidation. *Chem. Sci. R. Soc. Chem.* 2010, **2016**, 7, 3414–3426.
- [3] Dóka, É.; Ida, T.; Dagnell, M.; Abiko, Y.; Luong, N.C.; Balog, N.; Takata, T.; Espinosa, B.; Nishimura, A.; Cheng, Q.; Funato, Y.; Miki, H.; Fukuto, J.M.; Prigge, J.R.; Schmidt, E.E.; Arnér, E.S.J.; Kumagai, Y.; Akaike, T.; Nagy, P. Control of Protein Function through Oxidation and Reduction of Persulfidated States. Sci. Adv., 2020, 6, eaax8358.
- [4] Dóka, É.; Pader, I.; Bíró, A.; Johansson, K.; Cheng, Q.; Ballagó, K.; Prigge, J.R.; Pastor-Flores, D.; Dick, T.P.; Schmidt, E.E.; Arnér, E.S.J.; Nagy, P. A Novel Persulfide Detection Method Reveals Protein Persulfide- and Polysulfide-Reducing Functions of Thioredoxin and Glutathione Systems. *Sci. Adv.*, **2016**, *2*, e1500968.
- [5] Kessler, D. Enzymatic Activation of Sulfur for Incorporation into Biomolecules in Prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2006**, *30*, 825–840.
- [6] Beinert, H. A Tribute to Sulfur. *Eur. J. Biochem.*, **2000**, *267*, 5657–5664.
- [7] Filipovic, M.R. Persulfidation (S-Sulfhydration) and H2S. *Handb. Exp. Pharmacol.*, **2015**, *230*, 29–59.
- [8] Filipovic, M.R.; Zivanovic, J.; Alvarez, B.; Banerjee, R. Chemical Biology of H2S Signaling through Persulfidation. *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 1253–1337.
- [9] Mishanina, T.V.; Libiad, M.; Banerjee, R. Biogenesis of Reactive Sulfur Species for Signaling by Hydrogen Sulfide Oxidation Pathways. *Nat. Chem. Biol.*, **2015**, *11*, 457–464.
- [10] Ramazzini, B.; Wright, W.C.F. *Diseases of Workers: Translated from the Latin Text De Morbis Artificum, of 1713*; The History of medicine series; Hafner Pub. Co: New York, **1964**.
- [11] Beauchamp, R.O.; Bus, J.S.; Popp, J.A.; Boreiko, C.J.; Andjelkovich, D.A. A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity. *Crit. Rev. Toxicol.*, **1984**, *13*, 25–97.
- [12] Kimura, H. Hydrogen Sulfide (H2S) and Polysulfide (H2Sn) Signaling: The First 25 Years. *Biomolecules*, **2021**, *11*, 896.
- [13] Bouillaud, F.; Blachier, F. Mitochondria and Sulfide: A Very Old Story of Poisoning, Feeding, and Signaling? *Antioxid. Redox Signal.*, **2011**, *15*, 379– 391.
- [14] Cooper, C.E.; Brown, G.C. The Inhibition of Mitochondrial Cytochrome Oxidase by the Gases Carbon Monoxide, Nitric Oxide, Hydrogen Cyanide and Hydrogen Sulfide: Chemical Mechanism and Physiological Significance. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **2008**, *40*, 533–539.
- [15] Grice, K.; Cao, C.; Love, G.D.; Böttcher, M.E.; Twitchett, R.J.; Grosjean, E.; Summons, R.E.; Turgeon, S.C.; Dunning, W.; Jin, Y. Photic Zone Euxinia

during the Permian-Triassic Superanoxic Event. *Science*, **2005**, *307*, 706–709.

- [16] Warenycia, M.W.; Goodwin, L.R.; Benishin, C.G.; Reiffenstein, R.J.; Francom, D.M.; Taylor, J.D.; Dieken, F.P. Acute Hydrogen Sulfide Poisoning: Demonstration of Selective Uptake of Sulfide by the Brainstem by Measurement of Brain Sulfide Levels. *Biochem. Pharmacol.*, **1989**, *38*, 973– 981.
- [17] Goodwin, L.R.; Francom, D.; Dieken, F.P.; Taylor, J.D.; Warenycia, M.W.; Reiffenstein, R.J.; Dowling, G. Determination of Sulfide in Brain Tissue by Gas Dialysis/Ion Chromatography: Postmortem Studies and Two Case Reports. J. Anal. Toxicol., **1989**, *13*, 105–109.
- [18] Savage, J.C.; Gould, D.H. Determination of Sulfide in Brain Tissue and Rumen Fluid by Ion-Interaction Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, **1990**, *526*, 540–545.
- [19] Abe, K.; Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Neuromodulator. J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci., 1996, 16, 1066–1071.
- [20] Hosoki, R.; Matsuki, N.; Kimura, H. The Possible Role of Hydrogen Sulfide as an Endogenous Smooth Muscle Relaxant in Synergy with Nitric Oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *237*, 527–531.
- [21] Cuevasanta, E.; Möller, M.N.; Alvarez, B. Biological Chemistry of Hydrogen Sulfide and Persulfides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2017**.
- [22] Carballal, S.; Trujillo, M.; Cuevasanta, E.; Bartesaghi, S.; Möller, M.N.; Folkes, L.K.; García-Bereguiaín, M.A.; Gutiérrez-Merino, C.; Wardman, P.; Denicola, A.; Radi, R.; Alvarez, B. Reactivity of Hydrogen Sulfide with Peroxynitrite and Other Oxidants of Biological Interest. *Free Radic. Biol. Med.*, **2011**, *50*, 196–205.
- [23] Turell, L.; Möller, M.N.; Orrico, F.; Randall, L.M.; Steglich, M.; Villar, S.; Denicola, A.; Thomson, L. Thiols in Blood. In: *Redox Chemistry and Biology* of Thiols; Elsevier, **2022**; pp. 585–615.
- [24] Olson, K.R.; DeLeon, E.R.; Liu, F. Controversies and Conundrums in Hydrogen Sulfide Biology. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **2014**, *41*, 11–26.
- [25] Furne, J.; Saeed, A.; Levitt, M.D. Whole Tissue Hydrogen Sulfide Concentrations Are Orders of Magnitude Lower than Presently Accepted Values. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol., 2008, 295, R1479-1485.
- [26] Levitt, M.D.; Abdel-Rehim, M.S.; Furne, J. Free and Acid-Labile Hydrogen Sulfide Concentrations in Mouse Tissues: Anomalously High Free Hydrogen Sulfide in Aortic Tissue. *Antioxid. Redox Signal.*, **2011**, *15*, 373–378.
- [27] Vitvitsky, V.; Kabil, O.; Banerjee, R. High Turnover Rates for Hydrogen Sulfide Allow for Rapid Regulation of Its Tissue Concentrations. *Antioxid. Redox Signal.*, **2012**, *17*, 22–31.
- [28] Mustafa, A.K.; Gadalla, M.M.; Sen, N.; Kim, S.; Mu, W.; Gazi, S.K.; Barrow, R.K.; Yang, G.; Wang, R.; Snyder, S.H. H2S Signals through Protein S-Sulfhydration. *Sci. Signal.*, **2009**, *2*, ra72.
- [29] Tsurugi, J.; Abe, Y.; Kawamura, S. Synthesis of 2-Substituted Ethyl Hydrodisulfides. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1970**, *43*, 1890–1892.
- [30] Tsurugi, J.; Nakabayashi, T. Synthesis of Dibenzhydryl and Dibenzyl Pentaand Hexasulfides. *J. Org. Chem.*, **1959**, *24*, 807–810.
- [31] Nakabayashi, T.; Tsurugi, J.; Yabuta, T. Organic Polysulfides.1 IV. Synthesis of Bis(Triphenylmethyl) Polysulfides. *J. Org. Chem.*, **1964**, *29*, 1236–1238.
- [32] Cavallini, D.; De Marco, C.; Mondovi, B. Cleavage of Cystine by a Pyridoxal Model. *Arch. Biochem. Biophys.*, **1960**, *87*, 281–288.
- [33] Bestetti, S.; Medraño-Fernandez, I.; Galli, M.; Ghitti, M.; Bienert, G.P.; Musco, G.; Orsi, A.; Rubartelli, A.; Sitia, R. A Persulfidation-Based Mechanism Controls Aquaporin-8 Conductance. *Sci. Adv.*, **2018**, *4*, eaar5770.
- [34] Barayeu, U.; Schilling, D.; Eid, M.; Xavier da Silva, T.N.; Schlicker, L.; Mitreska, N.; Zapp, C.; Gräter, F.; Miller, A.K.; Kappl, R.; Schulze, A.; Friedmann Angeli, J.P.; Dick, T.P. Hydropersulfides Inhibit Lipid Peroxidation and Ferroptosis by Scavenging Radicals. *Nat. Chem. Biol.*, **2023**, *19*, 28–37.
- [35] Wu, Z.; Khodade, V.S.; Chauvin, J.-P.R.; Rodriguez, D.; Toscano, J.P.; Pratt, D.A. Hydropersulfides Inhibit Lipid Peroxidation and Protect Cells from Ferroptosis. J. Am. Chem. Soc., 2022, 144, 15825–15837.
- [36] Wu, Z.; Barayeu, U.; Schilling, D.; Dick, T.P.; Pratt, D.A. Emergence of (Hydro)Persulfides as Suppressors of Lipid Peroxidation and Ferroptotic Cell Death. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2023**, *76*, 102353.
- [37] Mueller, E.G. Trafficking in Persulfides: Delivering Sulfur in Biosynthetic Pathways. *Nat. Chem. Biol.*, **2006**, *2*, 185–194.
- [38] Bandyopadhyay, T.; Outten, C.E. Chapter 21 The Role of Thiols in Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. In: *Redox Chemistry and Biology of Thiols*; Alvarez, B.; Comini, M.A.; Salinas, G.; Trujillo, M., Eds.; Academic Press, 2022; pp. 487–506.
- [39] Goubern, M.; Andriamihaja, M.; Nübel, T.; Blachier, F.; Bouillaud, F. Sulfide, the First Inorganic Substrate for Human Cells. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, **2007**, *21*, 1699–1706.
- [40] Stipanuk, M.H.; Ueki, I. Dealing with Methionine/Homocysteine Sulfur: Cysteine Metabolism to Taurine and Inorganic Sulfur. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2011**, *34*, 17–32.
- [41] Hildebrandt, T.M.; Grieshaber, M.K. Three Enzymatic Activities Catalyze the Oxidation of Sulfide to Thiosulfate in Mammalian and Invertebrate Mitochondria. *FEBS J.*, **2008**, *275*, 3352–3361.
- [42] Jackson, M.R.; Melideo, S.L.; Jorns, M.S. Human Sulfide:Quinone Oxidoreductase Catalyzes the First Step in Hydrogen Sulfide Metabolism and Produces a Sulfane Sulfur Metabolite. *Biochemistry*, **2012**, *51*, 6804–6815.
- [43] Libiad, M.; Yadav, P.K.; Vitvitsky, V.; Martinov, M.; Banerjee, R. Organization of the Human Mitochondrial Hydrogen Sulfide Oxidation Pathway. J. Biol. Chem., 2014, 289, 30901–30910.
- [44] Landry, A.P.; Ballou, D.P.; Banerjee, R. H2S Oxidation by Nanodisc-Embedded Human Sulfide Quinone Oxidoreductase. *J. Biol. Chem.*, **2017**, 292, 11641–11649.
- [45] Melideo, S.L.; Jackson, M.R.; Jorns, M.S. Biosynthesis of a Central Intermediate in Hydrogen Sulfide Metabolism by a Novel Human Sulfurtransferase and Its Yeast Ortholog. *Biochemistry*, **2014**, *53*, 4739– 4753.
- [46] Kabil, O.; Motl, N.; Strack, M.; Seravalli, J.; Metzler-Nolte, N.; Banerjee, R. Mechanism-Based Inhibition of Human Persulfide Dioxygenase by γ-Glutamyl-Homocysteinyl-Glycine. J. Biol. Chem., **2018**, 293, 12429–12439.

