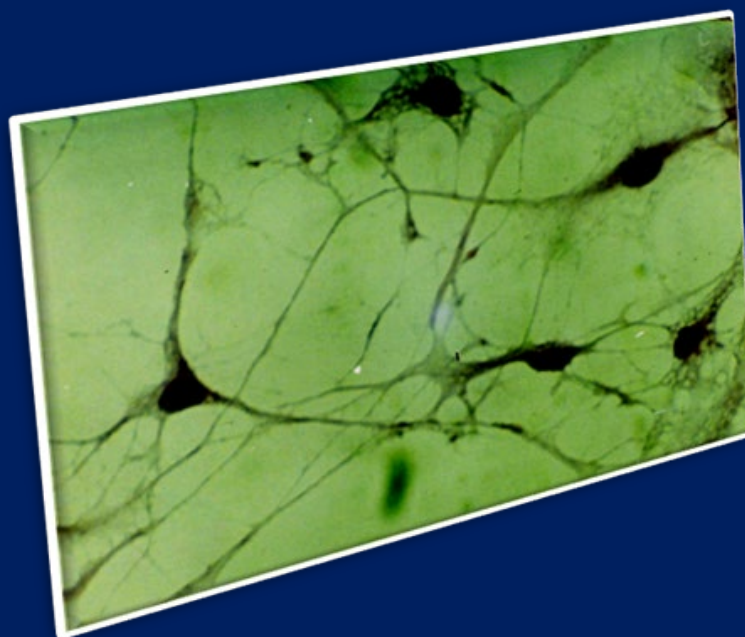




UNIVERSITATEA ALEXANDRU IOAN CUZA din IAȘI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

Habilitation thesis

Conf. Univ. dr. Constantin MUNTEANU



**Molecular Mechanisms and Physiological Implications of
Hydrogen Sulfide Signaling in Cellular Homeostasis**

2025

ABBREVIATIONS

ACE2: Angiotensin-Converting Enzyme 2	IL-6: Interleukin 6
AD: Alzheimer's	ILAE: International League Against Epilepsy
AED: antiepileptic drug	IRB: Institutional Review Board
AIDS: acquired immunodeficiency syndrome	LPL: Lipoprotein Lipase AD Alzheimer's disease
ALP: Autophagy-Lysosome Pathway	LRRK2: Leucine-Rich Repeat Kinase 2
ALS: Amyotrophic Lateral Sclerosis	MPTP: 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridine
AP39: A specific H ₂ S-releasing compound	MRI: Magnetic Resonance Imaging
APP: Amyloid Precursor Protein	MRI: magnetic resonance imaging
ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrome	MS: multiple sclerosis
ART: antiretroviral therapy	MSIF: Multiple Sclerosis International Federation
A β : Beta-amyloid	mtDNA: Mitochondrial DNA
BBB: Blood-Brain Barrier	NaHS: Sodium hydrosulfide
BPSD: behavioral and psychological symptoms of dementia	NF- κ B: Nuclear Factor-kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells
CBS: Cystathionine beta-synthase	NFTs: Neurofibrillary Tangles
CMA: Chaperone-Mediated Autophagy	NMAK: Neuro-Myo-Arthro-Kinetic
CNS: central nervous system	OCRs: Oxygen Consumption Rates
COPD: Chronic Obstructive Pulmonary Disease	ORF3a: Open Reading Frame 3a
COVID-19: Coronavirus Disease 2019	PD: Parkinson's disease
COX-2: Cyclooxygenase-2	PD: Parkinson's Disease
CRPS: complex regional pain syndrome	PET: Positron Emission Tomography
CSE: Cystathionine gamma-lyase	PET: positron emission tomography
CSF: cerebrospinal fluid	PHF: Paired Helical Filaments
CSF: Cerebrospinal Fluid	PINK1: PTEN-Induced Putative Kinase 1
CT: computerized tomography	PRISMA: Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
DALY: disability-adjusted life year	ROS: Reactive Oxygen Species
DTI: Diffusion Tensor Imaging	RTA: road traffic accident
ECM: Extracellular Matrix	SARS-CoV-2 - Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2
EEG: electroencephalography	SCI: Spinal Cord Injury
ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	sFlt-1: Soluble isoform of Flt-1
EVs: Extracellular Vesicles	TFEB: Transcription Factor EB
GSH: Glutathione	TGF β 1: Transforming Growth Factor beta 1
GY4137: A specific H ₂ S donor compound	TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha
H ₂ S: Hydrogen Sulfide	tSCI: Traumatic Spinal Cord Injury
HIS: International Headache Society	UPR: Unfolded Protein Response
IACUC: Institutional Animal Care and Use Committee	UPS: Ubiquitin-Proteasome System
ICF: International Classification of Functioning, Disability, and Health	VEGF: Vascular endothelial growth factor
ICH: intracerebral hemorrhage	α SMA: Alpha Smooth Muscle Actin
IL: Interleukin	
IL-1: Interleukin 1	

