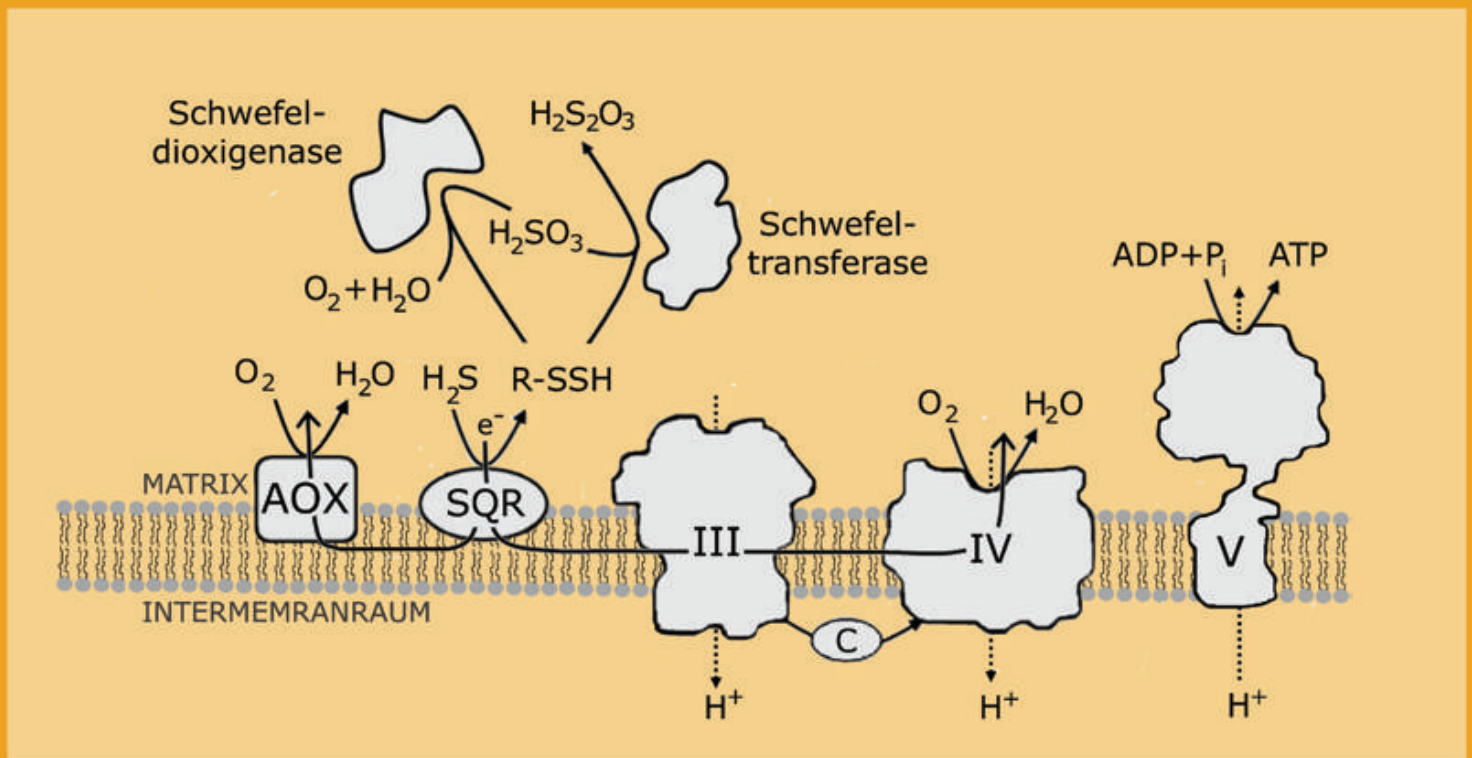


Einblicke in den Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation bei Tieren



Einblicke in den Mechanismus der mitochondriellen Sulfidoxidation bei Tieren

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Tatjana Hildebrandt
aus Düsseldorf

Oktober 2007

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

1. Aufl. - Göttingen : Cuvillier, 2008
Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss. 2007
978-3-86727-583-5

Aus dem Institut für Zoophysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Manfred K. Grieshaber

1. Korreferent: Prof. Dr. Georg Groth
2. Korreferent: Prof. Dr. Helmut Wieczorek

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2007

© CUVILLIER VERLAG, Göttingen 2008
Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen
Telefon: 0551-54724-0
Telefax: 0551-54724-21
www.cuvillier.de

Alle Rechte vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung
des Verlages ist es nicht gestattet, das Buch oder Teile
daraus auf fotomechanischem Weg (Fotokopie, Mikrokopie)
zu vervielfältigen.

1. Auflage, 2008
Gedruckt auf säurefreiem Papier

978-3-86727-583-5

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Sulfid als Gift	1
1.2	Sulfidstoffwechsel bei Säugetieren	2
1.2.1	Enzymatische Sulfidproduktion	2
1.2.2	Physiologische Funktionen von Sulfid und Persulfiden	3
1.2.3	Enzymatische Sulfidoxidation	5
1.3	Sulfidstoffwechsel bei sulfidadaptierten Tieren	6
1.3.1	Forschungsschwerpunkt Sulfidoxidation	7
1.3.2	Der Sulfidstoffwechsel des Wattwurms, <i>A. marina</i>	9
1.4	Ziele der vorliegenden Arbeit	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Chemikalien	13
2.2	Enzyme	13
2.3	Versuchstiere	14
2.4	Reinigungsprotokolle	14
2.4.1	Präparation von Mitochondrien aus Rattenleber	14
2.4.2	Präparation von Mitochondrien aus <i>A. marina</i>	15
2.4.3	Präparation von Mitochondrienmembranen und -matrix	15
2.4.4	Reinigung der Schwefeldioxygenasen und -transferasen	15
2.4.4.1	Größenausschlusschromatographie	16
2.4.4.2	Anionenaustauschchromatographie	16
2.4.4.3	Kationenaustauschchromatographie	17
2.5	Proteinanalyse	17
2.5.1	Proteinbestimmung	17
2.5.2	SDS-Gelelektrophorese	17
2.5.3	Peptidsequenzierung mittels Massenspektrometrie	18
2.6	Charakterisierung isolierter Mitochondrien	19
2.6.1	Bestimmung des O_2 -Verbrauchs isolierter Mitochondrien	19

2.6.2	Bestimmung der ATP-Produktion isolierter Mitochondrien	21
2.6.3	Bestimmung der H_2O_2 -Produktion isolierter Mitochondrien	22
2.7	Enzymatische Tests	22
2.7.1	Aktivitätsbestimmung der Cytochrom c Oxidase	22
2.7.2	Aktivitätsbestimmung der Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase	23
2.7.3	Aktivitätsbestimmung der Schwefeldioxygenase	23
2.7.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten von Schwefeltransferasen	24
2.7.4.1	Bestimmung der K_m -Werte der Schwefeltransferasen	25
2.7.4.2	Oxidationsempfindlichkeit der Schwefeltransferasen	25
2.8	Schwefelverbindungen	26
2.8.1	Herstellung der Substratlösungen	26
2.8.1.1	Herstellung von Sulfid- und Sulfit-Stammlösungen	26
2.8.1.2	Sulfanschwefel als Substrat	26
2.8.2	Analyse von Schwefelverbindungen	27
2.8.2.1	Sulfidbestimmung	27
2.8.2.2	Bestimmung von Persulfiden	28
2.8.2.3	Bestimmung von Thiocyanat	28
2.8.2.4	Bestimmung von Thiolen mittels HPLC	29
2.8.2.5	Sulfatbestimmung	30
2.9	Statistik	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Mitochondrielle Sulfidoxidation	31
3.1.1	Regulation der Sulfidoxidation bei <i>A. marina</i>	31
3.1.1.1	Einflüsse von GSH, Ascorbat und DHA	32
3.1.1.2	Sauerstoffaffinitäten der terminalen Oxidasen	35
3.1.1.3	Wasserstoffperoxidproduktion der Mitochondrien	37
3.1.1.4	Hemmung der Cytochrom c Oxidase	39
3.1.2	Sulfid als Atmungssubstrat bei Rattenlebermitochondrien	40
3.1.2.1	Einfluss von Glutamat	42
3.2	Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation	46
3.2.1	Stöchiometrie der mitochondrialen Sulfidoxidation	46
3.2.2	SQR: Oxidation von Sulfid zu Sulfanschwefel	47
3.2.3	Oxidation von Sulfanschwefel in der Mitochondrienmatrix	50
3.2.3.1	Identifizierung der Teilreaktionen	54
3.2.3.2	Reinigung der Schwefeldioxygenasen und -transferasen	57
3.2.3.3	Charakterisierung der SDO und PT	63

4	Diskussion	71
4.1	Reaktionssequenz der Sulfidoxidation	71
4.1.1	Thiosulfat als Produkt der mitochondrialen Sulfidoxidation	72
4.1.2	Erster Reaktionsschritt: SQR	73
4.1.3	Zweiter Reaktionsschritt: SDO	76
4.1.4	Dritter Reaktionsschritt: Schwefeltransferase	82
4.1.4.1	Identifizierung der Persulfidtransferase	82
4.1.4.2	Struktur und Reaktionsmechanismus	84
4.1.4.3	Isoformen	86
4.1.4.4	Phosphorylierung und oxidative Inaktivierung	86
4.1.4.5	Physiologische Relevanz der Persulfidtransferase-Aktivität	88
4.1.5	Die Sulfidoxidation als Teil des Schwefelstoffwechsels	91
4.2	Raten und Regulation der Sulfidoxidation	94
4.2.1	Sulfidoxidation bei Säugetieren und Invertebraten	94
4.2.2	Die erweiterte Atmungskette des Wattwurms	96
4.2.3	Redoxregulation der Sulfidoxidation bei <i>A. marina</i>	98
4.2.4	Energiekonservierende Sulfidoxidation	104
4.2.4.1	Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion	105
4.2.4.2	Aktivierung der energiekonservierenden Sulfidoxidation	109
5	Zusammenfassung	115
6	Abstract	117
7	Literatur	119

Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
A. dest.	deionisiertes Wasser
AOX	Alternative Oxidase
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	basic local alignment search tool
BSA	Rinderserumalbumin
C	Konzentration
cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosintriphosphat
Caps	3-(Cyclohexylamino)-1-propansulfonsäure
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CDO	Cystein Dioxigenase
CSE	Cystathionin- γ -Lyase
DHA	Dehydroascorbat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNP	2,4-Dinitrophenol
dQ _{ox.}	oxidiertes decyl-Ubichinon
dQ _{red.}	reduziertes decyl-Ubichinol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylendioxybis(ethylenitrilo)-tetraessigsäure
FAD/FADH ₂	Flavinadenindinucleotid (oxidiert/reduziert)
FEP	Fluorinated ethylene propylene
GSH/GSSG	Glutathion (reduziert/oxidiert)
GSSH	Glutathionpersulfid
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IC ₅₀	Inhibitorkonstante
K _m	Michaelis-Menten Konstante
LTP	Langzeitpotenzierung
MES	2-(N-Morpholino)-ethanesulfonsäure
NAD ⁺ /NADH	Nicotinamadenindinucleotid (oxidiert/reduziert)
NADP ⁺ /NADPH	Nicotinamadenindinucleotidphosphat (oxidiert/reduziert)
NMDA	N-Methyl-d-Aspartat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAPS	3-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PrSSG	glutathionyliertes Protein

PT	Persulfidtransferase
$Q_{ox.}$	oxidiertes Coenzym Q_{10}
$Q_{red.}$	reduziertes Coenzym Q_{10}
QQTOF MS	Quadropol-Quadropol-Flugzeit Massenspektrometer
RCR	Respiratorischer Kontrollfaktor
ROS	Reaktive Sauerstoffverbindung
R-SSH	proteingebundenes Persulfid
SDO	Schwefeldioxygenase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SHAM	Salicylhydroxaminsäure
SQR	Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$)

Ein- und Dreibuchstabencode der Aminosäuren

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutamat	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

So facettenreich wie das Molekül selbst sind die Forschungsansätze, die sich mit Sulfid¹, der am stärksten reduzierten Schwefelverbindung, beschäftigen. In Abhängigkeit von seiner Konzentration und dem betrachteten Organismus kann Sulfid als Gift, Signalmolekül oder auch als Energieträger angesehen werden.

1.1 Sulfid als Gift

Lange bevor die zahlreichen physiologischen Funktionen von Sulfid bekannt wurden, war seine Wirkung als Gift aufgrund einiger negativer Erfahrungen von Arbeitern in der Öl- und Gasindustrie, der Papierindustrie und der Kanalisation vertraut (Burnett et al. 1977, Arnold et al. 1985). Eine leichte Sulfidvergiftung macht sich hauptsächlich durch Entzündungen der Schleimhäute in den Augen und im Atmungstrakt bemerkbar. In höheren Konzentrationen (> 700 ppm) hemmt Sulfid den zentralen Atemimpuls im Hirnstamm und führt so innerhalb von Minuten zum Tod der Opfer (Beauchamp et al. 1984). Der genaue Wirkmechanismus ist noch nicht bekannt, obwohl bereits einige Hinweise auf neuronale Veränderungen existieren, die durch Sulfid hervorgerufen werden. Unmittelbar nach Beginn der Sulfidexposition steigt die Konzentration der als Neurotransmitter fungierenden Aminosäuren Glutamat, Glycin und Taurin im Hirnstamm (Kombian et al. 1988). Auch eine Hemmung der Monoaminoxidase wurde nachgewiesen, woraufhin 5-Hydroxytryptamin und die Catecholamine Noradrenalin und Dopamin im Gewebe akkumulieren (Warenycia et al. 1989). Außerdem bindet Sulfid reversibel aber hochaffin an Cytochrom *aa₃* der Cytochrom c Oxidase und hemmt daher bereits in niedrigen mikromolaren Konzentrationen die mitochondrielle Atmung (Nicholls 1975). Dadurch wird einerseits der Energiestoffwechsel der betroffenen Zellen stark eingeschränkt und andererseits möglicherweise die Produktion radikaler Sauerstoffspezies begünstigt (Eghbal et al. 2004). Die Geruchsschwelle für H₂S liegt beim Menschen weit unterhalb der schädlichen Konzentration, so dass der unan-

¹Die Bezeichnung Sulfid wird als Sammelbegriff für die undissoziierte Form (H₂S) sowie die Ionen HS⁻ und S²⁻ verwendet

genehme Gestank nach faulen Eiern zum Verlassen belasteter Gebiete anregt. Gefährlich wird die Situation erst, wenn die lokale Sulfidkonzentration ca. 150 ppm überschreitet, wodurch der menschliche Geruchssinn gehemmt wird und die Bedrohung unerkannt bleibt (Beauchamp et al. 1984).

1.2 Sulfidstoffwechsel bei Säugetieren

Für Erstaunen sorgte vor einigen Jahren die Erkenntnis, dass die verschiedensten Gewebe von Säugetieren enzymatisch Sulfid produzieren (Abe & Kimura 1996, Hosoki et al. 1997, Geng et al. 2004). Es war infolge dessen nicht mehr haltbar, Sulfid ausschließlich als Gift zu betrachten, und die Vermutung kam auf, dass dieses Gas auch physiologische Funktionen haben könnte.

1.2.1 Enzymatische Sulfidproduktion

H₂S kann an unterschiedlichen Stellen des zellulären Schwefelmetabolismus entstehen (Abb. 1.1; zusammengefasst in Dominy & Stipanuk 2004, Kamoun 2004). Außerdem wird beim oxidativen Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren Sulfanschwefel, also Schwefel der Oxidationsstufe Null, gebildet, der ebenfalls zu Sulfid reduziert werden kann. *In vivo* produzieren wahrscheinlich hauptsächlich zwei Pyridoxalphosphat-abhängige Enzyme des Aminosäurestoffwechsels endogen Sulfid aus L-Cystein. Cystathionin- β -Synthase (CBS) und Cystathionin- γ -Lyase (CSE) katalysieren die letzten beiden Reaktionsschritte bei der Cysteinsynthese aus Methionin, die Transsulfurierung von Serin. Dadurch wird einerseits Cystein für die Proteinsynthese bereitgestellt, andererseits können die Schwefelatome aus Aminosäuren generell ausschließlich über den Cystein-Katabolismus ausgeschieden werden. Wenn die Cystathionin- β -Synthase Cystein als alternatives Substrat an Stelle von Serin umsetzt, entsteht durch β -Eliminierung bei der Bildung von Cystathionin H₂S (Chen et al. 2004). Zwei Moleküle Cystein reagieren durch spontane Oxidation oder katalysiert durch Thioloxygenasen zu Cystin. Die Cystathionin- γ -Lyase katalysiert die β -Spaltung von Cystin, wobei Thiocystein, Pyruvat und NH₄⁺ entstehen. Thiocystein enthält eine reaktive Persulfidgruppe, die entweder direkt Sulfid freisetzt oder spontan mit Cystin zu Thiocystin reagiert. Die Trisulfidgruppe des Thiocystins tautomerisiert zum Thiosulfoxid, das dann als Substrat für Persulfid-übertragende Enzyme, wie z.B. Rhodanase, zur Verfügung steht (Szczipkowski & Wood 1967, Toohey 1989).

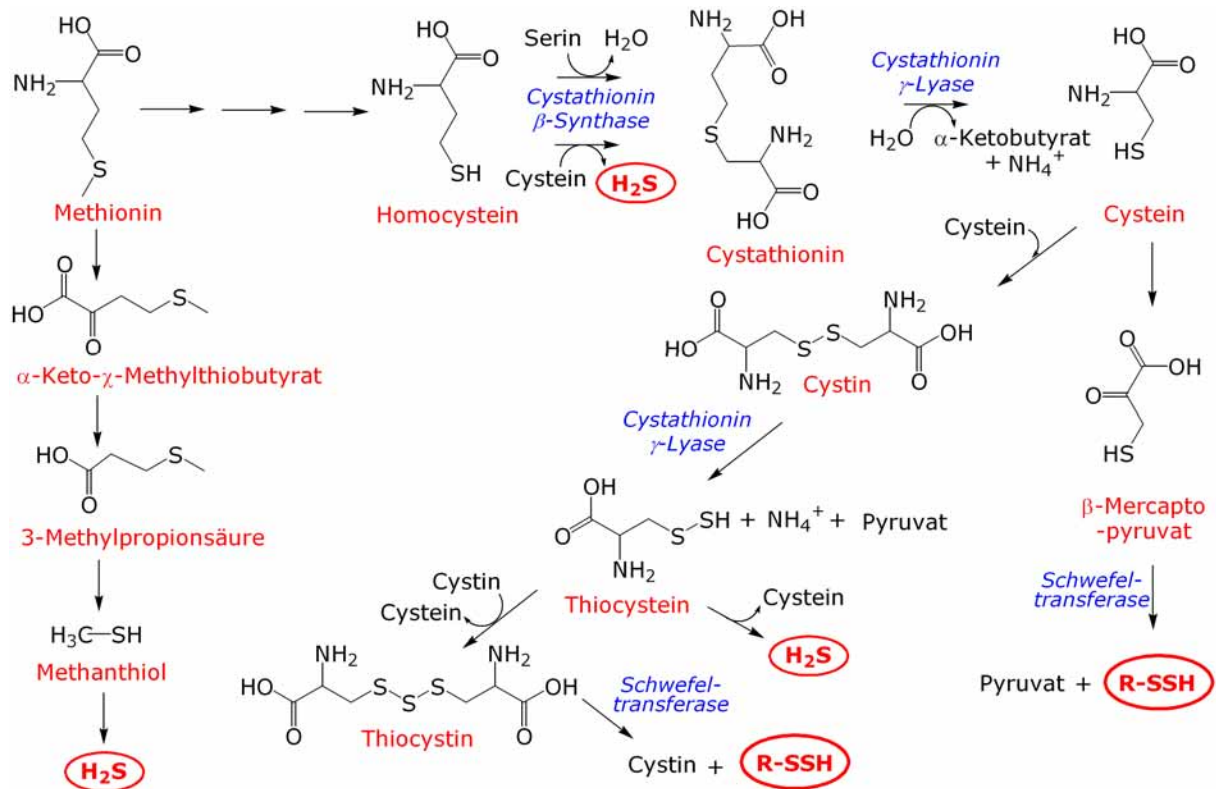


Abb. 1.1: Enzymatische Sulfidproduktion bei Säugetieren. Sulfid (H₂S) oder Persulfide (R-SSH) entstehen hauptsächlich beim Metabolismus der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. (Erläuterungen im Text)