- [47] Goudarzi, S.; Babicz, J.T.; Kabil, O.; Banerjee, R.; Solomon, E.I. Spectroscopic and Electronic Structure Study of ETHE1: Elucidating the Factors Influencing Sulfur Oxidation and Oxygenation in Mononuclear Nonheme Iron Enzymes. J. Am. Chem. Soc., 2018, 140, 14887–14902.
- [48] Ida, T.; Sawa, T.; Ihara, H.; Tsuchiya, Y.; Watanabe, Y.; Kumagai, Y.; Suematsu, M.; Motohashi, H.; Fujii, S.; Matsunaga, T.; Yamamoto, M.; Ono, K.; Devarie-Baez, N.O.; Xian, M.; Fukuto, J.M.; Akaike, T. Reactive Cysteine Persulfides and S-Polythiolation Regulate Oxidative Stress and Redox Signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2014**, *111*, 7606–7611.
- [49] Landry, A.P.; Moon, S.; Kim, H.; Yadav, P.K.; Guha, A.; Cho, U.-S.; Banerjee, R. A Catalytic Trisulfide in Human Sulfide Quinone Oxidoreductase Catalyzes Coenzyme A Persulfide Synthesis and Inhibits Butyrate Oxidation. *Cell Chem. Biol.*, **2019**, *26*, 1515-1525.e4.
- [50] Lu, X.; Zhao, L.; Tong, Y.; Yang, H.; Feng, S. Insights into the Catalytic Mechanism of a Type I Sulfide Quinone Oxidoreductase (SQR) from Acidithiobacillus Caldus. *Syst. Microbiol. Biomanufacturing*, **2023**, *3*, 414– 426.
- [51] Cuevasanta, E.; Lange, M.; Bonanata, J.; Coitiño, E.L.; Ferrer-Sueta, G.; Filipovic, M.R.; Alvarez, B. Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfide and Sulfenic Acid to Form the Strongly Nucleophilic Persulfide. *J. Biol. Chem.*, 2015, 290, 26866–26880.
- [52] Pan, J.; Carroll, K.S. Persulfide Reactivity in the Detection of Protein S-Sulfhydration. *ACS Chem. Biol.*, **2013**, *8*, 1110–1116.
- [53] Francoleon, N.E.; Carrington, S.J.; Fukuto, J.M. The Reaction of H(2)S with Oxidized Thiols: Generation of Persulfides and Implications to H(2)S Biology. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2011**, *516*, 146–153.
- [54] Kabil, O.; Banerjee, R. Characterization of Patient Mutations in Human Persulfide Dioxygenase (ETHE1) Involved in H2S Catabolism. J. Biol. Chem., 2012, 287, 44561–44567.
- [55] Fakhoury, J.N.; Capdevila, D.A.; Giedroc, D.P. Protocol for Using Organic Persulfides to Measure the Chemical Reactivity of Persulfide Sensors. *STAR Protoc.*, **2022**, *3*, 101424.
- [56] Akaike, T.; Ida, T.; Wei, F.-Y.; Nishida, M.; Kumagai, Y.; Alam, M.M.; Ihara, H.; Sawa, T.; Matsunaga, T.; Kasamatsu, S.; Nishimura, A.; Morita, M.; Tomizawa, K.; Nishimura, A.; Watanabe, S.; Inaba, K.; Shima, H.; Tanuma, N.; Jung, M.; Fujii, S.; Watanabe, Y.; Ohmuraya, M.; Nagy, P.; Feelisch, M.; Fukuto, J.M.; Motohashi, H. Cysteinyl-tRNA Synthetase Governs Cysteine Polysulfidation and Mitochondrial Bioenergetics. *Nat. Commun.*, **2017**, *8*, 1177.
- [57] Vasas, A.; Dóka, É.; Fábián, I.; Nagy, P. Kinetic and Thermodynamic Studies on the Disulfide-Bond Reducing Potential of Hydrogen Sulfide. *Nitric Oxide*, **2015**, *46*, 93–101.
- [58] Bianco, C.L.; Akaike, T.; Ida, T.; Nagy, P.; Bogdandi, V.; Toscano, J.P.; Kumagai, Y.; Henderson, C.F.; Goddu, R.N.; Lin, J.; Fukuto, J.M. The Reaction of Hydrogen Sulfide with Disulfides: Formation of a Stable Trisulfide and Implications for Biological Systems. *Br. J. Pharmacol.*, **2019**, *176*, 671–683.
- [59] Liu, D.K.; Chang, S.G. Kinetic Study of the Reaction between Cystine and Sulfide in Alkaline Solutions. *Can. J. Chem.*, **1987**, *65*, 770–774.
- [60] Zivanovic, J.; Kouroussis, E.; Kohl, J.B.; Adhikari, B.; Bursac, B.; Schott-Roux, S.; Petrovic, D.; Miljkovic, J.L.; Thomas-Lopez, D.; Jung, Y.; Miler,

M.; Mitchell, S.; Milosevic, V.; Gomes, J.E.; Benhar, M.; Gonzalez-Zorn, B.; Ivanovic-Burmazovic, I.; Torregrossa, R.; Mitchell, J.R.; Whiteman, M.; Schwarz, G.; Snyder, S.H.; Paul, B.D.; Carroll, K.S.; Filipovic, M.R. Selective Persulfide Detection Reveals Evolutionarily Conserved Antiaging Effects of S-Sulfhydration. *Cell Metab.*, **2019**, *30*, 1152-1170.e13.

- [61] Petrovic, D.; Kouroussis, E.; Vignane, T.; Filipovic, M.R. The Role of Protein Persulfidation in Brain Aging and Neurodegeneration. *Front. Aging Neurosci.*, **2021**, *13*.
- [62] Zhang, D.; Macinkovic, I.; Devarie-Baez, N.O.; Pan, J.; Park, C.-M.; Carroll, K.S.; Filipovic, M.R.; Xian, M. Detection of Protein S-Sulfhydration by a Tag-Switch Technique. Angew. Chem. Int. Ed Engl., 2014, 53, 575–581.
- [63] Cuevasanta, E.; Reyes, A.M.; Zeida, A.; Mastrogiovanni, M.; De Armas, M.I.; Radi, R.; Alvarez, B.; Trujillo, M. Kinetics of Formation and Reactivity of the Persulfide in the One-Cysteine Peroxiredoxin from Mycobacterium Tuberculosis. J. Biol. Chem., 2019, 294, 13593–13605.
- [64] Schilling, D.; Barayeu, U.; Steimbach, R.R.; Talwar, D.; Miller, A.K.; Dick, T.P. Commonly Used Alkylating Agents Limit Persulfide Detection by Converting Protein Persulfides into Thioethers. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2022, 61, e202203684.
- [65] Landry, A.P.; Ballou, D.P.; Banerjee, R. Hydrogen Sulfide Oxidation by Sulfide Quinone Oxidoreductase. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.*, **2021**, 22, 949–960.
- [66] Landry, A.P.; Moon, S.; Bonanata, J.; Cho, U.S.; Coitiño, E.L.; Banerjee, R. Dismantling and Rebuilding the Trisulfide Cofactor Demonstrates Its Essential Role in Human Sulfide Quinone Oxidoreductase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**.
- [67] Munro, A.P.; Williams, D.L.H. Reactivity of Sulfur Nucleophiles towards S-Nitrosothiols. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2, **2000**, 1794–1797.
- [68] Filipovic, M.R.; Miljkovic, J.L.; Nauser, T.; Royzen, M.; Klos, K.; Shubina, T.; Koppenol, W.H.; Lippard, S.J.; Ivanović-Burmazović, I. Chemical Characterization of the Smallest S-Nitrosothiol, HSNO; Cellular Cross-Talk of H2S and S-Nitrosothiols. J. Am. Chem. Soc., 2012, 134, 12016–12027.
- [69] Cortese-Krott, M.M.; Fernandez, B.O.; Santos, J.L.T.; Mergia, E.; Grman, M.; Nagy, P.; Kelm, M.; Butler, A.; Feelisch, M. Nitrosopersulfide (SSNO–) Accounts for Sustained NO Bioactivity of S-Nitrosothiols Following Reaction with Sulfide. *Redox Biol.*, **2014**, *2*, 234–244.
- [70] Kumar, M.R.; Farmer, P.J. Characterization of Polysulfides, Polysulfanes, and Other Unique Species in the Reaction between GSNO and H2S. *Molecules*, **2019**, *24*, 3090.
- [71] Giuffrè, A.; Vicente, J.B. Hydrogen Sulfide Biochemistry and Interplay with Other Gaseous Mediators in Mammalian Physiology. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2018**, *2018*, e6290931.
- [72] Ivanova, L.V.; Cibich, D.; Deye, G.; Talipov, M.R.; Timerghazin, Q.K. Modeling of S-Nitrosothiol-Thiol Reactions of Biological Significance: HNO Production by S-Thiolation Requires a Proton Shuttle and Stabilization of Polar Intermediates. *ChemBioChem*, **2017**, *18*, 726–738.
- [73] Talipov, M.R.; Timerghazin, Q.K. Protein Control of S-Nitrosothiol Reactivity: Interplay of Antagonistic Resonance Structures. J. Phys. Chem. B, 2013, 117, 1827–1837.