CONTENTS

ABBREVIATIONS	3
REZUMAT.....	4
ABSTRACT	6
SECTION I PROFESSIONAL, ACADEMIC, AND SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS	
General Introduction.....	10
CHAPTER 1 – PROFESSIONAL ACHIEVEMENTS	13
I.1.1 Professional path: professional degrees, training courses, certificates obtained	13
I.1.2 Projects, awards, and research contracts signed.....	16
I.1.3 Management and leadership experience	18
CHAPTER 2 – ACADEMIC ACHIEVEMENTS	20
I.2.1 Trainer, guest lecturer/speaker at conferences.....	20
I.2.2 Editorial team member and reviewer.....	21
I.2.3 Ongoing Projects.....	23
CHAPTER 3– SCIENTIFIC ACHIEVEMENTS – MAIN RESEARCH DIRECTIONS	
I.3.1 The Role of Hydrogen Sulfide in the Regulation of Cellular Homeostasis ..26	
I.3.1.1 Introduction	26
I.3.1.2 Aim of the studies.....	30
I.3.1.3 Material and methods	32
I.3.1.4 Results	36
I.3.1.5 Discussion	40
I.3.1.6 Conclusions.....	43
I.3.2 H₂S in Intracellular Signaling and Inter-cellular Communication44	
I.3.2.1 Introduction.....	44
I.3.2.2 Aim of the studies.....	52
I.3.2.3 Materials and methods.....	53
I.3.2.4 Results	66
I.3.2.5 Discussion	69
I.3.2.6 Conclusions.....	70
I.3.3 The Physiological Implications of H₂S in the Body71	
I.3.3.1 Introduction.....	71
I.3.3.2 Aim of the studies.....	75
I.3.3.3 Materials and methods.....	76
I.3.3.4 Results	77
I.3.3.5 Discussion	79
I.3.3.6 Conclusions	82
SECTION II PERSPECTIVES – NEW RESEARCH DIRECTIONS	
II. 1 Role of H₂S in the Regulation of Oxidative Stress and Cellular Longevity .83	
II. 2 H₂S in the Modulation of Cellular Differentiation and Regeneration85	
II. 3 H₂S and Immune Response Modulation87	
II. 4 Perspectives for Didactic activity89	
GENERAL CONCLUSION	91
SECTION III	
REFERENCES	92

REZUMAT

Elaborarea acestei teze de abilitare reprezintă o etapă importantă în parcursul meu profesional, având în vedere semnificația termenului "habilitare" și atributele sale legate de potrivire și competență. În acest sens, prezint în această teză experiențele relevante, proiectele de cercetare, publicațiile și planurile care au contribuit la dezvoltarea și consolidarea expertizei și cunoștințelor mele în domeniul de studiu. Prin prezentarea realizărilor mele academice, profesionale și științifice, urmăresc să demonstrez angajamentul meu față de excelența în cercetare și contribuțiile aduse în domeniul specific de activitate științifică.

Articolele publicate demonstrează o activitate științifică semnificativă în domeniul studiat, concretizat în teza de abilitare referitoare la "Mecanisme moleculare și implicații fiziologice ale semnalizării cu hidrogen sulfurat (H_2S) în homeostazia celulară". Articolele acoperă diferite aspecte ale subiectului, inclusiv mecanismele moleculare și celulare ale H_2S , efectele sale în diferite condiții patologice și intervențiile terapeutice potențiale.

Publicațiile evidențiază expertiza în explorarea rolului H_2S în neurologie, cardiologie, diabet zaharat și condiții ischemice. Recenziile sistematice, studiile experimentale și validările clinice prezentate în articole contribuie la înțelegerea impactului H_2S asupra proceselor celulare și moleculare, precum și la potențialul său terapeutic în diferite patologii.

Prezentarea tezei include o analiză detaliată a rezultatelor cercetărilor realizate, precum și o evaluare critică a contribuțiilor personale la cunoașterea academică și științifică existentă cu privire la hidrogenul sulfurat și oxigenarea tisulară.