1.2.2 Physiologische Funktionen von Sulfid und Persulfiden

Ähnlich wie es bereits für NO und CO beschrieben wurde, wirkt H₂S hauptsächlich als gasförmiger Transmitter in Nerven- und Muskelgeweben (Wang 2002, Moore et al. 2003). Bei Säugetieren ist Sulfid möglicherweise an der Ausbildung des Gedächtnisses und an Lernvorgängen beteiligt, da es die Induktion von Langzeitpotenzierungen (LPT) z.B. im Hippocampus erleichtert (Abe & Kimura 1996). Über einen cAMP-abhängigen Signaltransduktionsweg erhöht Sulfid in physiologischen Konzentrationen die Sensitivität von NMDA-Rezeptoren für den Neurotransmitter Glutamat, so dass vermehrt Ca²⁺ in die Nervenzelle einströmt und die Verstärkung von Synapsen anregt (Kimura 2000). Außerdem schützt Sulfid neuronales Gewebe vor Schäden durch oxidativen Stress, der z.B. nach Durchblutungsstörungen bei Schlaganfällen oder bei Alzheimer-Patienten auftritt. Zum Krankheitsbild von Alzheimer gehört u.a. eine erhöhte Expression der Myeloperoxidase im Gehirn, die dazu führt, dass vermehrt Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu Hypochlorsäure (HOCl) umgesetzt werden (Green et al. 2004). Sulfid verringert das Ausmaß der oxidativen Schäden, die durch die Überproduktion von HOCl hervorgerufen werden (Whiteman et al. 2005). Einen ebenfalls antioxidativen Effekt hat der Anstieg der intrazel-

lulären Konzentration reduzierten Glutathions (GSH), der bei sulfidinkubierten Neuronen nachgewiesen wurde (Kimura & Kimura 2004). Außerdem senkt Sulfid die Erregbarkeit von Neuronen, indem es K_{ATP}^+ -Kanäle aktiviert und so den K^+ -Gradienten verringert, so dass der Energieverbrauch der Zellen sinkt (Wang 2002). In ähnlicher Weise kann endogenes Sulfid auch die Schäden abschwächen, die im Myocardium durch Ischämie und Reperfusion entstehen, da es zum cardioprotektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung beiträgt (Bian et al. 2006). Die Zellmembranen glatter Muskulatur hyperpolarisieren, wenn sich K_{ATP}^+ -Kanäle öffnen, und spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle werden inaktiviert. Durch die niedrige intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration relaxieren die Muskelzellen, so dass sich Blutgefäße erweitern (Nelson & Quayle 1995). Auf diese Weise kann Sulfid durch seine aktivierende Wirkung auf K_{ATP}^+ -Kanäle den Blutdruck senken, reguliert die Durchblutung der Leber und trägt vermutlich auch zur gastrointestinalen Motilität bei. Im Verdauungstrakt kann Sulfid Durchblutungsstörungen der Mucosa verhindern, sie also vor Verletzungen schützen, indem es die Anheftung von Leukozyten an das vasculäre Endothelium hemmt, die z.B. durch Aspirin ausgelöst wird (Fiorucci et al. 2006). Allerdings wurden Sulfid in einigen Studien auch proinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben, die, zumindest teilweise, auf das sehr reaktive Oxidationsprodukt Sulfit zurückzuführen sein könnten (Collin & Thiemermann 2005).

Neben Sulfid wurden auch für Persulfide regulatorische Funktionen beschrieben. Die Schwefeltransferasen Rhodanase und Mercaptopyruvat-Schwefeltransferase übertragen Sulfanschwefel auf thiophile Anionen, wie Cysteinreste von Proteinen. Einige Enzyme des oxidativen Stoffwechsels, darunter Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase und Phosphofruktokinase, werden durch die Bindung eines Persulfids gehemmt (Valentine et al. 1987). Andererseits können Schwefeltransferasen auch Persulfide für die Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren zur Verfügung stellen. Apoferreredoxin aus Spinatchloroplasten z.B. wird in Anwesenheit von Rhodanase, Lipoat und Thiosulfat in die aktive Holoform überführt (Cerletti 1986). Auch für die ebenfalls Eisen-Schwefel-Zentren enthaltenden Enzyme NADH- und Succinat-Dehydrogenase wurde eine Aktivitätssteigerung durch Schwefeltransferasen nachgewiesen (Bonomi et al. 1977, Pagani & Galante 1983). Der tierische Organismus kann im Gegensatz zu Pflanzen oder Prokaryoten Schwefelatome nicht mehr reduzieren, wenn sie eine höhere Oxidationsstufe als Null erreicht haben. Bei Bedarf wird Sulfanschwefel daher entweder aus Cystein produziert (s. 1.2.1) oder aus einem Pool bereitgestellt, in dem Persulfide hauptsächlich an Cysteinreste von Proteinen, wie z.B. Albumin, gebunden gespeichert werden (Westley et al. 1983, Iciek & Wlodek 2001). Die Persulfidgruppen verschiedener Schwefelverbindungen werden dabei so schnell untereinander ausgetauscht, dass es nicht möglich ist, unmittelbar nach der Injektion einer radioaktiv markierten $H^{35}SSO_3^-$ -Lösung in den Blutkreislauf einer Ratte eine Blutprobe zu

entnehmen, die nicht auch sämtliche andere ^{35}S -Verbindungen derselben Oxidationsstufe enthält (Westley et al. 1983).

Störungen des Sulfidstoffwechsels wurden beim Menschen mit einigen Krankheiten in Verbindung gebracht. Die Gehirnfunktion wird offenbar gleichermaßen durch eine Über- wie durch eine Unterproduktion von Sulfid beeinträchtigt. Im Gehirngewebe von Alzheimer-Patienten war die Sulfidkonzentration bei einer Studie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen um 55 % verringert (Eto et al. 2002). Beim Down-Syndrom dagegen wird die Cystathionin- β -Synthase überexprimiert, da das CBS-Gen auf Chromosom 21 liegt. Die chronisch erhöhte Sulfidproduktion könnte zur geistigen Retardierung der Patienten beitragen (Kamoun 2001, Kamoun et al. 2003). Im menschlichen Darm produzieren anaerobe Bakterien beim Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren und durch Sulfatreduktion täglich etwa 50 mmol Sulfid (Suarez et al. 1998, Levitt et al. 1999). Gesunde Darmepithelzellen sind in der Lage, das Sulfid effektiv zu entgiften (Levitt et al. 1999, Furne et al. 2001). Bei Patienten mit chronischen Darmentzündungen und Darmkrebs wurden dagegen überdurchschnittlich hohe Sulfidkonzentrationen gefunden. Diese könnten den oxidativen Stoffwechsel der Colonocyten hemmen und so den Zelltod auslösen, woraufhin sich das Gewebe entzündet (Roediger et al. 1997, Pitcher et al. 2000). Die Spanne zwischen den Sulfidkonzentrationen, für die physiologische Funktionen beschrieben wurden, und denen, die zu pathologischen Zuständen führen, ist sehr gering. Folglich müssen hoch entwickelte Regulationsmechanismen existieren, um die Sulfidkonzentration im Körper genau zu kontrollieren.

1.2.3 Enzymatische Sulfidoxidation

Bisher gibt es nur wenige Erkenntnisse über den Mechanismus der Sulfidoxidation bei Säugetieren. Ratten und Hunde entgiften Sulfid schnell und vollständig, wenn sie mit sublethalen Konzentrationen konfrontiert werden (Beauchamp et al. 1984). Auch radioaktiv markiertes Sulfid wird nach der Injektion in den Blutkreislauf von Ratten umgehend oxidiert und überwiegend in Form von Sulfat mit dem Urin ausgeschieden (Curtis et al. 1972).

Die höchsten Sulfidoxidationsraten wurden in Gewebehomogenaten der Colon- und Blinddarmmucosa nachgewiesen. Als Endprodukt entsteht dort fast ausschließlich Thiosulfat (Furne et al. 2001). Die Schwefeltransferase Rhodanase könnte an der Sulfidentgiftung im Darm beteiligt sein, denn in den Mucosazellen des Colons ist die Rhodanaseaktivität im Vergleich mit dem restlichen Verdauungstrakt hoch (Picton et al. 2002). Bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Darmkrebs wird die Rhodanase an der luminalen Oberfläche der

Mucosa signifikant schwächer exprimiert als im gesunden Darm (Ramasamy et al. 2006). Eine Beteiligung der Schwefeltransferase an der Sulfidoxidation würde die erhöhten Sulfidkonzentrationen erklären, die mit diesen Krankheitsbildern verbunden sind. Tatsächlich konnte mit gereinigter Rhodanase eine Sulfidoxidase-Aktivität nachgewiesen werden (Picton et al. 2002). Allerdings sind unphysiologisch hohe Sulfidkonzentrationen ($K_m = 8,8$ mM Sulfid) und die Anwesenheit von 50 mM KCN für die Umsetzung von Sulfid zu Thiocyanat erforderlich, so dass die Relevanz dieser Reaktion *in vivo* fraglich ist.