- [74] Timerghazin, Q.K.; Talipov, M.R. Unprecedented External Electric Field Effects on S-Nitrosothiols: Possible Mechanism of Biological Regulation? *J. Phys. Chem. Lett.*, **2013**, *4*, 1034–1038.
- [75] Yadav, P.K.; Yamada, K.; Chiku, T.; Koutmos, M.; Banerjee, R. Structure and Kinetic Analysis of H2S Production by Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. J. Biol. Chem., **2013**, 288, 20002–20013.
- [76] Yadav, P.K.; Vitvitsky, V.; Carballal, S.; Seravalli, J.; Banerjee, R. Thioredoxin Regulates Human Mercaptopyruvate Sulfurtransferase at Physiologically-Relevant Concentrations. J. Biol. Chem., 2020, 295, 6299– 6311.
- [77] Villarejo, M.; Westley, J. Mechanism of Rhodanese Catalysis of Thiosulfate-Lipoate Oxidation-Reduction. *J. Biol. Chem.*, **1963**, *238*, 4016–4020.
- [78] Ezeriņa, D.; Takano, Y.; Hanaoka, K.; Urano, Y.; Dick, T.P. N-Acetyl Cysteine Functions as a Fast-Acting Antioxidant by Triggering Intracellular H2S and Sulfane Sulfur Production. *Cell Chem. Biol.*, **2018**, *25*, 447-459.e4.
- [79] Greiner, R.; Pálinkás, Z.; Bäsell, K.; Becher, D.; Antelmann, H.; Nagy, P.; Dick, T.P. Polysulfides Link H2S to Protein Thiol Oxidation. *Antioxid. Redox Signal.*, **2013**, *19*, 1749–1765.
- [80] Steudel, R.; Chivers, T. The Role of Polysulfide Dianions and Radical Anions in the Chemical, Physical and Biological Sciences, Including Sulfur-Based Batteries. *Chem. Soc. Rev.*, **2019**, *48*, 3279–3319.
- [81] Liang, D.; Wu, H.; Wong, M.W.; Huang, D. Diallyl Trisulfide Is a Fast H2S Donor, but Diallyl Disulfide Is a Slow One: The Reaction Pathways and Intermediates of Glutathione with Polysulfides. *Org. Lett.*, **2015**, *17*, 4196–4199.
- [82] Moutiez, M.; Aumercier, M.; Teissier, E.; Parmentier, B.; Tartar, A.; Sergheraert, C. Reduction of a Trisulfide Derivative of Glutathione by Glutathione Reductase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1994**, 202, 1380–1386.
- [83] Lin, J.; Akiyama, M.; Bica, I.; Long, F.T.; Henderson, C.F.; Goddu, R.N.; Suarez, V.; Baker, B.; Ida, T.; Shinkai, Y.; Nagy, P.; Akaike, T.; Fukuto, J.M.; Kumagai, Y. The Uptake and Release of Polysulfur Cysteine Species by Cells: Physiological and Toxicological Implications. *Chem. Res. Toxicol.*, **2019**, *32*, 447–455.
- [84] Vitvitsky, V.; Miljkovic, J.L.; Bostelaar, T.; Adhikari, B.; Yadav, P.K.; Steiger, A.K.; Torregrossa, R.; Pluth, M.D.; Whiteman, M.; Banerjee, R.; Filipovic, M.R. Cytochrome c Reduction by H2S Potentiates Sulfide Signaling. ACS Chem. Biol., 2018, 13, 2300–2307.
- [85] López-López, A.; Keech, O.; Rouhier, N. Maturation and Assembly of Iron-Sulfur Cluster-Containing Subunits in the Mitochondrial Complex I From Plants. *Front. Plant Sci.*, **2022**, *13*, 916948.
- [86] Lill, R.; Freibert, S.-A. Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis. *Annu. Rev. Biochem.*, **2020**, *89*, 471–499.
- [87] Lec, J.-C.; Boutserin, S.; Mazon, H.; Mulliert, G.; Boschi-Muller, S.; Talfournier, F. Unraveling the Mechanism of Cysteine Persulfide Formation Catalyzed by 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferases. ACS Catal., 2018, 8, 2049–2059.
- [88] Yadav, P.K.; Martinov, M.; Vitvitsky, V.; Seravalli, J.; Wedmann, R.; Filipovic, M.R.; Banerjee, R. Biosynthesis and Reactivity of Cysteine Persulfides in Signaling. J. Am. Chem. Soc., 2016, 138, 289–299.

- [89] Flavin, M. Microbial Transsulfuration: The Mechanism of an Enzymatic Disulfide Elimination Reaction. *J. Biol. Chem.*, **1962**, *237*, 768–777.
- [90] Leibrecht, I.; Kessler, D. A Novel L-Cysteine/Cystine C-S-Lyase Directing [2Fe-2S] Cluster Formation of Synechocystis Ferredoxin. J. Biol. Chem., 1997, 272, 10442–10447.
- [91] Hamamoto, A.; Mazelis, M. The C-S Lyases of Higher Plants: Isolation and Properties of Homogeneous Cystine Lyase from Broccoli (Brassica Oleracea Var Botrytis) Buds. *Plant Physiol.*, **1986**, *80*, 702–706.
- [92] Jones, P.R.; Manabe, T.; Awazuhara, M.; Saito, K. A New Member of Plant CS-Lyases. A Cystine Lyase from Arabidopsis Thaliana. J. Biol. Chem., 2003, 278, 10291–10296.
- [93] Cavallini, D.; Federici, G.; Barboni, E.; Marcucci, M. Formation of Persulfide Groups in Alkaline Treated Insulin. *FEBS Lett.*, **1970**, *10*, 125–128.
- [94] Florence, T.M. Degradation of Protein Disulphide Bonds in Dilute Alkali. *Biochem. J.*, **1980**, *189*, 507–520.
- [95] Jones, A.J.; Helmerhorst, E.; Stokes, G.B. The Formation of Dehydroalanine Residues in Alkali-Treated Insulin and Oxidized Glutathione. A Nuclear-Magnetic-Resonance Study. *Biochem. J.*, **1983**, *211*, 499–502.
- [96] Bachrach, S.M.; Pereverzev, A. Competing Elimination and Substitution Reactions of Simple Acyclic Disulfides. *Org. Biomol. Chem.*, **2005**, *3*, 2095– 2101.
- [97] Asquith, R.S.; Carthew, P. An Investigation of the Mechanism of Alkaline Degradation of Cystine in Intact Protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, *278*, 8–14.
- [98] Friedrich, M.G.; Wang, Z.; Oakley, A.J.; Schey, K.L.; Truscott, R.J.W. Hotspots of Age-Related Protein Degradation: The Importance of Neighboring Residues for the Formation of Non-Disulfide Crosslinks Derived from Cysteine. *Biochem. J.*, **2017**, *474*, 2475–2487.
- [99] Park, C.-M.; Johnson, B.A.; Duan, J.; Park, J.-J.; Day, J.J.; Gang, D.; Qian, W.-J.; Xian, M. 9-Fluorenylmethyl (Fm) Disulfides: Biomimetic Precursors for Persulfides. Org. Lett., **2016**, *18*, 904–907.
- [100] Heimer, N.E.; Field, L. Biologically Oriented Organic Sulfur Chemistry. 23. A Hydrodisulfide from a Sulfonamide Derivative of Penicillamine. *J. Org. Chem.*, **1984**, *49*, 1446–1449.
- [101] Everett, S.A.; Wardman, P. Perthiols as Antioxidants: Radical-Scavenging and Prooxidative Mechanisms. *Methods Enzymol.*, **1995**, *251*, 55–69.
- [102] Kawamura, S.; Horii, T.; Tsurugi, J. Aryl Hydrodisulfides. J. Org. Chem., 1971, 36, 3677–3680.
- [103] Bailey, T.S.; Zakharov, L.N.; Pluth, M.D. Understanding Hydrogen Sulfide Storage: Probing Conditions for Sulfide Release from Hydrodisulfides. J. Am. Chem. Soc., 2014, 136, 10573–10576.
- [104] Bailey, T.S.; Pluth, M.D. Reactions of Isolated Persulfides Provide Insights into the Interplay between H2S and Persulfide Reactivity. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, 89, 662–667.
- [105] Khodade, V.S.; Toscano, J.P. Development of S -Substituted Thioisothioureas as Efficient Hydropersulfide Precursors. J. Am. Chem. Soc., 2018, 140, 17333–17337.

- [106] Artaud, I.; Galardon, E. A Persulfide Analogue of the Nitrosothiol SNAP: Formation, Characterization and Reactivity. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.*, **2014**, *15*, 2361–2364.
- [107] Khodade, V.S.; Pharoah, B.M.; Paolocci, N.; Toscano, J.P. Alkylamine-Substituted Perthiocarbamates: Dual Precursors to Hydropersulfide and Carbonyl Sulfide with Cardioprotective Actions. J. Am. Chem. Soc., 2020, 142, 4309–4316.
- [108] Khodade, V.S.; Aggarwal, S.C.; Pharoah, B.M.; Paolocci, N.; Toscano, J.P. Alkylsulfenyl Thiocarbonates: Precursors to Hydropersulfides Potently Attenuate Oxidative Stress. *Chem. Sci.*, **2021**, *12*, 8252–8259.
- [109] Benson, S.W. Thermochemistry and Kinetics of Sulfur-Containing Molecules and Radicals. *Chem. Rev.*, **1978**, *78*, 23–35.
- [110] Chauvin, J.-P.R.; Griesser, M.; Pratt, D.A. Hydropersulfides: H-Atom Transfer Agents Par Excellence. *J. Am. Chem. Soc.*, **2017**, *139*, 6484–6493.
- [111] Everett, S.A.; Folkes, L.K.; Wardman, P.; Asmus, K.D. Free-Radical Repair by a Novel Perthiol: Reversible Hydrogen Transfer and Perthiyl Radical Formation. *Free Radic. Res.*, **1994**, *20*, 387–400.
- [112] Serjeant, E.P.; Dempsey, B. *Ionisation Constants of Organic Acids in Aqueous Solution*; Pergamon Press: Oxford; New York, **1979**.
- [113] Li, H.; Liu, H.; Chen, Z.; Zhao, R.; Wang, Q.; Ran, M.; Xia, Y.; Hu, X.; Liu, J.; Xian, M.; Xun, L. Using Resonance Synchronous Spectroscopy to Characterize the Reactivity and Electrophilicity of Biologically Relevant Sulfane Sulfur. *Redox Biol.*, **2019**, *24*, 101179.
- [114] Cuevasanta, E.; Benchoam, D.; Ferrer-Sueta, G.; Zeida, A.; Denicola, A.; Alvarez, B.; Möller, M.N. Commentary on "Using Resonance Synchronous Spectroscopy to Characterize the Reactivity and Electrophilicity of Biologically Relevant Sulfane Sulfur". Evidence That the Methodology Is Inadequate Because It Only Measures Unspecific Light Scattering. *Redox Biol.*, **2019**, *26*, 101281.
- [115] Portillo-Ledesma, S.; Sardi, F.; Manta, B.; Tourn, M.V.; Clippe, A.; Knoops, B.; Alvarez, B.; Coitiño, E.L.; Ferrer-Sueta, G. Deconstructing the Catalytic Efficiency of Peroxiredoxin-5 Peroxidatic Cysteine. *Biochemistry*, **2014**, *53*, 6113–6125.
- [116] Schlesinger, P.; Westley, J. An Expanded Mechanism for Rhodanese Catalysis. J. Biol. Chem., **1974**, 249, 780–788.
- [117] Weng, L.; Heinrikson, R.L.; Westley, J. Active Site Cysteinyl and Arginyl Residues of Rhodanese. A Novel Formation of Disulfide Bonds in the Active Site Promoted by Phenylglyoxal. J. Biol. Chem., **1978**, 253, 8109–8119.
- [118] Fu, L.; Liu, K.; He, J.; Tian, C.; Yu, X.; Yang, J. Direct Proteomic Mapping of Cysteine Persulfidation. Antioxid. Redox Signal., 2020, 33, 1061–1076.
- [119] Bogdándi, V.; Ida, T.; Sutton, T.R.; Bianco, C.; Ditrói, T.; Koster, G.; Henthorn, H.A.; Minnion, M.; Toscano, J.P.; van der Vliet, A.; Pluth, M.D.; Feelisch, M.; Fukuto, J.M.; Akaike, T.; Nagy, P. Speciation of Reactive Sulfur Species and Their Reactions with Alkylating Agents: Do We Have Any Clue about What Is Present inside the Cell? *Br. J. Pharmacol.*, **2019**, *176*, 646– 670.
- [120] Fukuto, J.M.; Carrington, S.J.; Tantillo, D.J.; Harrison, J.G.; Ignarro, L.J.; Freeman, B.A.; Chen, A.; Wink, D.A. Small Molecule Signaling Agents: The Integrated Chemistry and Biochemistry of Nitrogen Oxides, Oxides of

Carbon, Dioxygen, Hydrogen Sulfide, and Their Derived Species. *Chem. Res. Toxicol.*, **2012**, *25*, 769–793.