În procesul de elaborare a prezentei teze de abilitare, am utilizat diferite metode și am atins diferite segmente ale dezvoltării profesionale, precum:

- Prezentarea proiectelor de cercetare: sunt descrise proiectele de cercetare pe care le-am coordonat sau în care am fost implicat, evidențiind rezultatele obținute și impactul acestora asupra domeniului de studiu. Este subliniată originalitatea și relevanța cercetărilor realizate. Sunt evidențiate colaborările cu alte instituții sau cercetători din țară sau din străinătate, precum și obținerea de granturi de cercetare sau finanțare pentru proiecte științifice.

- Publicații și lucrări științifice: sunt evidențiate publicațiile și lucrările științifice în care am contribuit. Sunt prezentate articole publicate în reviste de prestigiu, capitole de carte sau prezentări la conferințe importante, subliniind calitatea și impactul lucrărilor publicate.

- Activitate didactică: este prezentată implicarea în activitatea didactică, precum predarea cursurilor, îndrumarea studenților și supervizarea lucrărilor de licență sau de disertație. Se evidențiază, de asemenea, activitățile de mentorat și formare a tinerilor cercetători.

- Contribuții la dezvoltarea domeniului: este prezenta implicarea în activități academice și științifice, precum organizarea de conferințe, simpozioane sau workshop-uri în domeniul meu de expertiză, precum și participarea la comitete științifice sau academice relevante.

- Pe lângă prezentarea muncii efectuate, este necesară și o abordare critică a rezultatelor și a contribuțiilor proprii, punctând importanța și originalitatea acestora în contextul domeniului.

- Conținutul acestei teze descrie preocupările și realizările mele științifice, profesionale și academice din perioada postdoctorală, dar și o parte din proiectele de viitor care au prins déjà contur și vor avea finalitate în anii ce vor urma.

Teza intitulată „Mecanisme moleculare și implicații fiziologice ale semnalizării cu hidrogen sulfurat (H_2S) în homeostazia celulară” abordează o temă de vârf în biologia celulară și moleculară, concentrându-se pe elucidarea modului în care H_2S influențează funcțiile celulare și procesele fiziologice. Această lucrare oferă o perspectivă cuprinzătoare asupra rolului H_2S în biologie, de la nivelul molecular până la implicarea sa în diverse condiții fiziologice și patologice.

Secțiunea I a tezei începe cu o introducere generală în biologia și biochimia H_2S , stabilind fundația pentru explorările ulterioare. Se acordă o atenție specială rolului H_2S ca molecule semnalizatoare și modulator al proceselor celulare esențiale.

Capitolul 1 este dedicat studiului mecanismelor detaliate prin care H_2S interacționează la nivel celular și molecular. Aceasta include o analiză a modului în care H_2S influențează funcții celulare precum metabolismul, apoptoza și homeostazia celulară. Se explică metodele și tehnicile folosite pentru a studia aceste procese, cu accent pe abordări experimentale inovatoare și tehnici avansate.

Rezultatele prezentate în Capitolul 1 evidențiază descoperiri semnificative referitoare la modul în care H_2S modulează funcțiile celulare și contribuie la menținerea homeostaziei. Aceste constatări sunt analizate și interpretate în contextul literaturii de specialitate, contribuind la o înțelegere mai profundă a rolului H_2S în biologia celulară și moleculară.

În Capitolul 2, teza se concentrează asupra efectelor fiziologice ale H_2S , explorând implicarea sa în diverse stări fiziologice și patologice. Se descriu scopurile și metodologia studiilor care investighează rolul H_2S în condiții specifice, cum ar fi stresul oxidativ, inflamația și procesele de regenerare celulară. Acest capitol subliniază importanța H_2S în reglarea și modularea proceselor fiziologice complexe, demonstrând impactul său în contextul sănătății și bolii.

Prin urmare, această teză aduce o contribuție semnificativă la cunoașterea existentă despre H_2S , extinzând înțelegerea noastră asupra rolului său vital în homeostazia celulară și fiziologia organismului. Ea oferă o bază solidă pentru cercetări viitoare și potențiale aplicații terapeutice, deschizând noi căi în domeniul biologiei celulare și moleculare.

Prezentarea rezultatelor în Capitolul 2 subliniază rolul esențial al H₂S în reglarea proceselor celulare și moleculare. Studiile experimentale detaliate ilustrează cum H₂S interacționează cu diverse căi celulare, relevând complexitatea mecanismelor sale de acțiune. Aceste descoperiri evidențiază o abordare multifacetată a răspunsurilor mediate de H₂S, oferind noi perspective pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice precise și eficiente.