Außer im Darmepithel findet die Sulfidentgiftung bei Säugetieren hauptsächlich in der Leber statt (Bartholomew et al. 1980, Furne et al. 2001). Die entsprechende Enzymaktivität ist in den Lebermitochondrien lokalisiert und wird einer noch unbekanntes Sulfidoxidase zugeschrieben (Koj et al. 1967, Huang et al. 1998). Thiosulfat entsteht als obligates Zwischenprodukt der Sulfidoxidation in Rattenlebermitochondrien und wird nur in Anwesenheit von Glutathion vollständig zu Sulfat umgesetzt (Bartholomew et al. 1980). Für diesen letzten Oxidationsschritt muss zunächst die Bindung zwischen den beiden Schwefelatomen des Thiosulfats gespalten werden. Wahrscheinlich katalysiert die glutathionabhängige Thiosulfatreduktase die Freisetzung von Sulfit aus Thiosulfat. Anschließend oxidiert die bereits gut charakterisierte Sulfitoxidase Sulfit zu Sulfat. Das Molybdän- und Cytochrom b-haltige Enzym ist als Homodimer auf der Seite des Intermembranraums an die innere Mitochondrienmembran gebunden und überträgt die Elektronen aus der Sulfitoxidation über Cytochrom c in die Atmungskette. Eine Defizienz führt beim Menschen zu Gehirndegenerationen und innerhalb der ersten Lebensjahre zum Tod (Woo et al. 2003).

1.3 Sulfidstoffwechsel bei sulfidadaptierten Tieren

Nachdem vor einigen Jahren Sulfid als gasförmiger Transmitter bei Säugetieren identifiziert worden war, stellte sich heraus, dass auch Invertebraten, wie z.B. der Wattwurm *Arenicola marina* und die Muschel *Mercenaria mercenaria*, enzymatisch Sulfid produzieren (Julian et al. 2002, Doeller et al. 2005, Gainey & Greenberg 2005). Da die Tiere in ihrem Lebensraum mit schwankenden Sulfidkonzentrationen konfrontiert werden, stehen sie zusätzlich vor der Herausforderung, das endogene Sulfid signal von eindringendem Sulfid zu unterscheiden. Die physiologischen Funktionen von H_2S in Invertebraten sind noch weitgehend unbekannt. Erste Hinweise bieten zwei Studien an sulfidadaptierten Invertebraten der Gezeitenzone. Isolierte Kiemen von *M. mercenaria* kontrahieren stimuliert durch 5-Hydroxytryptamin doppelt so stark, wenn sie mit $1 \mu M$ Sulfid vorinkubiert wurden (Gainey & Greenberg 2005). Die Autoren vermuten, dass eine Guanylatcyclasecascade an der Reaktion beteiligt ist. Auch anhand der Ringmuskulatur des Echiuroiden *Urechis cau-*

po wurde ein stimulierender Effekt von Sulfid nachgewiesen. In Synergie mit NO löste 1 mM Sulfid eine stärkere Kontraktion bei Streifen des Hautmuskelschlauchs aus als der excitatorische Transmitter Acetylcholin (Julian et al. 2005). Neben Sulfid könnte also auch das Reaktionsprodukt S-Nitrosothiol Signalfunktionen bei *U. caupo* haben.

Vergleichsweise umfangreich ist der Kenntnisstand zur Sulfidentgiftung bei Tieren, die unterschiedliche sulfidhaltige Ökosysteme besiedeln. Ein wichtiger Aspekt ist die Möglichkeit, mehrere Tage erhöhter Sulfidexposition mit Hilfe anaerober Stoffwechselwege zu überleben, die bei Säugetieren nicht gegeben ist. Auch die Energiegewinnung aus Sulfid wurde anhand einiger Beispiele untersucht. Schließlich enthält H_2S als die am stärksten reduzierte Schwefelverbindung relativ viel Energie (716 kJ/mol) und wird von diversen Prokaryoten zur ATP-Produktion oxidiert (Bagarinao 1992). Im folgenden Kapitel werden einige zentrale Erkenntnisse vorgestellt, die am Beispiel unterschiedlicher Tierarten aus den diversen sulfidhaltigen Lebensräumen gewonnen wurden.

1.3.1 Forschungsschwerpunkt Sulfidoxidation

Das Interesse am Sulfidstoffwechsel mariner Invertebraten wurde Ende der 1970er Jahre durch die Entdeckung der Hydrothermalquellen in der Tiefsee geweckt (Corliss et al. 1979). An den Kanten der Kontinentalplatten quillt in den Spreizungszonen Magma aus dem oberen Erdmantel, während in den Subduktionszonen Gesteinsmaterial ins Erdinnere gedrückt und eingeschmolzen wird. In die schmalen Spalten im rissigen Gestein ringsumher sickert Seewasser, das unter hohem Druck auf 400 °C erhitzt und mit verschiedenen Mineralien, CO , H_2 , CN^- , CH_4 (Schulte & Schock 1995, Kelley 1996, Appel et al. 2001) und mehreren 100 μM HS^- (Edmond et al. 1982) angereichert wird. Als Primärproduzenten fungieren chemoautotrophe sulfidoxidierende Bakterien, die in dicken Matten die hydrothermalen Felder bedecken. Sie assimilieren Kohlenstoff und bilden somit die Lebensgrundlage für zahlreiche Tierarten, von denen viele endemisch sind (Van Dover 2000). Ein gut untersuchtes und häufig abgebildetes Beispiel sind die Bartenröhrenwürmer *Riftia pachyptila*. Die sessilen Polychaeten beherbergen symbiontische Schwefelbakterien in speziellen Organen, den Trophosomen. Ihr Hämoglobin besitzt eine separate Bindungsstelle für Schwefelwasserstoff, so dass Sauerstoff und Sulfid gleichzeitig von den Kiemenlappen zu den Symbionten transportiert werden können (Minic & Herve 2004).

Außer bei geothermalen Prozessen und der industriellen Produktion entsteht Sulfid überall dort, wo große Mengen organischer Substanzen auftreten und gleichzeitig wenig Sauerstoff vorhanden ist. Obligat anaerobe sulfatreduzierende Bakterien oxidieren die Fer-

mentationsprodukte anderer Prokaryoten, vorwiegend Fettsäuren und Alkohole, zu CO_2 . Dabei nutzen sie Sulfat als Elektronenakzeptor und reduzieren es zu Sulfid (Trüper 1984).

Die Einleitung organischer Abfälle z.B. führt zur Eutrophierung von Gewässern, woraufhin sulfatreduzierende Bakterien in den umliegenden Sedimenten vermehrt Sulfid produzieren. Rund um die Einmündungen von Abwasserleitungen an der Pazifikküste der USA und Kanadas haben sich daher einige sulfidtolerante Arten angesiedelt. Die Muschel *Solemya reidi* lebt eingegraben in Sedimenten, die 0,4 bis 1,9 mM Sulfid enthalten (Lee et al. 1992). Sie besitzt keinen Verdauungstrakt und deckt ihren Energiebedarf überwiegend durch die Symbiose mit chemoautotrophen intrazellulären Bakterien in ihren Kiemen. Sowohl die symbiontischen Bakterien als auch die Mitochondrien der Muschel oxidieren Sulfid zur Energiegewinnung (Powell & Somero 1986). Die Kiemenmitochondrien bilden dabei in mehreren noch unbekanntenen Reaktionsschritten Thiosulfat mit Sulfit als Intermediat (O'Brien & Vetter 1990).

Ausgedehnte Ökosysteme mit einem hohen, teilweise bis zu millimolaren Sulfidgehalt säumen die Küstenlinien der Ozeane. In den Gezeitenzonen der Tropen und Subtropen sorgen Mangrovenwälder für einen erhöhten Nährstoffeintrag in die schlammigen, sauerstoffarmen Böden. Der Schlammpringer *Boleophthalmus bodaerti* lebt in den Mangroven Singapurs und Malaysias. Er zieht sich bei Hochwasser in seinen Bau zurück, in dem im Verlauf der Überflutungsphase durchschnittlich etwa 0,3 mM Sulfid akkumulieren, während der Sauerstoffgehalt sinkt. Wie auch für einige andere Vertebraten beschrieben, findet die Sulfidentgiftung beim Schlammpringer hauptsächlich in der Leber statt. In Abhängigkeit von der umgebenden Sauerstoffkonzentration wird Sulfid mehr oder weniger vollständig zu unterschiedlichen schwefelhaltigen Endprodukten wie Sulfanschwefel, Thiosulfat oder Sulfat oxidiert (Ip et al. 2004).

In den kälteren Gewässern jenseits der Wendekreise lösen in Küstenabschnitten mit geringer Wellenexposition Salzwiesen die Mangroven der Tropen ab. Das Seegras ist sowohl Primärproduzent als auch Substrat für Mikroepiphyten und wird außerdem von Tieren als Nahrung, Versteck und Laichgebiet genutzt. Daher ist auch hier der Nährstoffeintrag ins Sediment sehr hoch. Die gerippte Muschel *Geukensia demissa* hält sich bevorzugt in Bereichen von Spartina-Salzwiesen auf, die mit bis zu 8,1 mM besonders hohe Sulfidkonzentrationen enthalten (Lee et al. 1996). Die Muschel kann chemolithoheterotroph aus der Sulfidoxidation genügend Energie gewinnen, um den ATP-Bedarf für den Cilienschlag ihrer Kiemen zu decken (Doeller et al. 1999, 2001).

Der Wattwurm *Arenicola marina* lebt in hoher Individuenzahl im Schlickwatt der nördlichen Atlantikküsten sowie an den Küsten der Nord- und Ostsee. Sein Bau liegt in der reduzierenden Schicht des Sediments, in der bis zu 340 μM Sulfid gemessen wurden (Völ-

kel & Grieshaber 1992). Zusätzlich wird *A. marina* regelmäßig mit Hypoxie konfrontiert, wenn der Bau bei Niedrigwasser trocken fällt und nicht mit frischem Seewasser ventiliert werden kann. Viele Aspekte der Anaerobiose und Sulphobiose wurden am Beispiel dieses Polychaeten bereits untersucht (Grieshaber et al. 1994, Grieshaber & Völkel 1998). Daher wurde auch für die vorliegende Arbeit der Wattwurm ausgewählt, um den Mechanismus der Sulfidoxidation weiter aufzuklären.