- [121] Benaïchouche, M.; Bosser, G.; Paris, J.; Plichon, V. Relative Nucleophilicities of Aryldisulphide and Thiolate Ions in Dimethylacetamide Estimated from Their Reaction Rates with Alkyl Halides. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 2, **1990**, *8*, 1421–1424.
- [122] Ono, K.; Akaike, T.; Sawa, T.; Kumagai, Y.; Wink, D.A.; Tantillo, D.J.; Hobbs, A.J.; Nagy, P.; Xian, M.; Lin, J.; Fukuto, J.M. Redox Chemistry and Chemical Biology of H2S, Hydropersulfides, and Derived Species: Implications of Their Possible Biological Activity and Utility. *Free Radic. Biol. Med.*, **2014**, *77*, 82–94.
- [123] Gold, V. *Glossary of Terms Used in Physical Organic Chemistry*; International Commission of Pure and Applied Chemistry, **1979**.
- [124] Edwards, J.O.; Pearson, R.G. The Factors Determining Nucleophilic Reactivities. J. Am. Chem. Soc., **1962**, 84, 16–24.
- [125] Jencks, W.P.; Carriuolo, J. Reactivity of Nucleophilic Reagents toward Esters. J. Am. Chem. Soc., **1960**, 82, 1778–1786.
- [126] Garver, J.M.; Gronert, S.; Bierbaum, V.M. Experimental Validation of the a-Effect in the Gas Phase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, *133*, 13894–13897.
- [127] Hoz, S. The a Effect: On the Origin of Transition-State Stabilization. J. Org. Chem., **1982**, 47, 3545–3547.
- [128] Um, I.-H.; Im, L.-R.; Buncel, E. Pitfalls in Assessing the a-Effect: Reactions of Substituted Phenyl Methanesulfonates with HOO-, OH-, and Substituted Phenoxides in H2O. J. Org. Chem., 2010, 75, 8571–8577.
- [129] Kirby, A.J.; Younas, M. The Reactivity of Phosphate Esters. Reactions of Diesters with Nucleophiles. *J. Chem. Soc. B Phys. Org.*, **1970**, 1165–1172.
- [130] Frey, P.A.; Hegeman, A.D. *Enzymatic Reaction Mechanisms*; Oxford University Press, USA, **2007**.
- [131] Bianco, C.L.; Chavez, T.A.; Sosa, V.; Saund, S.S.; Nguyen, Q.N.N.; Tantillo, D.J.; Ichimura, A.S.; Toscano, J.P.; Fukuto, J.M. The Chemical Biology of the Persulfide (RSSH)/Perthiyl (RSS·) Redox Couple and Possible Role in Biological Redox Signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, **2016**, *101*, 20–31.
- [132] Zarenkiewicz, J.; Perez-Ternero, C.; Kojasoy, V.; McGinity, C.; Khodade, V.S.; Lin, J.; Tantillo, D.J.; Toscano, J.P.; Hobbs, A.J.; Fukuto, J.M. The Reaction of Hydropersulfides (RSSH) with S-Nitrosothiols (RS-NO) and the Biological/Physiological Implications. *Free Radic. Biol. Med.*, **2022**, *188*, 459–467.
- [133] Switzer, C.H.; Fukuto, J.M. The Antioxidant and Oxidant Properties of Hydropersulfides (RSSH) and Polysulfide Species. *Redox Biol.*, **2022**, *57*, 102486.
- [134] Fukuto, J.M.; Perez-Ternero, C.; Zarenkiewicz, J.; Lin, J.; Hobbs, A.J.; Toscano, J.P. Hydropersulfides (RSSH) and Nitric Oxide (NO) Signaling: Possible Effects on S-Nitrosothiols (RS-NO). *Antioxidants*, **2022**, *11*, 169.
- [135] Heppner, D.E.; Hristova, M.; Ida, T.; Mijuskovic, A.; Dustin, C.M.; Bogdándi, V.; Fukuto, J.M.; Dick, T.P.; Nagy, P.; Li, J.; Akaike, T.; van der Vliet, A. Cysteine Perthiosulfenic Acid (Cys-SSOH): A Novel Intermediate in Thiol-Based Redox Signaling? *Redox Biol.*, **2018**, *14*, 379–385.
- [136] Gunnison, A.F. Sulphite Toxicity: A Critical Review of in Vitro and in Vivo Data. *Food Cosmet. Toxicol.*, **1981**, *19*, 667–682.

- [137] Millikin, R.; Bianco, C.L.; White, C.; Saund, S.S.; Henriquez, S.; Sosa, V.; Akaike, T.; Kumagai, Y.; Soeda, S.; Toscano, J.P.; Lin, J.; Fukuto, J.M. The Chemical Biology of Protein Hydropersulfides: Studies of a Possible Protective Function of Biological Hydropersulfide Generation. *Free Radic. Biol. Med.*, **2016**, *97*, 136–147.
- [138] Fukuto, J.M.; Lin, J.; Khodade, V.S.; Toscano, J.P. Predicting the Possible Physiological/Biological Utility of the Hydropersulfide Functional Group Based on Its Chemistry: Similarities between Hydropersulfides and Selenols. *Antioxid. Redox Signal.*, **2020**, *33*, 1295–1307.
- [139] Zarenkiewicz, J.; Khodade, V.S.; Toscano, J.P. Reaction of Nitroxyl (HNO) with Hydrogen Sulfide and Hydropersulfides. J. Org. Chem., 2021, 86, 868– 877.
- [140] Anglada, J.M.; Crehuet, R.; Adhikari, S.; Francisco, J.S.; Xia, Y. Reactivity of Hydropersulfides toward the Hydroxyl Radical Unraveled: Disulfide Bond Cleavage, Hydrogen Atom Transfer, and Proton-Coupled Electron Transfer. *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP*, **2018**, 20, 4793–4804.
- [141] Kawamura, S.; Abe, Y.; Tsurugi, J. Aralkyl Hydrodisulfides. X. Reactions with Iron Salts. *J. Org. Chem.*, **1969**, *34*, 3633–3635.
- [142] Koppenol, W.H.; Bounds, P.L. Signaling by Sulfur-Containing Molecules. Quantitative Aspects. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2017**, *617*, 3–8.
- [143] Janousek, B.K.; Reed, K.J.; Brauman, J.I. Electron Photodetachment from Mercaptyl Anions (RS-). Electron Affinities of Mercaptyl Radicals and the Sulfur-Hydrogen Bond Strength in Mercaptans. J. Am. Chem. Soc., 1980, 102, 3125–3129.
- [144] Prütz, W.A. Catalytic Reduction of Fe(III)-Cytochrome-c Involving Stable Radiolysis Products Derived from Disulphides, Proteins and Thiols. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1992**, *61*, 593–602.
- [145] Chauvin, J.-P.R.; Haidasz, E.A.; Griesser, M.; Pratt, D.A. Polysulfide-1-Oxides React with Peroxyl Radicals as Quickly as Hindered Phenolic Antioxidants and Do so by a Surprising Concerted Homolytic Substitution. *Chem. Sci.*, **2016**, 7, 6347–6356.
- [146] Bailey, T.S.; Henthorn, H.A.; Pluth, M.D. The Intersection of NO and H2S: Persulfides Generate NO from Nitrite through Polysulfide Formation. *Inorg. Chem.*, **2016**, *55*, 12618–12625.
- [147] Everett, S.A.; Schoeneich, C.; Stewart, J.H.; Asmus, K.D. Perthiyl Radicals, Trisulfide Radical Ions, and Sulfate Formation: A Combined Photolysis and Radiolysis Study on Redox Processes with Organic Di- and Trisulfides. J. Phys. Chem., **1992**, 96, 306–314.
- [148] Wu, Z.; Pratt, D.A. Radical Substitution Provides a Unique Route to Disulfides. J. Am. Chem. Soc., **2020**, 142, 10284–10290.
- [149] Chatterji, T.; Keerthi, K.; Gates, K.S. Generation of Reactive Oxygen Species by a Persulfide (BnSSH). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**, *15*, 3921–3924.
- [150] Saund, S.S.; Sosa, V.; Henriquez, S.; Nguyen, Q.N.N.; Bianco, C.L.; Soeda, S.; Millikin, R.; White, C.; Le, H.; Ono, K.; Tantillo, D.J.; Kumagai, Y.; Akaike, T.; Lin, J.; Fukuto, J.M. The Chemical Biology of Hydropersulfides (RSSH): Chemical Stability, Reactivity and Redox Roles. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2015**, *588*, 15–24.
- [151] Kende, I.; Pickering, T.L.; Tobolsky, A.V. The Dissociation Energy of the Tetrasulfide Linkage. *J. Am. Chem. Soc.*, **1965**, *87*, 5582–5586.