Discuțiile din acest capitol analizează minuțios rezultatele în contextul literaturii de specialitate, concentrându-se pe elucidarea mecanismelor fundamentale ale efectelor H₂S la nivel celular și molecular. Se examinează implicațiile acestor rezultate pentru înțelegerea mai profundă a patologiei și pentru formularea unor noi abordări terapeutice.

Capitolul 3 investighează modul în care H₂S influențează oxigenarea tisulară și consecințele sale sistemice. Introducerea capitolului oferă o imagine de ansamblu asupra importanței oxigenării tisulare în contextul medical și biologic, punând accentul pe interacțiunile cu H₂S. Obiectivele studiilor din acest capitol sunt de a explora căile sistemice modulate de H₂S și potențialele lor implicații terapeutice. Materialele și metodele folosite în aceste investigații sunt detaliate, subliniind standardul înalt de rigurozitate și reproductibilitate științifică.

Rezultatele prezentate în Capitolul 3 descriu efectele H₂S asupra oxigenării tisulare, arătând un spectru larg de influențe sistemice și potențiale aplicații terapeutice. Prin studii comprehensive, sunt identificate și caracterizate căile sistemice afectate de H₂S, ilustrând potențialul său ca agent terapeutic.

Discuțiile din acest capitol oferă o analiză critică și detaliată a rezultatelor, punându-le în contextul cunoștințelor științifice actuale. Se explorează mecanismele sistemice prin care H₂S exercită efectele sale terapeutice și se discută implicațiile acestor descoperiri pentru dezvoltarea de noi strategii terapeutice care țintesc căile sistemice.

Secțiunea a II-a a tezei prezintă noi direcții de cercetare și perspective pentru studiul H₂S în contextul patologiei. Această secțiune propune abordări experimentale inovatoare, de la investigații pe culturi celulare la studii pe animale și cercetări clinice pe subiecți umani, oferind un traseu pentru explorarea continuă a H₂S și a potențialului său terapeutic.

În concluzie, teza oferă o analiză cuprinzătoare a rolului H₂S în homeostazia celulară și sistemică, contribuind semnificativ la baza de cunoștințe din domeniu. Descoperirile au implicații importante pentru dezvoltarea de noi strategii în gestionarea patologiilor, stimulând cercetări suplimentare și progrese în domeniul medical. Aș dori să îmi exprim recunoștința pentru îndrumarea academică și științifică excepțională oferită de Prof. univ. dr. Gelu Onose.

ABSTRACT

The development of this qualification thesis represents an important stage in my professional career, considering the meaning of the term "qualification" and its attributes related to suitability and competence. In this sense, I present in this thesis the relevant experiences, research projects, publications and plans that have contributed to the development and consolidation of my expertise and knowledge in the field of study. By presenting my academic, professional and scientific achievements, I aim to demonstrate my commitment to excellence in research and contributions to the specific field of scientific activity.

The published articles demonstrate a significant scientific activity in the studied field, embodied in the habilitation thesis on "Molecular mechanisms and physiological implications of hydrogen sulfide (H₂S) signaling in cellular homeostasis". The articles cover various aspects of the topic, including the molecular and cellular mechanisms of H₂S, its effects in various pathological conditions, and potential therapeutic interventions.

Publications highlight expertise in exploring the role of H₂S in neurology, cardiology, diabetes and ischemic conditions. The systematic reviews, experimental studies and clinical validations presented in the articles contribute to the understanding of the impact of H₂S on cellular and molecular processes, as well as its therapeutic potential in various pathologies.

The thesis presentation includes a detailed analysis of the research results, as well as a critical evaluation of personal contributions to existing academic and scientific knowledge regarding hydrogen sulfide and tissue oxygenation.

In the process of developing this qualification thesis, I used different methods and touched different segments of professional devotion, such as:

- Presentation of research projects: the research projects that I coordinated or in which I was involved are described, highlighting the results obtained and their impact on the field of study. The originality and relevance of the research is emphasized. Collaborations with other institutions or researchers from the country or abroad are highlighted, as well as obtaining research grants or funding for scientific projects.

- Publications and scientific papers: the publications and scientific papers in which I have contributed are highlighted. Articles published in prestigious journals, book chapters or presentations at important conferences are presented, emphasizing the quality and impact of the published works.

- Didactic activity: the involvement in the didactic activity, such as teaching courses, guiding students, and supervising undergraduate or dissertation work, is presented. The mentoring and training activities of young researchers are also highlighted.