1.3.2 Der Sulfidstoffwechsel des Wattwurms, *A. marina*

In niedrigen Konzentrationen von bis zu 50 μM im umgebenden Seewasser beeinflusst Sulfid den Energiestoffwechsel des Wattwurms nicht. Das Tier bleibt vollständig aerob und oxidiert eindringendes Sulfid im Hautmuskelschlauchgewebe zu Thiosulfat (Hauschild et al. 1999, Wohlgemuth et al. 2000). Bei steigender Sulfidkonzentration reagiert *A. marina* zunächst mit einer Verhaltensanpassung. Die Ventilationsrate sinkt auf 20 - 40 %, so dass der Energiebedarf für die Muskelkontraktionen abnimmt und gleichzeitig weniger sulfidhaltiges Wasser durch den Bau gepumpt wird. Da für die Sulfidoxidation zusätzlich Sauerstoff benötigt wird, sinkt allerdings auch der kritische Sauerstoffpartialdruck für den Beginn einer Anaerobiose (Wohlgemuth et al. 2000). Endprodukte des anaeroben Metabolismus, z.B. Succinat, akkumulieren bereits bei höheren Sauerstoffpartialdrücken als in sulfidfreiem Wasser und sind ab etwa 300 μM Sulfid sogar bei Normoxie nachweisbar (Völkel & Grieshaber 1994, Wohlgemuth et al. 2000). Das eindringende Sulfid kann dann nicht mehr quantitativ oxidiert werden und reichert sich auf bis zu 150 μM im Hautmuskelschlauchgewebe an (Völkel et al. 1995). Dadurch wird die Cytochrom c Oxidase der mitochondrialen Atmungskette gehemmt, und eine sulfidbedingte Anaerobiose setzt ein. Nach dem Ende einer Sulfidexposition benötigt *A. marina* bis zu 30 Minuten, um das Sulfid in seinem Körper vollständig zu oxidieren und zum effizienteren aeroben Stoffwechsel zurückzukehren. Die Succinat- und Thiosulfatkonzentrationen erreichen nach einer Stunde wieder Kontrollniveau (Völkel et al. 1995).

Wie bei vielen anderen Organismen wurden auch für *A. marina* die Mitochondrien als Hauptort der Sulfidoxidation identifiziert. Aus dem Hautmuskelschlauch des Wattwurms isolierte Mitochondrien oxidieren Sulfid stöchiometrisch zu Thiosulfat mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Völkel & Grieshaber 1994). Den ersten Schritt dieser Reaktion katalysiert die Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR; Abb. 1.2). Verwandte Enzyme sind auch aus Prokaryoten bekannt, die autotroph mit Sulfid als Elektronendonator leben. Bei phototrophen Bakterien, wie z.B. *Rhodobacter capsulatus*, stellt die SQR die Elektronen aus der Sulfidoxidation für die anoxygene Photosynthese bereit (Griesbeck et al. 2000, 2002). Das α -Proteobakterium *Paracoccus denitrificans* dagegen nutzt Sulfid als Energiequel-

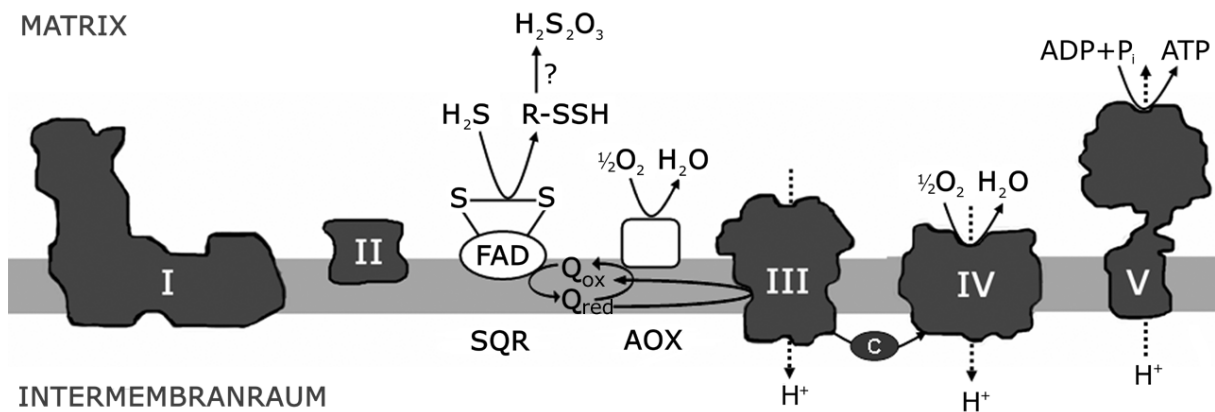


Abb. 1.2: Schema der erweiterten Atmungskette in der inneren Mitochondrienmembran von *Arenicola marina* und Ablauf der mitochondrialen Sulfidoxidation. Die Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR) oxidiert Sulfid (H_2S) zu Persulfiden (R-SSH) und überträgt die Elektronen auf Ubichinon ($\text{Q}_{ox.}$), das dadurch zu Ubichinol ($\text{Q}_{red.}$) reduziert wird. Aus dem Ubichinon-Pool können die Elektronen über die Atmungskettenkomplexe III und IV auf Sauerstoff übertragen werden, wenn bei geringen Sulfidkonzentrationen die Cytochrom c Oxidase nicht gehemmt ist. Dabei wird ein Protonengradient aufgebaut und ATP produziert. Bei hohen Sulfidkonzentrationen wird ein nicht-energiekonservierender Sulfidoxidationsweg verwendet, bei dem die Elektronen durch eine Alternative Oxidase (AOX) direkt von Ubichinol auf Sauerstoff übertragen werden. Die weiteren Reaktionsschritte zur Produktion des Endproduktes Thiosulfat sind noch nicht bekannt. (Modifiziert nach Völkel & Grieshaber 1997)

le, indem die SQR die Elektronen aus der Sulfidoxidation in die Atmungskette einspeist (Schütz et al. 1998, Griesbeck et al. 2000). Eine ähnliche Enzymausstattung könnte auch das α -Proteobakterium besessen haben, aus dem durch Endosymbiose die heutigen Mitochondrien hervorgegangen sind. Eine solche Vermutung legt zumindest die Verwandtschaft der SQR-Sequenzen aus Prokaryoten und Eukaryoten nahe (Theißen et al. 2003).

Der Mechanismus der bakteriellen SQR wurde anhand gereinigter und heterolog exprimierter Enzyme aus mehreren Organismen bereits eingehend untersucht (Reinartz et al. 1998, Griesbeck et al. 2000). Kürzlich gelang es erstmals, auch die SQR eines Vielzellers, nämlich die des Wattwurms, zu sequenzieren und in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* zu exprimieren (Theißen 2006). Durch Mutationsversuche wurde der für die bakterielle SQR vorgeschlagene Reaktionsmechanismus (Griesbeck et al. 2002) auch für das eukaryotische Enzym überwiegend bestätigt. Die SQR gehört zur Familie der Glutathion-Reduktasen und benötigt ein nicht-kovalent gebundenes FAD als einzige prosthetische Gruppe. Die SQR des Wattwurms ist ein mitochondrielles Membranprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 51 kDa. Ähnlich wie in den Zellmembranen von Prokaryoten überträgt die SQR der Wattwurmmitochondrien die Elektronen aus der Sulfidoxidation auf Ubichinon und speist sie so in die Atmungskette ein.

Sulfid reduziert in der ersten, reduktiven Teilreaktion eine Disulfidbrücke zwischen zwei konservierten Cysteinen im aktiven Zentrum des Enzyms. Dadurch entsteht ein enzymgebundenes Persulfid (Cys-SSH), das auf einen thiophilen Akzeptor übertragen werden

muss, bevor die Reaktion fortgesetzt werden kann. *In vitro* kann z.B. KCN oder Thio-redoxin diese Funktion übernehmen (Theißen 2006). Der tatsächliche Persulfidakzeptor in den Mitochondrien ist bisher noch nicht bekannt, ebenso wie die weiteren Reaktions-schritte, die zur Bildung des Endproduktes Thiosulfat führen. Die bakterielle SQR enthält ein drittes konserviertes Cystein, das es ihr ermöglicht, unabhängig von einem thiophilen Kosubstrat Polysulfide ($HS_n - H$) zu produzieren. Als Endprodukt der Sulfidoxidation wird bei den untersuchten Bakterien elementarer Schwefel (S_8) ausgeschieden (Griesbeck et al. 2002). Bei der oxidativen Teilreaktion der SQR werden die Elektronen über FAD auf Ubichinon übertragen (Griesbeck et al. 2002). Die Ubichinon-Bindungsdomäne besteht aus einer hydrophoben Schleife mit zwei konservierten Histidinen, die vermutlich als Protonenshuttle dienen (Bronstein et al. 2000, Griesbeck et al. 2002). Wenn die Sulfidkonzentration etwa 20-30 μM nicht überschreitet, werden die Elektronen von Ubichinon über Komplex III und IV der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen. Dadurch kann *A. marina* Sulfid in niedrigen Konzentrationen als Substrat für die chemotrophe Produktion von ATP benutzen (Völkel & Grieshaber 1997).

In höheren Konzentrationen hemmt Sulfid die Cytochrom c Oxidase, wird aber weiter unter Sauerstoffverbrauch zu Thiosulfat oxidiert. Diese Enzymaktivität ist weniger sensitiv gegenüber KCN als die Cytochrom c Oxidase und wird durch Salicylhydroxamin-säure (SHAM), einen Inhibitor der pflanzlichen Alternativen Oxidase, gehemmt (Völkel & Grieshaber 1996). Also enthält wahrscheinlich auch die Atmungskette des Wattwurms eine Alternative Oxidase (AOX), die Elektronen von Ubichinon auf Sauerstoff überträgt, ohne dabei Protonen über die Mitochondrienmembran zu pumpen (Abb. 1.2). Ein solches Enzym würde es dem Wattwurm ermöglichen, Sulfid unabhängig vom Energiebedarf der Zelle zu oxidieren und stellt somit einen effektiven Entgiftungsmechanismus dar. Gensequenzen, die der Sequenz der pflanzlichen Alternativen Oxidase stark ähneln, wurde in einigen marinen Invertebraten, wie der Auster *Crassostrea gigas* und dem Nematoden *Meloidogyne hapla*, gefunden (McDonald & Vanleberghe 2004). Es wurde jedoch noch nicht nachgewiesen, dass die kodierte Genprodukte tatsächlich Ubichinonoxidase-Aktivität besitzen. Auch über mögliche Regulationsmechanismen der tierischen Alternativen Oxidase oder der unterschiedlichen Sulfidoxidationswege ist noch nichts bekannt.