- [152] Quintiliani, M.; Badiello, R.; Tamba, M.; Esfandi, A.; Gorin, G. Radiolysis of Glutathione in Oxygen-Containing Solutions of pH7. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **1977**, *32*, 195–202.
- [153] Tamba, M.; Simone, G.; Quintiliani, M. Interactions of Thiyl Free Radicals with Oxygen: A Pulse Radiolysis Study. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **1986**, *50*, 595–600.
- [154] Sevilla, M.D.; Becker, D.; Yan, M. The Formation and Structure of the Sulfoxyl Radicals RSO(.), RSOO(.), RSO2(.), and RSO2OO(.) from the Reaction of Cysteine, Glutathione and Penicillamine Thiyl Radicals with Molecular Oxygen. *Int. J. Radiat. Biol.*, **1990**, *57*, 65–81.
- [155] Zhang, X.; Zhang, N.; Schuchmann, H.-P.; von Sonntag, C. Pulse Radiolysis of 2-Mercaptoethanol in Oxygenated Aqueous Solution. Generation and Reactions of the Thiylperoxyl Radical. J. Phys. Chem., **1994**, 98, 6541– 6547.
- [156] Madej, E.; Folkes, L.K.; Wardman, P.; Czapski, G.; Goldstein, S. Thiyl Radicals React with Nitric Oxide to Form S-Nitrosothiols with Rate Constants near the Diffusion-Controlled Limit. *Free Radic. Biol. Med.*, **2008**, *44*, 2013– 2018.
- [157] Dixon, S.J.; Lemberg, K.M.; Lamprecht, M.R.; Skouta, R.; Zaitsev, E.M.; Gleason, C.E.; Patel, D.N.; Bauer, A.J.; Cantley, A.M.; Yang, W.S.; Morrison, B.; Stockwell, B.R. Ferroptosis: An Iron-Dependent Form of Nonapoptotic Cell Death. *Cell*, **2012**, *149*, 1060–1072.
- [158] Friedmann Angeli, J.P.; Schneider, M.; Proneth, B.; Tyurina, Y.Y.; Tyurin, V.A.; Hammond, V.J.; Herbach, N.; Aichler, M.; Walch, A.; Eggenhofer, E.; Basavarajappa, D.; Rådmark, O.; Kobayashi, S.; Seibt, T.; Beck, H.; Neff, F.; Esposito, I.; Wanke, R.; Förster, H.; Yefremova, O.; Heinrichmeyer, M.; Bornkamm, G.W.; Geissler, E.K.; Thomas, S.B.; Stockwell, B.R.; O'Donnell, V.B.; Kagan, V.E.; Schick, J.A.; Conrad, M. Inactivation of the Ferroptosis Regulator Gpx4 Triggers Acute Renal Failure in Mice. *Nat. Cell Biol.*, **2014**, *16*, 1180–1191.
- [159] Huang, G.-T.; Yu, J.-S.K. Enzyme Catalysis That Paves the Way for S-Sulfhydration via Sulfur Atom Transfer. J. Phys. Chem. B, 2016, 120, 4608– 4615.
- [160] Kawamura, S.; Nakabayashi, T.; Kitao, T.; Tsurugi, J. Aralkyl Hydrodisulfides. VI. The Reaction of Benzhydryl Hydrosulfide with Several Neucleophiles. J. Org. Chem., **1966**, 31, 1985–1987.
- [161] Hughes, M.N.; Centelles, M.N.; Moore, K.P. Making and Working with Hydrogen Sulfide: The Chemistry and Generation of Hydrogen Sulfide in Vitro and Its Measurement in Vivo: A Review. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, 47, 1346–1353.
- [162] Koike, S.; Nishimoto, S.; Ogasawara, Y. Cysteine Persulfides and Polysulfides Produced by Exchange Reactions with H2S Protect SH-SY5Y Cells from Methylglyoxal-Induced Toxicity through Nrf2 Activation. *Redox Biol.*, **2017**, *12*, 530–539.
- [163] Bolton, S.G.; Cerda, M.M.; Gilbert, A.K.; Pluth, M.D. Effects of Sulfane Sulfur Content in Benzyl Polysulfides on Thiol-Triggered H2S Release and Cell Proliferation. *Free Radic. Biol. Med.*, **2019**, *131*, 393–398.
- [164] Kawamura, S.; Otsuji, Y.; Nakabayashi, T.; Kitao, T.; Tsurugi, J. Aralkyl Hydrodisulfides. IV. The Reaction of Benzyl Hydrodisulfide with Several Nucleophiles. J. Org. Chem., **1965**, 30, 2711–2714.

- [165] Tsurugi, Jitsuo.; Abe, Yasuo.; Nakabayashi, Takeshige.; Kawamura, Shunichi.; Kitao, Teijiro.; Niwa, Mitsuo. Aralkyl Hydrodisulfides. XI. Reaction with Amines. J. Org. Chem., **1970**, 35, 3263–3266.
- [166] Kawamura, S.; Kitao, T.; Nakabayashi, T.; Horii, T.; Tsurugi, J. Aralkyl Hydrodisulfides. VIII. Alkaline Decomposition and Its Competition with Nucleophiles. J. Org. Chem., **1968**, 33, 1179–1181.
- [167] Tsurugi, J.; Nakabayashi, T.; Ishihara, T. Aralkyl Hydrodisulfides. III. The Reaction with Tertiary Phosphines. *J. Org. Chem.*, **1965**, *30*, 2707–2710.
- [168] Kim, S.; Park, S. Structural Changes during Cysteine Desulfurase CsdA and Sulfur Acceptor CsdE Interactions Provide Insight into the Trans-Persulfuration. J. Biol. Chem., 2013, 288, 27172–27180.
- [169] Gervason, S.; Larkem, D.; Mansour, A.B.; Botzanowski, T.; Müller, C.S.; Pecqueur, L.; Le Pavec, G.; Delaunay-Moisan, A.; Brun, O.; Agramunt, J.; Grandas, A.; Fontecave, M.; Schünemann, V.; Cianférani, S.; Sizun, C.; Tolédano, M.B.; D'Autréaux, B. Physiologically Relevant Reconstitution of Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis Uncovers Persulfide-Processing Functions of Ferredoxin-2 and Frataxin. *Nat. Commun.*, **2019**, *10*, 3566.
- [170] Libiad, M.; Sriraman, A.; Banerjee, R. Polymorphic Variants of Human Rhodanese Exhibit Differences in Thermal Stability and Sulfur Transfer Kinetics. J. Biol. Chem., 2015, 290, 23579–23588.
- [171] Hylin, J.W.; Wood, J.L. Enzymatic Formation of Polysulfides from Mercaptopyruvate. *J. Biol. Chem.*, **1959**, *234*, 2141–2144.
- [172] Sorbo, B. Enzymic Transfer of Sulfur from Mercaptopyruvate to Sulfate or Sulfinates. *Biochim. Biophys. Acta*, **1957**, *24*, 324–329.
- [173] Pedre, B.; Talwar, D.; Barayeu, U.; Schilling, D.; Luzarowski, M.; Sokolowski, M.; Glatt, S.; Dick, T.P. 3-Mercaptopyruvate Sulfur Transferase Is a Protein Persulfidase. *Nat. Chem. Biol.*, **2023**, *19*, 507–517.
- [174] Shimizu, T.; Shen, J.; Fang, M.; Zhang, Y.; Hori, K.; Trinidad, J.C.; Bauer, C.E.; Giedroc, D.P.; Masuda, S. Sulfide-Responsive Transcriptional Repressor SqrR Functions as a Master Regulator of Sulfide-Dependent Photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2017**, *114*, 2355–2360.
- [175] Capdevila, D.A.; Walsh, B.J.C.; Zhang, Y.; Dietrich, C.; Gonzalez-Gutierrez, G.; Giedroc, D.P. Structural Basis for Persulfide-Sensing Specificity in a Transcriptional Regulator. *Nat. Chem. Biol.*, **2021**, *17*, 65–70.
- [176] Pis Diez, C.M.; Antelo, G.T.; Dalia, T.N.; Dalia, A.B.; Giedroc, D.P.; Capdevila, D.A. Increased Intracellular Persulfide Levels Attenuate HlyU-Mediated Hemolysin Transcriptional Activation in Vibrio Cholerae. J. Biol. Chem., 2023, 105147.
- [177] Walsh, B.J.C.; Wang, J.; Edmonds, K.A.; Palmer, L.D.; Zhang, Y.; Trinidad, J.C.; Skaar, E.P.; Giedroc, D.P. The Response of Acinetobacter Baumannii to Hydrogen Sulfide Reveals Two Independent Persulfide-Sensing Systems and a Connection to Biofilm Regulation. *mBio*, **2020**, *11*, e01254-20.
- [178] Shimizu, T.; Ida, T.; Antelo, G.T.; Ihara, Y.; Fakhoury, J.N.; Masuda, S.; Giedroc, D.P.; Akaike, T.; Capdevila, D.A.; Masuda, T. Polysulfide Metabolizing Enzymes Influence SqrR-Mediated Sulfide-Induced Transcription by Impacting Intracellular Polysulfide Dynamics. *PNAS Nexus*, 2023, 2, pgad048.
- [179] Fukuto, J.M.; Vega, V.S.; Works, C.; Lin, J. The Chemical Biology of Hydrogen Sulfide and Related Hydropersulfides: Interactions with

Biologically Relevant Metals and Metalloproteins. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2020**, *55*, 52–58.

- [180] Abiko, Y.; Yoshida, E.; Ishii, I.; Fukuto, J.M.; Akaike, T.; Kumagai, Y. Involvement of Reactive Persulfides in Biological Bismethylmercury Sulfide Formation. *Chem. Res. Toxicol.*, **2015**, *28*, 1301–1306.
- [181] Akiyama, M.; Shinkai, Y.; Unoki, T.; Shim, I.; Ishii, I.; Kumagai, Y. The Capture of Cadmium by Reactive Polysulfides Attenuates Cadmium-Induced Adaptive Responses and Hepatotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.*, **2017**, *30*, 2209–2217.
- [182] Akiyama, M.; Shinkai, Y.; Yamakawa, H.; Kim, Y.-G.; Kumagai, Y. Potentiation of Methylmercury Toxicity by Combined Metal Exposure: In Vitro and in Vivo Models of a Restricted Metal Exposome. *Chemosphere*, 2022, 299, 134374.
- [183] Galardon, E.; Huguet, F.; Herrero, C.; Ricoux, R.; Artaud, I.; Padovani, D. Reactions of Persulfides with the Heme Cofactor of Oxidized Myoglobin and Microperoxidase 11: Reduction or Coordination. *Dalton Trans.*, **2017**, *46*, 7939–7946.
- [184] Galardon, E.; Tomas, A.; Selkti, M.; Roussel, P.; Artaud, I. Synthesis, Characterization, and Reactivity of Alkyldisulfanido Zinc Complexes. *Inorg. Chem.*, **2009**, *48*, 5921–5927.
- [185] Álvarez, L.; Suarez Vega, V.; McGinity, C.; Khodade, V.S.; Toscano, J.P.; Nagy, P.; Lin, J.; Works, C.; Fukuto, J.M. The Reactions of Hydropersulfides (RSSH) with Myoglobin. Arch. Biochem. Biophys., **2020**, 687, 108391.
- [186] Kim, E.J.; Feng, J.; Bramlett, M.R.; Lindahl, P.A. Evidence for a Proton Transfer Network and a Required Persulfide-Bond-Forming Cysteine Residue in Ni-Containing Carbon Monoxide Dehydrogenases. *Biochemistry*, 2004, 43, 5728–5734.
- [187] Kappler, U.; Maher, M.J. The Bacterial SoxAX Cytochromes. Cell. Mol. Life Sci. CMLS, 2013, 70, 977–992.
- [188] Coelho, C.; González, P.J.; Moura, J.G.; Moura, I.; Trincão, J.; João Romão,
 M. The Crystal Structure of Cupriavidus Necator Nitrate Reductase in Oxidized and Partially Reduced States. J. Mol. Biol., 2011, 408, 932–948.
- [189] Shieh, M.; Xu, S.; Lederberg, O.L.; Xian, M. Detection of Sulfane Sulfur Species in Biological Systems. *Redox Biol.*, **2022**, *57*, 102502.
- [190] Rao, G.S.; Gorin, G. Reaction of Cystine with Sodium Sulfide in Sodium Hydroxide Solution. *J. Org. Chem.*, **1959**, *24*, 749–753.
- [191] Cavallini, D.; Federici, G.; Barboni, E. Interaction of Proteins with Sulfide. *Eur. J. Biochem. FEBS*, **1970**, *14*, 169–174.
- [192] Shen, J.; Keithly, M.E.; Armstrong, R.N.; Higgins, K.A.; Edmonds, K.A.; Giedroc, D.P. Staphylococcus Aureus CstB Is a Novel Multidomain Persulfide Dioxygenase-Sulfurtransferase Involved in Hydrogen Sulfide Detoxification. *Biochemistry*, **2015**, *54*, 4542–4554.
- [193] Bartlett, P.D.; Davis, R.E. Reactions of Elemental Sulfur. II. The Reaction of Alkali Cyanides with Sulfur, and Some Single-Sulfur Transfer Reactions1. J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 2513–2516.
- [194] Hannestad, U.; Margheri, S.; Sörbo, B. A Sensitive Gas Chromatographic Method for Determination of Protein-Associated Sulfur. *Anal. Biochem.*, **1989**, 178, 394–398.