- Contributions to the development of the field: involvement in academic and scientific activities, such as the organization of conferences, symposiums or workshops in my field of expertise, as well as participation in relevant scientific or academic committees is present.

- In addition to the presentation of the work performed, a critical approach to the results and own contributions is also necessary, pointing out their importance and originality in the context of the field.

- The content of this thesis describes my scientific, professional and academic concerns and achievements from the postdoctoral period, but also part of the future projects that have already taken shape and will have finality in the years to come.

The thesis entitled "Molecular Mechanisms and Physiological Implications of Hydrogen Sulfide (H₂S) Signaling in Cellular Homeostasis" addresses a cutting-edge topic in cellular and molecular biology, focusing on elucidating how H₂S influences cellular functions and physiological processes. This work provides a comprehensive insight into the role of H₂S in biology, from the molecular level to its involvement in various physiological and pathological conditions.

Section I of the thesis begins with a general introduction to the biology and biochemistry of H₂S, laying the foundation for further explorations. Special attention is paid to the role of H₂S as a signaling molecule and modulator of essential cellular processes.

Chapter 1 is devoted to the study of the detailed mechanisms by which H₂S interacts at the cellular and molecular level. This includes an analysis of how H₂S influences cellular functions such as metabolism, apoptosis and cellular homeostasis. The methods and techniques used to study these processes are explained, with an emphasis on innovative experimental approaches and advanced techniques.

The results presented in Chapter 1 highlight significant discoveries regarding how H₂S modulates cellular functions and contributes to the maintenance of homeostasis. These findings are analyzed and interpreted in the context of the literature, contributing to a deeper understanding of the role of H₂S in cellular and molecular biology.

In Chapter 2, the thesis focuses on the physiological effects of H₂S, exploring its involvement in various physiological and pathological conditions. The aims and methodology of studies investigating the role of H₂S in specific conditions such as oxidative stress, inflammation and cellular regeneration processes are described. This chapter highlights the importance of H₂S in the regulation and modulation of complex physiological processes, demonstrating its impact in the context of health and disease.

Therefore, this thesis makes a significant contribution to the existing knowledge of H₂S, expanding our understanding of its vital role in cellular homeostasis and organismal physiology. It provides a solid foundation for future research and potential therapeutic applications, opening new avenues in the field of cellular and

molecular biology.

The presentation of results in Chapter 2 emphasizes the essential role of H₂S in the regulation of cellular and molecular processes. Detailed experimental studies illustrate how H₂S interacts with various cellular pathways, revealing the complexity of its mechanisms of action. These findings highlight a multifaceted approach to H₂S-mediated responses, providing new insights for the development of precise and effective therapeutic strategies.

The discussions in this chapter scrutinize the results in the context of the literature, focusing on elucidating the fundamental mechanisms of H₂S effects at the cellular and molecular level. The implications of these results for a deeper understanding of the pathology and for the formulation of new therapeutic approaches are examined.

Chapter 3 investigates how H₂S influences tissue oxygenation and its systemic consequences. The introduction to the chapter provides an overview of the importance of tissue oxygenation in the medical and biological context, emphasizing interactions with H₂S. The objectives of the studies in this chapter are to explore the systemic pathways modulated by H₂S and their potential therapeutic implications. The materials and methods used in these investigations are detailed, emphasizing the high standard of scientific rigor and reproducibility.

The results presented in Chapter 3 describe the effects of H₂S on tissue oxygenation, showing a broad spectrum of systemic influences and potential therapeutic applications. Through comprehensive studies, the systemic pathways affected by H₂S are identified and characterized, illustrating its potential as a therapeutic agent.

The discussions in this chapter provide a critical and detailed analysis of the results, placing them in the context of current scientific knowledge. The systemic mechanisms by which H₂S exerts its therapeutic effects are explored and the implications of these findings for the development of new therapeutic strategies targeting systemic pathways are discussed.

Section II of the thesis presents new research directions and perspectives for the study of H₂S in the context of pathology. This section proposes innovative experimental approaches, from cell culture investigations to animal studies and clinical research in human subjects, providing a pathway for continued exploration of H₂S and its therapeutic potential.

In conclusion, the thesis provides a comprehensive review of the role of H₂S in cellular and systemic homeostasis, contributing significantly to the knowledge base in the field. The findings have important implications for the development of new strategies in the management of pathologies, stimulating further research and advances in the medical field. I would like to express my gratitude for the exceptional academic and scientific guidance provided by Prof. univ. Dr. Gelu Onose.