1.4 Ziele der vorliegenden Arbeit

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war, Einblicke in den Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation zu gewinnen. Dabei wurde der bereits relativ gut untersuchte Wattwurm als Beispiel eines sulfidadaptierten Invertebraten betrachtet und zusätzlich

die Ratte aus der Klasse der Säugetiere ausgewählt. Ein Vergleich dieser beiden Organismen sollte zeigen, ob die Enzyme für die Sulfidoxidation zur allgemeinen Ausstattung von Mitochondrien gehören und die Sulfidoxidation nach einem einheitlichen Prinzip abläuft, oder ob es sich dabei um eine spezielle Anpassung an sulfidhaltige Lebensräume handelt.

Versuche, die an der Sulfidoxidation bei *A. marina* beteiligten Enzyme der Atmungskette zu identifizieren, hatten in der Vergangenheit teilweise zu widersprüchlichen Ergebnissen geführt (Völkel & Grieshaber 1997). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit der genaue Verlauf des energiekonservierenden und des entgiftenden Sulfidoxidationsweges in Wattwurmmitochondrien aufgeklärt werden. Außerdem wurde nach Regulationsmechanismen gesucht, die, den Anforderungen der jeweiligen Situation entsprechend, eine effektive Sulfidgiftung oder Energiegewinnung ermöglichen.

Da noch sehr wenig über die Sulfidoxidation in Säugetiermitochondrien bekannt war, mussten einige grundlegende Abläufe untersucht werden. Es sollte gezeigt werden, ob und unter welchen Bedingungen Rattenlebermitochondrien Sulfid als Substrat für die chemolithotrophe ATP-Produktion einsetzen können und welche Komplexe der Atmungskette ggf. daran beteiligt sind.

Darüber hinaus war es Ziel dieser Arbeit herauszufinden, welche Reaktionsschritte bei der Sulfidoxidation zur Bildung des Endproduktes Thiosulfat führen. Zunächst musste überprüft werden, ob die bei *A. marina* bereits bekannte SQR-Aktivität auch in den Membranen der Rattenlebermitochondrien nachgewiesen werden kann, um anschließend die Enzyme zu identifizieren, die in den Mitochondrien der Ratte und des Wattwurms Sulfanschwefel zu Thiosulfat umsetzen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien höchstmöglicher Reinheit wurden von den Firmen Baker (Deventer, Niederlande), Fluka (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Promochem (Wesel), Riedel-de Haën (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma Chemicals (St. Louis, USA) bezogen. Die Firma Messer Griesheim (Düsseldorf) lieferte Stickstoff der Qualität 5.0 und das künstliche Seewasser wurde mit Seesalz der Firma Wiegandt (Krefeld) angesetzt. Zur Bereitstellung von deionisiertem Wasser diente das Milli-Q Water Purification System (Millipore, Billerica, USA).

2.2 Enzyme

Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase wurden als gebrauchsfertige Mischung von Roche (Mannheim) bezogen. Die Ammoniumsulfatsuspension enthielt 340 U/ml Hexokinase aus Hefe und 170 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*. Katalase aus Rinderleber wurde in Form einer wässrigen Lösung von Roche verwendet. Meerrettich-Peroxidase (Typ I) wurde als lyophilisiertes Pulver von Sigma bezogen und jeweils kurz vor Versuchsbeginn in Puffer gelöst. Die verwendete Rinderleberrhodanase von Sigma enthielt zur Stabilisierung des Enzyms ca. 1 mM Thiosulfat. Bevor die Persulfidtransferase-Aktivität der Rhodanase bestimmt werden konnte (s. 2.7.4), musste das Thiosulfat zunächst entfernt werden. Das lyophilisierte Pulver wurde also in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und durch Gelfiltration mit einer PD-10 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) vom Thiosulfat befreit. Die Rinderleberrhodanase wurde anschließend mit 50 % Glycerin versetzt bei -20 °C gelagert.

2.3 Versuchstiere

Rattenlebern für die Präparation von Mitochondrien wurden von der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Das Gewebe stammte von adulten Wistar-Ratten, die *ad libitum* mit Wasser und handelsüblichem Rattenfutter versorgt worden waren. Unmittelbar nachdem die Ratten mittels CO₂ getötet worden waren, wurden die Lebern entfernt und in eiskaltem Isolationsmedium (s. 2.4.1) gespült. Anschließend wurden entweder die Mitochondrien aus dem frischen Gewebe präpariert, oder die Lebern wurden bei -80 °C höchstens 8 Wochen lang gelagert und dann für die Enzympräparationen eingesetzt.

Die für diese Arbeit verwendeten Wattwürmer der Art *Arenicola marina* L. stammten aus dem Schlickwatt der niederländischen Nordseeküste vor Texel. Sie wurden beim Zeeaas-handel Arenicola (Oudeschild, Texel, Niederlande) gekauft und gekühlt nach Düsseldorf transportiert. Dort wurden die Wattwürmer für bis zu zwei Wochen in mit künstlichem Seewasser (36 ‰; pH 8,1; 16 °C) gefüllten, abgedunkelten und belüfteten Plastikeimern gehältert.

2.4 Reinigungsprotokolle

2.4.1 Präparation von Mitochondrien aus Rattenleber

Rattenlebermitochondrien wurden durch differentielle Zentrifugation isoliert. Die Lebern wurden mit Präparierscheren zerkleinert und in eiskaltem Isolationsmedium (250 mM Saccharose, 10 mM Triethanolamin, 1 mM EGTA, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM K₂HPO₄, pH 7,4) gespült, um das Blut vollständig zu entfernen. Das Gewebe wurde mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert. Der Abstand des Pistills zur Glaswand betrug 0,5 mm. Das Homogenat wurde zunächst bei 600 g für 10 min und anschließend bei 9000 g für 20 min zentrifugiert (Sorvall RC 5C plus, Rotor F-16/250). Das Mitochondrienpellet wurde in Reaktionsmedium (250 mM Saccharose, 10 mM Triethanolamine, 1 mM EGTA, 2 mM KH₂PO₄, 2 mM K₂HPO₄, 5 mM MgCl₂, pH 7,4) resuspendiert und auf Eis aufbewahrt.

2.4.2 Präparation von Mitochondrien aus *A. marina*

Die Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* wurden nach einer modifizierten Methode von Schroff und Schöttler (1977) isoliert. Kopf und Schwanz des Wattwurms wurden abgeschnitten, anschließend wurde der Hautmuskelschlauch längs aufgeschnitten, von den inneren Organen befreit und in künstlichem Seewasser abgespült. Die Hautmuskelschlauchstücke wurden in eiskaltem Homogenisationsmedium (550 mM Glycin, 250 mM Saccharose, 40 mM Tris, 1 mM EGTA, pH 7,5) mit Präparierscheren zerkleinert. Der Zellaufschluss erfolgte in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator mit zwei verschiedenen Teflon-Pistillen, deren Abstand von der Glaswand 0,75 mm bzw. 0,5 mm betrug. Das Homogenat wurde mit Homogenisationsmedium auf etwa 200 ml aufgefüllt und zunächst 15 min bei 4000 g zentrifugiert, um Gewebetrümmer zu entfernen (Sorvall RC 5C plus, Rotor F-16/250). Anschließend wurde der Überstand 60 min bei 16000 g zentrifugiert und das Mitochondrienpellet wurde in eiskaltem Reaktionsmedium (450 mM Glycin, 250 mM Saccharose, 20 mM Tris, 1 mM EGTA, 0,2 % BSA (Fraction V, essentially fatty acid free, Sigma), 5 mM K_2HPO_4 , 3 mM $MgCl_2$ and 100 mM KCl, pH 7,5) resuspendiert. Auf Eis gekühlt wurden die Mitochondrien höchstens zwölf Stunden lang bis zum Versuchsbeginn aufbewahrt.

2.4.3 Präparation von Mitochondrienmembranen und -matrix

Um die Mitochondrienmembranen von den Matrixfraktionen zu trennen, wurden die Mitochondrienpellets (s.o.) zunächst in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert. Die Membranen wurden mittels Ultraschall aufgeschlossen (Sonoplus HD2200 mit Mikrospritze MS72, Bandelin, Berlin). Dabei wurde die Mitochondriensuspension im Eisbad in sechs Intervallen von je 10 Sekunden beschallt und zwischendurch mindestens 30 Sekunden abgekühlt. Nicht aufgeschlossene Organellen wurden abzentrifugiert (10 min bei 12000 g, Eppendorf Centrifuge 5417R), bevor die Membranen bei 80000 g in 60 min sedimentiert (Sorvall RC M120EX, Rotor RP80AT) und in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert wurden. Der Überstand, der die Enzyme der Mitochondrienmatrix enthielt, wurde für die Reinigung der Schwefeldioxygenasen und der Schwefeltransferasen verwendet.

2.4.4 Reinigung der Schwefeldioxygenasen und -transferasen

Alle Proteinreinigungen erfolgten bei 4° C, und die Proben wurden zwischen den einzelnen Reinigungsschritten auf Eis gelagert oder bei -20° C eingefroren. Für die chromatographi-

schen Schritte wurde ein ÄKTA explorer 100 (GE Healthcare) mit der Software Unicorn 3.0 verwendet. Sämtliche Lösungen wurden filtriert (0,45 μm Cellulose-Acetat Filter, Sartorius, Göttingen) und entgast.