- [195] Liu, C.; Zhang, F.; Munske, G.; Zhang, H.; Xian, M. Isotope Dilution Mass Spectrometry for the Quantification of Sulfane Sulfurs. *Free Radic. Biol. Med.*, **2014**, *76*, 200–207.
- [196] Siegel, L.M. A Direct Microdetermination for Sulfide. *Anal. Biochem.*, **1965**, *11*, 126–132.
- [197] Pose, M.; Dillon, K.M.; Denicola, A.; Alvarez, B.; Matson, J.B.; Möller, M.N.; Cuevasanta, E. Fluorescent Detection of Hydrogen Sulfide (H2S) through the Formation of Pyrene Excimers Enhances H2S Quantification in Biochemical Systems. J. Biol. Chem., 2022, 298.
- [198] Sawahata, T.; Neal, R.A. Use of 1-Fluoro-2,4-Dinitrobenzene as a Probe for the Presence of Hydrodisulfide Groups in Proteins. *Anal. Biochem.*, **1982**, 126, 360–364.
- [199] Zheng, Y.; Yu, B.; Li, Z.; Yuan, Z.; Organ, C.L.; Trivedi, R.K.; Wang, S.; Lefer, D.J.; Wang, B. An Esterase-Sensitive Prodrug Approach for Controllable Delivery of Persulfide Species. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, 2017, 56, 11749–11753.
- [200] Krishnan, N.; Fu, C.; Pappin, D.J.; Tonks, N.K. H2S-Induced Sulfhydration of the Phosphatase PTP1B and Its Role in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Sci. Signal.*, **2011**, *4*, ra86.
- [201] Li, X.; Day, N.J.; Feng, S.; Gaffrey, M.J.; Lin, T.-D.; Paurus, V.L.; Monroe, M.E.; Moore, R.J.; Yang, B.; Xian, M.; Qian, W.-J. Mass Spectrometry-Based Direct Detection of Multiple Types of Protein Thiol Modifications in Pancreatic Beta Cells under Endoplasmic Reticulum Stress. *Redox Biol.*, **2021**, *46*, 102111.
- [202] Riordan, J.F.; Vallee, B.L. [36] Reactions with N-Ethylmaleimide and p-Mercuribenzoate. *Methods Enzymol.*, **1972**, *25*, 449–456.
- [203] Baldwin, A.D.; Kiick, K.L. Tunable Degradation of Maleimide-Thiol Adducts in Reducing Environments. *Bioconjug. Chem.*, **2011**, *22*, 1946–1953.
- [204] Ditrói, T.; Nagy, A.; Martinelli, D.; Rosta, A.; Kožich, V.; Nagy, P. Comprehensive Analysis of How Experimental Parameters Affect H2S Measurements by the Monobromobimane Method. *Free Radic. Biol. Med.*, 2019, 136, 146–158.
- [205] Chen, W.; Liu, C.; Peng, B.; Zhao, Y.; Pacheco, A.; Xian, M. New Fluorescent Probes for Sulfane Sulfurs and the Application in Bioimaging. *Chem. Sci. R. Soc. Chem. 2010*, **2013**, *4*, 2892–2896.
- [206] Shieh, M.; Ni, X.; Xu, S.; Lindahl, S.P.; Yang, M.; Matsunaga, T.; Flaumenhaft, R.; Akaike, T.; Xian, M. Shining a Light on SSP4: A Comprehensive Analysis and Biological Applications for the Detection of Sulfane Sulfurs. *Redox Biol.*, **2022**, *56*, 102433.
- [207] Neill, D.L.; Chang, Y.-C.; Chen, W.; Li, L.; Xian, M. A Smartphone Based Device for the Detection of Sulfane Sulfurs in Biological Systems. *Sens. Actuators B Chem.*, **2019**, *292*, 263–269.
- [208] Sakaguchi, M.; Marutani, E.; Shin, H.; Chen, W.; Hanaoka, K.; Xian, M.; Ichinose, F. Sodium Thiosulfate Attenuates Acute Lung Injury in Mice. *Anesthesiology*, **2014**, *121*, 1248–1257.
- [209] Takano, Y.; Hanaoka, K.; Shimamoto, K.; Miyamoto, R.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Terai, T.; Kimura, H.; Nagano, T.; Urano, Y. Development of a Reversible Fluorescent Probe for Reactive Sulfur Species, Sulfane Sulfur, and Its Biological Application. *Chem. Commun.*, **2017**, *53*, 1064–1067.

- [210] Marutani, E.; Morita, M.; Hirai, S.; Kai, S.; Grange, R.M.H.; Miyazaki, Y.; Nagashima, F.; Traeger, L.; Magliocca, A.; Ida, T.; Matsunaga, T.; Flicker, D.R.; Corman, B.; Mori, N.; Yamazaki, Y.; Batten, A.; Li, R.; Tanaka, T.; Ikeda, T.; Nakagawa, A.; Atochin, D.N.; Ihara, H.; Olenchock, B.A.; Shen, X.; Nishida, M.; Hanaoka, K.; Kevil, C.G.; Xian, M.; Bloch, D.B.; Akaike, T.; Hindle, A.G.; Motohashi, H.; Ichinose, F. Sulfide Catabolism Ameliorates Hypoxic Brain Injury. *Nat. Commun.*, **2021**, *12*.
- [211] Umezawa, K.; Kamiya, M.; Urano, Y. A Reversible Fluorescent Probe for Real-Time Live-Cell Imaging and Quantification of Endogenous Hydropolysulfides. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2018**, *57*, 9346–9350.
- [212] Kawagoe, R.; Takashima, I.; Uchinomiya, S.; Ojida, A. Reversible Ratiometric Detection of Highly Reactive Hydropersulfides Using a FRET-Based Dual Emission Fluorescent Probe. *Chem. Sci.*, **2017**, *8*, 1134–1140.
- [213] Sen, N.; Paul, B.D.; Gadalla, M.M.; Mustafa, A.K.; Sen, T.; Xu, R.; Kim, S.; Snyder, S.H. Hydrogen Sulfide-Linked Sulfhydration of NF-κB Mediates Its Antiapoptotic Actions. *Mol. Cell*, **2012**, *45*, 13–24.
- [214] Parent, A.; Elduque, X.; Cornu, D.; Belot, L.; Le Caer, J.-P.; Grandas, A.; Toledano, M.B.; D'Autréaux, B. Mammalian Frataxin Directly Enhances Sulfur Transfer of NFS1 Persulfide to Both ISCU and Free Thiols. *Nat. Commun.*, **2015**, 6, 5686.
- [215] Gao, X.-H.; Krokowski, D.; Guan, B.-J.; Bederman, I.; Majumder, M.; Parisien, M.; Diatchenko, L.; Kabil, O.; Willard, B.; Banerjee, R.; Wang, B.; Bebek, G.; Evans, C.R.; Fox, P.L.; Gerson, S.L.; Hoppel, C.L.; Liu, M.; Arvan, P.; Hatzoglou, M. Quantitative H2S-Mediated Protein Sulfhydration Reveals Metabolic Reprogramming during the Integrated Stress Response. *eLife*, **2015**, *4*, e10067.
- [216] Longen, S.; Richter, F.; Köhler, Y.; Wittig, I.; Beck, K.-F.; Pfeilschifter, J. Quantitative Persulfide Site Identification (qPerS-SID) Reveals Protein Targets of H2S Releasing Donors in Mammalian Cells. *Sci. Rep.*, **2016**, *6*, 29808.
- [217] Zhang, D.; Devarie-Baez, N.O.; Li, Q.; Lancaster, J.R.Jr.; Xian, M. Methylsulfonyl Benzothiazole (MSBT): A Selective Protein Thiol Blocking Reagent. Org. Lett., 2012, 14, 3396–3399.
- [218] Iciek, M.; Bilska-Wilkosz, A.; Kozdrowicki, M.; Górny, M. Reactive Sulfur Species and Their Significance in Health and Disease. *Biosci. Rep.*, 2022, 42, BSR20221006.
- [219] Numakura, T.; Sugiura, H.; Akaike, T.; Ida, T.; Fujii, S.; Koarai, A.; Yamada, M.; Onodera, K.; Hashimoto, Y.; Tanaka, R.; Sato, K.; Shishikura, Y.; Hirano, T.; Yanagisawa, S.; Fujino, N.; Okazaki, T.; Tamada, T.; Hoshikawa, Y.; Okada, Y.; Ichinose, M. Production of Reactive Persulfide Species in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Thorax*, **2017**, *72*, 1074–1083.
- [220] Tiranti, V.; Viscomi, C.; Hildebrandt, T.; Di Meo, I.; Mineri, R.; Tiveron, C.; Levitt, M.D.; Prelle, A.; Fagiolari, G.; Rimoldi, M.; Zeviani, M. Loss of ETHE1, a Mitochondrial Dioxygenase, Causes Fatal Sulfide Toxicity in Ethylmalonic Encephalopathy. *Nat. Med.*, **2009**, *15*, 200–205.
- [221] Argyrou, A.; Blanchard, J.S. Flavoprotein Disulfide Reductases: Advances in Chemistry and Function. In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*; Academic Press, **2004**; Vol. 78, pp. 89–142.
- [222] Sousa, F.M.; Pereira, J.G.; Marreiros, B.C.; Pereira, M.M. Taxonomic Distribution, Structure/Function Relationship and Metabolic Context of the

Two Families of Sulfide Dehydrogenases: SQR and FCSD. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **2018**, *1859*, 742–753.