2.4.4.1 Größenausschlusschromatographie

Als erster chromatographischer Reinigungsschritt diente eine Größenausschlusschromatographie. Jeweils 2 ml der Matrixfraktionen aus Rattenleber- bzw. Wattwurmmitochondrien, die 7,5-20 bzw. 0,5-1,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Protein enthielten, wurden auf eine Superdex 75 Gelfiltrationssäule mit einem Säulenvolumen von 120 ml (HiLoad 16/60, GE Healthcare) aufgetragen. Die Proteine wurden in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4) bei einer Flussrate von 0,5 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ eluiert und in 2 ml Fraktionen gesammelt. Jeweils drei Fraktionen mit der höchsten SDO- bzw. PT-Aktivität wurden vereinigt. Die Enzyme aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* konnten anschließend nicht weiter gereinigt werden. Die entsprechenden Fraktionen der Gelfiltration wurden daher entweder direkt für die Versuche zur Charakterisierung der Schwefeldioxygenase und der Schwefeltransferase aus dem Wattwurm eingesetzt oder mit 50 % Glycerin versetzt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Bei der Reinigung der Rattenenzyme schloss sich an die Größenausschlusschromatographie ein ionenchromatographischer Schritt an. Daher wurden die drei Fraktionen mit der maximalen SDO- bzw. PT-Aktivität (je 6 ml) mit Hilfe von Zentrifugeneinsätzen (Amicon Ultra 15 Centrifugal Filter Device, 5 kDa NMWL, Millipore, Bedford, USA; Zentrifuge: Sorvall RC 5C plus, Rotor F-16/250) eingengt und in den jeweiligen Startpuffer der Ionenaustauschchromatographie überführt. Um die Molekulargewichte der gereinigten Enzyme abschätzen zu können, wurde die Superdex 75 Säule mittels Dextranblau sowie Serumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa) und Ribonuklease A (13,7 kDa) kalibriert.

2.4.4.2 Anionenaustauschchromatographie

Die Schwefeldioxygenase aus Rattenleber wurde im Anschluss an die Gelfiltration durch Anionenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Um die Proteinkonzentration zu erhöhen, wurden bei einigen Reinigungen die Fraktionen mehrerer Gelfiltrationsläufe (2-4) gesammelt und vereinigt. Die verwendete Resource Q Säule (GE Healthcare) hatte ein Säulenvolumen von 1 ml und wurde vor dem Lauf mit 20 mM Tris (pH 8,0) äquilibriert. Die Probe wurde in einem Volumen von 2 ml aufgetragen, gefolgt von 4 ml Startpuffer um nicht gebundenes Protein auszuwaschen. In einem dreigeteilten Gradienten wurde die NaCl-Konzentration zunächst innerhalb von 10 ml auf 70 mM erhöht. Dann wurde die

SDO durch einen linearen Anstieg auf 150 mM NaCl in 30 ml eluiert und in den folgenden 10 ml wurde der Gradient mit einer weiteren Erhöhung bis auf 300 mM NaCl abgeschlossen. Die Flussrate betrug $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, und es wurden Fraktionen mit einem Volumen von je 2 ml gesammelt. Nach dem Lauf wurde fest gebundenes Protein mit 1 M NaCl von der Säule entfernt.

2.4.4.3 Kationenaustauschchromatographie

Die Schwefeltransferase aus Rattenleber wurde abschließend mittels Kationenaustauschchromatographie bis zur Homogenität gereinigt. Das teilweise gereinigte Enzym wurde auf eine mit 1 ml des Säulenmaterials Source S (GE Healthcare) gefüllte HR 5/5 Säule (GE Healthcare) aufgetragen, die mit 50 mM MES (pH 6,0) äquilibriert worden war. Die Schwefeltransferase wurde bei einer Flussrate von $0,5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ durch einen linearen NaCl-Gradienten (0-100 mM) mit einer Länge von 20 ml eluiert. Anschließend wurde die Säule mit 1 M NaCl gespült. Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Als Endprodukt der Reinigung wurden die beiden Fraktionen mit der höchsten PT-Aktivität vereinigt, in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,2) umgepuffert und auf ca. 0,5 ml eingeeengt (Amicon Ultra 15 Centrifugal Filter Device, 5 kDa NMWL, Millipore, Bedford, USA; Zentrifuge: Sorvall RC 5C plus, Rotor F-16/250). Daraufhin konnte die Schwefeltransferase mehrere Tage auf Eis aufbewahrt oder mit 50 % Glycerin versetzt bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ über Wochen gelagert werden.

2.5 Proteinanalyse

2.5.1 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmungen erfolgten nach der Methode von Bradford (1976). Je $800 \mu\text{l}$ Probe wurden mit $200 \mu\text{l}$ BioRad Reagenz (BioRad, München) 20 min lang inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm an einem UV-1700 Spektrophotometer (Shimadzu, Duisburg) bestimmt. Als Standard diente eine Rinderseumalbuminlösung (BSA Fraktion V, Sigma).

2.5.2 SDS-Gelelektrophorese

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde eingesetzt, um den Verlauf der Reinigungen der Schwefeldioxygenasen und Schwefeltransferasen zu

kontrollieren (Davis 1964, Ornstein 1964). Nach den einzelnen Reinigungsschritten wurden Proben entnommen, und die Proteinbanden, die in den Endprodukten der Reinigungen noch vorhanden waren, wurden aus dem Gel ausgeschnitten und für die massenspektrometrische Peptidsequenzierung verwendet (s. 2.5.3). Die elektrophoretische Trennung erfolgte horizontal auf einem Multiphor II System der Firma Pharmacia (Freiburg), wobei das Gel auf 15 °C gekühlt wurde. Für die Herstellung der Trenngele (4 %ig, Quervernetzung 3 %) und der Sammelgele (12 %ig, Quervernetzung 3 %) wurden gebrauchsfertige Acryl- und Bisacrylamidlösungen (Roth) verwendet. Außerdem enthielten die Sammelgele 0,125 M Tris/HCl (pH 6,8), 17,4 % (v/v) Glycerin sowie 0,1 % (w/v) SDS und die Trenngele 0,375 M Tris/HCl (pH 8,8), 3,5 % (v/v) Glycerin sowie ebenfalls 0,1 % (w/v) SDS. Alle Gele wurden auf Trägerfilme (Gelbond PAGFilm, Pharmacia, Freiburg) gegossen. Jeweils 10 μ l der aufzutragenden Proben wurden mit 4 μ l Probenpuffer (62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerin, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol, 2% (w/v) SDS) versetzt und bei 85 °C für 3 min erhitzt. Anschließend wurden 10 μ l der denaturierten Probe pro Probentasche aufgetragen, zusätzlich ein molekularer Größenmarker der Firma MBI Fermentas, der β -Galaktosidase (116 kDa), BSA (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Laktatdehydrogenase (35 kDa), Restriktionsendonuclease Bsp981 (25 kDa), β -Laktoglobulin (18,4 kDa) und Lysozym (14,4 kDa) enthielt. Als Laufpuffer diente 25 mM Tris/HCl (pH 8,3) mit 129 mM Glycin und 0,1 % (w/v) SDS. Die elektrophoretische Trennung erfolgte mit einer maximalen Stromstärke von 50 mA, wobei die Spannung auf 600 V und die Leistung auf 30 W begrenzt waren. Anschließend wurden die Proteine mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Dabei wurde eine leicht modifizierte Methode nach Kang et al. (2002) verwendet, die eine höhere Sensitivität erreicht als die klassische Coomassie-Färbung. Die Gele wurden zunächst mit deionisiertem Wasser 30 min lang gespült, bevor die Proteine mit 30 % (v/v) Ethanol und 2 % (w/v) Phosphorsäure für weitere 30 min gefällt wurden. Die eigentliche Färbung erfolgte über Nacht in 0,02 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 (Merck), 2 % (w/v) Phosphorsäure, 5 % (w/v) Aluminiumsulfat und 10 % (v/v) Ethanol. Anschließend wurde der Hintergrund mit 10 % (v/v) Ethanol und 2 % (w/v) Phosphorsäure entfärbt. Bei einigen Gelen wurde zusätzlich eine Silberfärbung mit dem SilverXpress Kit der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) durchgeführt.

2.5.3 Peptidsequenzierung mittels Massenspektrometrie

Die Peptidsequenzierungen wurden vom analytischen Zentrallabor des Biologisch-Medizinischen Forschungszentrums der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt. Die entsprechenden Proteinbanden wurden aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und ei-

nem tryptischen Verdau unterzogen. Anschließend wurden die Proben mit einem QqTOF-Hybridmassenspektrometer (QSTAR, Applied Biosystems, Foster City, USA) analysiert. Die erhaltenen Peptidsequenzen wurden durch Datenbankvergleiche mit NCBI-BLAST den entsprechenden Proteinen zugeordnet (Altschul et al. 1990).

2.6 Charakterisierung isolierter Mitochondrien

2.6.1 Bestimmung des O_2 -Verbrauchs isolierter Mitochondrien

Der Sauerstoffverbrauch der aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* isolierten Mitochondrien wurde polarographisch in einem geschlossenen Respirometer (Oroboros Oxygraph, Paar, Österreich) bestimmt. Es wurden Clark-Typ Elektroden mit 25 μm dicken FEP-Membranen und einer einmolaren Kaliumchlorid-Lösung als Elektrotyp verwendet. Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte computergestützt mit der Software DatLab 2.1. (Oroboros, Österreich). Die beiden identischen Versuchskammern mit einem Volumen von jeweils 2 ml wurden für die Versuche mit den Wattwurmmitochondrien auf 15 °C temperiert. Die Atmungsraten der Rattenlebermitochondrien wurden bei 25 °C gemessen, ebenso wie einige Vergleichswerte mit Wattwurmmitochondrien. Vor jedem Versuchstag wurden die Sauerstoffelektroden mit luftgesättigtem destillierten Wasser und durch Zugabe von Natriumdithionit kalibriert. Für die Umrechnung der prozentualen Sättigung in die Sauerstoffkonzentration [μM] im Inkubationsmedium (s. 2.4.1 bzw. 2.4.2) wurde angenommen, dass die verwendeten Puffer bei 100 % Sättigung 218 μM Sauerstoff bei 25°C und 269 μM bei 15 °C enthielten (Reynafarje et al. 1985). Der aktuelle Luftdruck wurde automatisch registriert und bei der Umrechnung berücksichtigt. Die Atmungsraten [$\text{nmol } O_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] der Mitochondrien wurden in DatLab 2.1. berechnet, indem die Ableitung der Sauerstoffkonzentration [μM] in der Versuchskammer über jeweils fünf Datenpunkte (d.h. 0,083 min) gebildet und durch den negativen Proteingehalt [$\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$] geteilt wurde.