- [223] Friederich, M.W.; Elias, A.F.; Kuster, A.; Laugwitz, L.; Larson, A.A.; Landry, A.P.; Ellwood-Digel, L.; Mirsky, D.M.; Dimmock, D.; Haven, J.; Jiang, H.; MacLean, K.N.; Styren, K.; Schoof, J.; Goujon, L.; Lefrancois, T.; Friederich, M.; Coughlin, C.R.; Banerjee, R.; Haack, T.B.; Hove, J.L.K.V. Pathogenic Variants in SQOR Encoding Sulfide:Quinone Oxidoreductase Are a Potentially Treatable Cause of Leigh Disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **2020**, *43*, 1024– 1036.
- [224] Jackson, M.R.; Cox, K.D.; Baugh, S.D.P.; Wakeen, L.; Rashad, A.A.; Lam, P.Y.S.; Polyak, B.; Jorns, M.S. Discovery of a First-in-Class Inhibitor of Sulfide:Quinone Oxidoreductase That Protects against Adverse Cardiac Remodelling and Heart Failure. *Cardiovasc. Res.*, **2022**, *118*, 1771–1784.
- [225] Baugh, S.D.P.; Jackson, M.R.; Rashad, A.A.; Reitz, A.B.; Lam, P.Y.S.; Jorns, M.S. Synthesis and Evaluation of Potent Novel Inhibitors of Human Sulfide:Quinone Oxidoreductase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2021**, *54*, 128443.
- [226] Marcia, M.; Ermler, U.; Peng, G.; Michel, H. The Structure of Aquifex Aeolicus Sulfide:Quinone Oxidoreductase, a Basis to Understand Sulfide Detoxification and Respiration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106, 9625–9630.
- [227] Brito, J.A.; Sousa, F.L.; Stelter, M.; Bandeiras, T.M.; Vonrhein, C.; Teixeira,
 M.; Pereira, M.M.; Archer, M. Structural and Functional Insights into Sulfide:Quinone Oxidoreductase. *Biochemistry*, **2009**, *48*, 5613–5622.
- [228] Cherney, M.M.; Zhang, Y.; Solomonson, M.; Weiner, J.H.; James, M.N.G. Crystal Structure of Sulfide:Quinone Oxidoreductase from Acidithiobacillus Ferrooxidans: Insights into Sulfidotrophic Respiration and Detoxification. J. Mol. Biol., 2010, 398, 292–305.
- [229] Jackson, M.R.; Loll, P.J.; Jorns, M.S. X-Ray Structure of Human Sulfide:Quinone Oxidoreductase: Insights into the Mechanism of Mitochondrial Hydrogen Sulfide Oxidation. *Struct. Lond. Engl.* 1993, 2019, 27, 794-805.e4.
- [230] Sehnal, D.; Bittrich, S.; Deshpande, M.; Svobodová, R.; Berka, K.; Bazgier, V.; Velankar, S.; Burley, S.K.; Koča, J.; Rose, A.S. Mol* Viewer: Modern Web App for 3D Visualization and Analysis of Large Biomolecular Structures. *Nucleic Acids Res.*, **2021**, *49*, W431–W437.
- [231] Landry, A.P.; Ballou, D.P.; Banerjee, R. Modulation of Catalytic Promiscuity during Hydrogen Sulfide Oxidation. *ACS Chem. Biol.*, **2018**, *13*, 1651–1658.
- [232] Meister, A. Glutathione Metabolism and Its Selective Modification. *J. Biol. Chem.*, **1988**, *263*, 17205–17208.
- [233] Kosower, N.S.; Kosower, E.M. The Glutathione Status of Cells. *Int. Rev. Cytol.*, **1978**, *54*, 109–160.
- [234] Togawa, T.; Ogawa, M.; Nawata, M.; Ogasawara, Y.; Kawanabe, K.; Tanabe, S. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Bound Sulfide and Sulfite and Thiosulfate at Their Low Levels in Human Serum by Pre-Column Fluorescence Derivatization with Monobromobimane. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **1992**, *40*, 3000–3004.
- [235] Ji, A.J.; Savon, S.R.; Jacobsen, D.W. Determination of Total Serum Sulfite by HPLC with Fluorescence Detection. *Clin. Chem.*, **1995**, *41*, 897–903.

- [236] Augustyn, K.D.C.; Jackson, M.R.; Jorns, M.S. Use of Tissue Metabolite Analysis and Enzyme Kinetics To Discriminate between Alternate Pathways for Hydrogen Sulfide Metabolism. *Biochemistry*, **2017**, *56*, 986–996.
- [237] Lang, K. Formation of Thiocyanogen in the Animal Body. *Biochem Ztschr*, **1933**, *259*, 243–256.
- [238] Bordo, D.; Bork, P. The Rhodanese/Cdc25 Phosphatase Superfamily. Sequence-Structure-Function Relations. *EMBO Rep.*, **2002**, *3*, 741–746.
- [239] Alsohaibani, R.; Claudel, A.-L.; Perchat-Varlet, R.; Boutserin, S.; Talfournier, F.; Boschi-Muller, S.; Selles, B. Rhodanese-Fold Containing Proteins in Humans: Not Just Key Players in Sulfur Trafficking. *Antioxidants*, 2023, 12, 843.
- [240] Chaudhary, M.; Gupta, R. Cyanide Detoxifying Enzyme: Rhodanese. *Curr. Biotechnol.*, **2012**, *1*, 327–335.
- [241] Buonvino, S.; Arciero, I.; Melino, S. Thiosulfate-Cyanide Sulfurtransferase a Mitochondrial Essential Enzyme: From Cell Metabolism to the Biotechnological Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, *23*, 8452.
- [242] Ploegman, J.H.; Drent, G.; Kalk, K.H.; Hol, W.G. Structure of Bovine Liver Rhodanese. I. Structure Determination at 2.5 A Resolution and a Comparison of the Conformation and Sequence of Its Two Domains. J. Mol. Biol., 1978, 123, 557–594.
- [243] Ploegman, J.H.; Drent, G.; Kalk, K.H.; Hol, W.G. The Structure of Bovine Liver Rhodanese. II. The Active Site in the Sulfur-Substituted and the Sulfur-Free Enzyme. J. Mol. Biol., **1979**, 127, 149–162.
- [244] Ploegman, J.H.; Drent, G.; Kalk, K.H.; Hol, W.G.; Heinrikson, R.L.; Keim, P.; Weng, L.; Russell, J. The Covalent and Tertiary Structure of Bovine Liver Rhodanese. *Nature*, **1978**, 273, 124–129.
- [245] Hol, W.G.J.; Lijk, L.J.; Kalk, K.H. The High Resolution Three-Dimensional Structure of Bovine Liver Rhodanese. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **1983**, *3*, 370–376.
- [246] Volini, M.; Wang, S.F. The Interdependence of Substrate and Protein Transformations in Rhodanese Catalysis. 3. Enzyme Changes Outside the Catalytic Cycle. *J. Biol. Chem.*, **1973**, *248*, 7392–7395.
- [247] Gliubich, F.; Berni, R.; Colapietro, M.; Barba, L.; Zanotti, G. Structure of Sulfur-Substituted Rhodanese at 1.36 Å Resolution. Acta Crystallogr. Sect. D, 1998, 54, 481–486.
- [248] Gliubich, F.; Gazerro, M.; Zanotti, G.; Delbono, S.; Bombieri, G.; Berni, R. Active Site Structural Features for Chemically Modified Forms of Rhodanese *. J. Biol. Chem., **1996**, 271, 21054–21061.
- [249] Trevino, R.J.; Gliubich, F.; Berni, R.; Cianci, M.; Chirgwin, J.M.; Zanotti, G.; Horowitz, P.M. NH2-Terminal Sequence Truncation Decreases the Stability of Bovine Rhodanese, Minimally Perturbs Its Crystal Structure, and Enhances Interaction with GroEL under Native Conditions *. J. Biol. Chem., 1999, 274, 13938–13947.
- [250] Davidson, B.; Westley, J. Tryptophan in the Active Site of Rhodanese. J. Biol. Chem., **1965**, 240, 4463–4469.
- [251] Horowitz, P.; Criscimagna, N.L. The Use of Intrinsic Protein Fluorescence to Quantitate Enzyme-Bound Persulfide and to Measure Equilibria between Intermediates in Rhodanese Catalysis. J. Biol. Chem., **1983**, 258, 7894– 7896.

- [252] Cannella, C.; Berni, R.; Rosato, N.; Finazzi-Agrò, A. Active Site Modifications Quench Intrinsic Fluorescence of Rhodanese by Different Mechanisms. *Biochemistry*, **1986**, 25, 7319–7323.
- [253] Aita, N.; Ishii, K.; Akamatsu, Y.; Ogasawara, Y.; Tanabe, S. Cloning and Expression of Human Liver Rhodanese cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *231*, 56–60.
- [254] Jumper, J.; Evans, R.; Pritzel, A.; Green, T.; Figurnov, M.; Ronneberger, O.; Tunyasuvunakool, K.; Bates, R.; Žídek, A.; Potapenko, A.; Bridgland, A.; Meyer, C.; Kohl, S.A.A.; Ballard, A.J.; Cowie, A.; Romera-Paredes, B.; Nikolov, S.; Jain, R.; Adler, J.; Back, T.; Petersen, S.; Reiman, D.; Clancy, E.; Zielinski, M.; Steinegger, M.; Pacholska, M.; Berghammer, T.; Bodenstein, S.; Silver, D.; Vinyals, O.; Senior, A.W.; Kavukcuoglu, K.; Kohli, P.; Hassabis, D. Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold. *Nature*, **2021**, *596*, 583–589.
- [255] Varadi, M.; Anyango, S.; Deshpande, M.; Nair, S.; Natassia, C.; Yordanova, G.; Yuan, D.; Stroe, O.; Wood, G.; Laydon, A.; Žídek, A.; Green, T.; Tunyasuvunakool, K.; Petersen, S.; Jumper, J.; Clancy, E.; Green, R.; Vora, A.; Lutfi, M.; Figurnov, M.; Cowie, A.; Hobbs, N.; Kohli, P.; Kleywegt, G.; Birney, E.; Hassabis, D.; Velankar, S. AlphaFold Protein Structure Database: Massively Expanding the Structural Coverage of Protein-Sequence Space with High-Accuracy Models. *Nucleic Acids Res.*, **2022**, *50*, D439–D444.
- [256] Jarabak, R.; Westley, J. Human Liver Rhodanese. Nonlinear Kinetic Behavior in a Double Displacement Mechanism. *Biochemistry*, **1974**, *13*, 3233–3236.
- [257] Chow, S.F.; Horowitz, P.M.; Westley, J.; Jarabak, R. Evidence for Dynamically Determined Conformational States in Rhodanese Catalysis. J. Biol. Chem., 1985, 260, 2763–2770.
- [258] Chen, X.; Jhee, K.-H.; Kruger, W.D. Production of the Neuromodulator H2S by Cystathionine Beta-Synthase via the Condensation of Cysteine and Homocysteine. J. Biol. Chem., 2004, 279, 52082–52086.
- [259] Nagahara, N.; Ito, T.; Kitamura, H.; Nishino, T. Tissue and Subcellular Distribution of Mercaptopyruvate Sulfurtransferase in the Rat: Confocal Laser Fluorescence and Immunoelectron Microscopic Studies Combined with Biochemical Analysis. *Histochem. Cell Biol.*, **1998**, *110*, 243–250.
- [260] Pedre, B.; Dick, T.P. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase: An Enzyme at the Crossroads of Sulfane Sulfur Trafficking. *Biol. Chem.*, **2021**, 402, 223– 237.
- [261] Crawhall, J.C.; Parker, R.; Sneddon, W.; Young, E.P.; Ampola, M.G.; Efron, M.L.; Bixby, E.M. Beta Mercaptolactate-Cysteine Disulfide: Analog of Cystine in the Urine of a Mentally Retarded Patient. *Science*, **1968**, *160*, 419–420.
- [262] Ampola, M.G.; Efron, M.L.; Bixby, E.M.; Meshorer, E. Mental Deficiency and a New Aminoaciduria. *Am. J. Dis. Child.* 1960, **1969**, 117, 66–70.
- [263] Nagahara, N.; Nagano, M.; Ito, T.; Shimamura, K.; Akimoto, T.; Suzuki, H. Antioxidant Enzyme, 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase-Knockout Mice Exhibit Increased Anxiety-like Behaviors: A Model for Human Mercaptolactate-Cysteine Disulfiduria. *Sci. Rep.*, **2013**, *3*, 1986.
- [264] Fräsdorf, B.; Radon, C.; Leimkühler, S. Characterization and Interaction Studies of Two Isoforms of the Dual Localized 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase TUM1 from Humans. J. Biol. Chem., 2014, 289, 34543– 34556.
- [265] Mikami, Y.; Shibuya, N.; Kimura, Y.; Nagahara, N.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. Thioredoxin and Dihydrolipoic Acid Are Required for 3-Mercaptopyruvate

Sulfurtransferase to Produce Hydrogen Sulfide. *Biochem. J.*, **2011**, *439*, 479–485.

- [266] Westrop, G.D.; Georg, I.; Coombs, G.H. The Mercaptopyruvate Sulfurtransferase of Trichomonas Vaginalis Links Cysteine Catabolism to the Production of Thioredoxin Persulfide. J. Biol. Chem., 2009, 284, 33485– 33494.
- [267] Williams, R.A.M.; Kelly, S.M.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase of Leishmania Contains an Unusual C-Terminal Extension and Is Involved in Thioredoxin and Antioxidant Metabolism. J. Biol. Chem., 2003, 278, 1480–1486.
- [268] Nagahara, N.; Nishino, T. Role of Amino Acid Residues in the Active Site of Rat Liver Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. CDNA Cloning, Overexpression, and Site-Directed Mutagenesis. J. Biol. Chem., 1996, 271, 27395–27401.
- [269] Kimura, Y.; Toyofuku, Y.; Koike, S.; Shibuya, N.; Nagahara, N.; Lefer, D.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. Identification of H2S3 and H2S Produced by 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase in the Brain. *Sci. Rep.*, **2015**, *5*, 14774.
- [270] Kimura, Y.; Koike, S.; Shibuya, N.; Lefer, D.; Ogasawara, Y.; Kimura, H. 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Produces Potential Redox Regulators Cysteine- and Glutathione-Persulfide (Cys-SSH and GSSH) Together with Signaling Molecules H2S2, H2S3 and H2S. *Sci. Rep.*, **2017**, *7*, 10459.
- [271] Nagahara, N.; Koike, S.; Nirasawa, T.; Kimura, H.; Ogasawara, Y. Alternative Pathway of H2S and Polysulfides Production from Sulfurated Catalytic-Cysteine of Reaction Intermediates of 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2018**, 496, 648–653.
- [272] Jarabak, R.; Westley, J. Steady-State Kinetics of 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase from Bovine Kidney. Arch. Biochem. Biophys., 1978, 185, 458–465.
- [273] Vachek, H.; Wood, J.L. Purification and Properties of Mercaptopyruvate Sulfur Transferase of Escherichia Coli. *Biochim. Biophys. Acta*, **1972**, 258, 133–146.
- [274] Porter, D.W.; Baskin, S.I. The Effect of Three Alpha-Keto Acids on 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase Activity. J. Biochem. Toxicol., 1996, 11, 45–50.
- [275] Meyer, A.J.; Dick, T.P. Fluorescent Protein-Based Redox Probes. *Antioxid. Redox Signal.*, **2010**, *13*, 621–650.
- [276] Hanson, G.T.; Aggeler, R.; Oglesbee, D.; Cannon, M.; Capaldi, R.A.; Tsien, R.Y.; Remington, S.J. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-Sensitive Green Fluorescent Protein Indicators. J. Biol. Chem., 2004, 279, 13044–13053.
- [277] Gutscher, M.; Sobotta, M.C.; Wabnitz, G.H.; Ballikaya, S.; Meyer, A.J.; Samstag, Y.; Dick, T.P. Proximity-Based Protein Thiol Oxidation by H2O2-Scavenging Peroxidases. J. Biol. Chem., 2009, 284, 31532–31540.
- [278] Morgan, B.; Van Laer, K.; Owusu, T.N.E.; Ezerina, D.; Pastor-Flores, D.; Amponsah, P.S.; Tursch, A.; Dick, T.P. Real-Time Monitoring of Basal H2O2 Levels with Peroxiredoxin-Based Probes. *Nat. Chem. Biol.*, **2016**, *12*, 437– 443.
- [279] Gutscher, M.; Pauleau, A.-L.; Marty, L.; Brach, T.; Wabnitz, G.H.; Samstag, Y.; Meyer, A.J.; Dick, T.P. Real-Time Imaging of the Intracellular Glutathione Redox Potential. *Nat. Methods*, **2008**, *5*, 553–559.

- [280] Bhaskar, A.; Chawla, M.; Mehta, M.; Parikh, P.; Chandra, P.; Bhave, D.; Kumar, D.; Carroll, K.S.; Singh, A. Reengineering Redox Sensitive GFP to Measure Mycothiol Redox Potential of Mycobacterium Tuberculosis during Infection. *PLOS Pathog.*, **2014**, *10*, e1003902.
- [281] Ebersoll, S.; Bogacz, M.; Günter, L.M.; Dick, T.P.; Krauth-Siegel, R.L. A Tryparedoxin-Coupled Biosensor Reveals a Mitochondrial Trypanothione Metabolism in Trypanosomes. *eLife*, **2020**, 9.
- [282] Moseler, A.; Dhalleine, T.; Rouhier, N.; Couturier, J. Arabidopsis Thaliana 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferases Interact with and Are Protected by Reducing Systems. *J. Biol. Chem.*, **2021**, *296*, 100429.
- [283] Benchoam, D.; Cuevasanta, E.; Semelak, J.A.; Mastrogiovanni, M.; Estrin, D.A.; Möller, M.N.; Alvarez, B. Disulfides Form Persulfides at Alkaline pH Leading to Potential Overestimations in the Cold Cyanolysis Method. *Free Radic. Biol. Med.*, **2023**, 207, 63–71.
- [284] Benchoam, D.; Semelak, J.A.; Cuevasanta, E.; Mastrogiovanni, M.; Grassano, J.S.; Ferrer-Sueta, G.; Zeida, A.; Trujillo, M.; Möller, M.N.; Estrin, D.A.; Alvarez, B. Acidity and Nucleophilic Reactivity of Glutathione Persulfide. J. Biol. Chem., 2020, 295, 15466–15481.
- [285] Ellis, K.J.; Morrison, J.F. Buffers of Constant Ionic Strength for Studying pH-Dependent Processes. *Methods Enzymol.*, **1982**, *87*, 405–426.
- [286] Sardi, F.; Manta, B.; Portillo-Ledesma, S.; Knoops, B.; Comini, M.A.; Ferrer-Sueta, G. Determination of Acidity and Nucleophilicity in Thiols by Reaction with Monobromobimane and Fluorescence Detection. *Anal. Biochem.*, **2013**, *435*, 74–82.
- [287] Wintner, E.A.; Deckwerth, T.L.; Langston, W.; Bengtsson, A.; Leviten, D.; Hill, P.; Insko, M.A.; Dumpit, R.; VandenEkart, E.; Toombs, C.F.; Szabo, C. A Monobromobimane-Based Assay to Measure the Pharmacokinetic Profile of Reactive Sulphide Species in Blood. *Br. J. Pharmacol.*, **2010**, *160*, 941–957.
- [288] Ferrer-Sueta, G.; Campolo, N.; Trujillo, M.; Bartesaghi, S.; Carballal, S.; Romero, N.; Alvarez, B.; Radi, R. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chem. Rev.*, **2018**, *118*, 1338–1408.
- [289] Trujillo, M.; Radi, R. Peroxynitrite Reaction with the Reduced and the Oxidized Forms of Lipoic Acid: New Insights into the Reaction of Peroxynitrite with Thiols. Arch. Biochem. Biophys., 2002, 397, 91–98.
- [290] Jiang, Z.Y.; Hunt, J.V.; Wolff, S.P. Ferrous Ion Oxidation in the Presence of Xylenol Orange for Detection of Lipid Hydroperoxide in Low Density Lipoprotein. Anal. Biochem., **1992**, 202, 384–389.
- [291] Ferrer-Sueta, G.; Manta, B.; Botti, H.; Radi, R.; Trujillo, M.; Denicola, A. Factors Affecting Protein Thiol Reactivity and Specificity in Peroxide Reduction. *Chem. Res. Toxicol.*, **2011**, *24*, 434–450.
- [292] Trummal, A.; Lipping, L.; Kaljurand, I.; Koppel, I.A.; Leito, I. Acidity of Strong Acids in Water and Dimethyl Sulfoxide. J. Phys. Chem. A, 2016, 120, 3663–3669.
- [293] Williams, M. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. 14th Edition. Merck Inc., Whitehouse Station/Rahway, New Jersey, October 2006. Cloth 0-911910-00X. \$125. Pp. 2564. Drug Dev. Res., 2006, 67, 870–870.
- [294] Silverstein, T.P.; Heller, S.T. pKa Values in the Undergraduate Curriculum: What Is the Real pKa of Water? *J. Chem. Educ.*, **2017**, *94*, 690–695.

- [295] Jahn, S.C.; Rowland-Faux, L.; Stacpoole, P.W.; James, M.O. Chloride Concentrations in Human Hepatic Cytosol and Mitochondria Are a Function of Age. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2015**, *459*, 463–468.
- [296] Gasteiger, E.; Hoogland, C.; Gattiker, A.; Duvaud, S.; Wilkins, M.R.; Appel, R.D.; Bairoch, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: *The Proteomics Protocols Handbook*; Walker, J.M., Ed.; Springer Protocols Handbooks; Humana Press: Totowa, NJ, **2005**; pp. 571–607.
- [297] Verhoeven, P.; Hefter, G.; May, P.M. Dissociation Constant of Hydrogen Cyanide in Saline Solutions. *Min. Metall. Explor.*, **1990**, *7*, 185–188.
- [298] Luo, G.X.; Horowitz, P.M. The Sulfurtransferase Activity and Structure of Rhodanese Are Affected by Site-Directed Replacement of Arg-186 or Lys-249. J. Biol. Chem., **1994**, 269, 8220–8225.
- [299] Harris, T.K.; Turner, G.J. Structural Basis of Perturbed pKa Values of Catalytic Groups in Enzyme Active Sites. *IUBMB Life*, **2002**, *53*, 85–98.
- [300] Riener, C.K.; Kada, G.; Gruber, H.J. Quick Measurement of Protein Sulfhydryls with Ellman's Reagent and with 4,4'-Dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2002**, *373*, 266–276.
- [301] Hanaoka, K.; Sasakura, K.; Suwanai, Y.; Toma-Fukai, S.; Shimamoto, K.; Takano, Y.; Shibuya, N.; Terai, T.; Komatsu, T.; Ueno, T.; Ogasawara, Y.; Tsuchiya, Y.; Watanabe, Y.; Kimura, H.; Wang, C.; Uchiyama, M.; Kojima, H.; Okabe, T.; Urano, Y.; Shimizu, T.; Nagano, T. Discovery and Mechanistic Characterization of Selective Inhibitors of H2S-Producing Enzyme: 3-Mercaptopyruvate Sulfurtransferase (3MST) Targeting Active-Site Cysteine Persulfide. Sci. Rep., **2017**, *7*, 40227.