Der Reaktionsansatz enthielt Inkubationsmedium und Mitochondriensuspension mit einem Proteingehalt von 0,1 - 0,7 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ in der Kammer. Nachdem sich der Ansatz mit der Luft und der gewünschten Temperatur äquilibriert hatte, wurden die Kammern mit gasdichten Stempeln verschlossen. Anschließend wurden verschiedene Substrate, Inhibitoren und Aktivatoren mit einer gasdichten Mikrospritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) durch eine Öffnung im Stempel in die Kammern injiziert. Malat (8 mM), Succinat (4 mM), Glutamat (8 mM) und Sulfid (5-100 μM) dienten als Atmungssubstrate. Die Injektion von 1 mM ADP steigerte die Atmungsraten von state 4 auf state 3 (Chance 1959), und der

Respiratorische Kontrollfaktor (RCR) wurde als Quotient der beiden Raten (state 3/state 4) berechnet. Da Sulfid in geringen Konzentrationen sehr schnell verbraucht wurde, konnte der RCR nur durch wiederholte Sulfidinjektionen (vor und nach der ADP-Zugabe) ermittelt werden. Bei Rattenlebermitochondrien nahm die Sauerstoffverbrauchsrate im Gegensatz zu den Wattwurmmitochondrien mit jeder Injektion ab, so dass separate Ansätze verwendet werden mussten, um die Atmungsraten in An- und Abwesenheit von ADP zu bestimmen.

Außerdem wurde der Einfluss einiger Metabolite auf die mitochondrielle Sulfidoxidation beim Wattwurm untersucht. Zu diesem Zweck wurde reduziertes und oxidiertes Glutathion (GSH bzw. GSSG) sowie reduziertes und oxidiertes Vitamin C (Ascorbat bzw. Dehydroascorbat) in Konzentrationen von 1-5 mM verwendet. Zum Vergleich wurden Malat (8 mM), Malonat (3 mM), Aspartat (8 mM) und Isocitrat (8 mM) ausgewählt. Bei den Rattenlebermitochondrien wurde der Effekt von Glutamat und den Reaktionsprodukten Aspartat, α -Ketoglutarat und Ammonium (0,8 - 8 mM) getestet.

Um die Sauerstoffaffinitäten der terminalen Oxidasen der Atmungskette des Wattwurms zu ermitteln, wurde der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien aufgezeichnet, bis sie den im Reaktionsmedium vorhandenen Sauerstoff vollständig verbraucht hatten. Die Sauerstoffkonzentrationen wurden unter Verwendung der Zeitkonstante τ sowie der Konstanten für die Rückdiffusion von Sauerstoff in die Versuchskammer (a^0) und den Sauerstoffverbrauch der polarographischen Sauerstoffelektroden (b^0) in DatLab 2.1. korrigiert (Gnaiger et al. 1995). Die Sauerstoffverbrauchsraten der Wattwurmmitochondrien [$\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] wurden gegen die zugehörigen Sauerstoffkonzentrationen im Reaktionsmedium [μM] in einer Michaelis-Menten-Darstellung aufgetragen, und die K_m -Werte für Sauerstoff wurden mit dem Enzymkinetik-Modul 1.2 des Programms Sigma Plot 9.01 (Jandel Scientific, Corte Madera, USA) durch nicht-lineare Regression berechnet. Um die Sauerstoffaffinität der Cytochrom c Oxidase zu bestimmen, dienten Malat und Succinat als Substrate. Zusätzlich wurden die beiden Sulfidoxidationswege betrachtet, die durch 1 mM DHA bzw. je 2,5 mM Ascorbat und GSH aktiviert wurden.

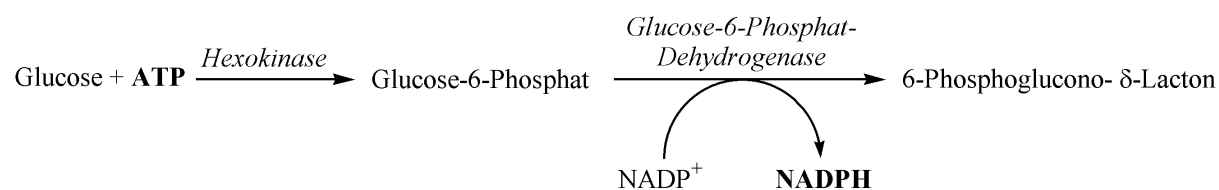
Um festzustellen, welche Atmungskettenkomplexe an der Sulfidoxidation beteiligt sind, wurden die Inhibitoren Rotenon (Komplex I; 1,5 μM in DMSO), Myxothiazol (Komplex III; 5 μM in Ethanol), KCN (Komplex IV; 0,5 mM in A. dest.) und Natriumazid (Komplex IV; 1 mM in A. dest.) eingesetzt. Salicylhydroxaminsäure (SHAM), ein Hemmstoff der pflanzlichen Alternativen Oxidase, wurde in einer Konzentration von 0,5 mM in DMSO gelöst verwendet. Da Ethanol hemmend auf die mitochondrielle Sulfidoxidation wirkt (Völkel & Grieshaber 1996), wurde Myxothiazol in einem Volumen von höchstens 2,5 μl

in die Kammern injiziert. Das Lösungsmittel Dimethylsulfoxid hatte keinen Einfluss auf die Atmungsraten.

Glutathion, Ascorbat und Sulfid (s. 2.8.1.1) wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn frisch angesetzt. Myxothiazol wurde in Ethanol gelöst bei 4 °C gelagert, die anderen Substrate und Inhibitoren wurden bei minus 20 °C aufbewahrt. Um die Endprodukte der mitochondrialen Sulfidoxidation zu ermitteln, wurden Proben aus der Oxygraphenkammer genommen, nachdem 50 μM Sulfid (wiederholte Injektionen von 5-10 μM) vollständig oxidiert worden waren, und auf Thiosulfat, Sulfit und Sulfat untersucht (s. 2.8.2). Als Kontrollen dienten Versuche mit hitzedenaturierten Mitochondrien (30 min bei 85 °C).

2.6.2 Bestimmung der ATP-Produktion isolierter Mitochondrien

Die ATP-Produktion der Mitochondrien [$\text{nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] wurde mit einem gekoppelten optisch-enzymatischen Test nach Powell und Somero (1986) untersucht, dem folgende Reaktion zu Grunde liegt:



Das durch oxidative Phosphorylierung gebildete ATP wurde mit Hilfe von Hexokinase zu ADP und Glucose-6-Phosphat umgesetzt, das anschließend mittels Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxidiert wurde. Die Rate der NADPH-Bildung wurde bei 339 nm an einem Ultrospec 2000 Spectrophotometer (Pharmacia Biotech, Freiburg) verfolgt. Als Leerwert wurde die Rate der NADPH-Bildung ohne Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gemessen und, wenn Malat als Substrat eingesetzt wurde, von den Ergebnissen abgezogen. Bei allen anderen Substraten änderte sich die Extinktion bei 339 nm in Abwesenheit der Enzyme nicht. Die Messungen erfolgten jeweils bei der gleichen Temperatur, bei der auch die Atmungsraten bestimmt wurden, also mit Rattenlebermitochondrien bei 25 °C und mit den Wattwurmmitochondrien bei 15 °C. Der Reaktionsansatz enthielt Inkubationsmedium mit 10 mM Glucose, 3,5 U/ml Hexokinase, 1,75 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 0,5 mM NADP^+ , 50 μM ADP, 20 μM P^1, P^5 -Di(adenosin-5')pentaphosphat (als Inhibitor der Adenylatkinase) und 40-200 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein. Die Reaktion wurde die Zugabe des Substrates (8 mM Malat, 8 mM Glutamat, 4 mM Succinat oder 5-100 μM Sulfid) gestartet. Außerdem wurde der Einfluss

von Glutathion, Ascorbat und Dehydroascorbat sowie der Atmungsketteninhibitoren unter den gleichen Bedingungen wie bei der Bestimmung des Sauerstoffverbrauchs (s. 2.6.1) untersucht. Der Entkoppler 2,4-Dinitrophenol (DNP, 10 μM in Ethanol) wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob die beobachtete ATP-Produktion tatsächlich auf oxidative Phosphorylierung zurückzuführen war.

2.6.3 Bestimmung der H_2O_2 -Produktion isolierter Mitochondrien

Die Wasserstoffperoxidproduktion der Wattwurmmitochondrien [$\text{nmol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] wurde anhand der Fluoreszenzzunahme ($\lambda_{ex} = 317 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 414 \text{ nm}$) durch Oxidation von p-Hydroxyphenylacetat quantifiziert (Li et al. 2003, Kudin et al. 2004). Der Ansatz (2 ml) enthielt 200 μM p-Hydroxyphenylacetat, 20 U/ml Meerettich-Peroxidase (Sigma) und etwa 0,1 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein in Reaktionsmedium (s. 2.4.2). Die Änderung der Fluoreszenz wurde mit einem Fluoreszenz-Spektrometer 3000 (Perkin Elmer) bei Raumtemperatur verfolgt. Als Substrate dienten 4 mM Succinat, 8 mM Malat, 8 mM Isocitrat und 8 mM Aspartat. Außerdem wurde der Einfluss von Malat, Isocitrat, Aspartat, Malonat (3 mM), GSH + Ascorbat (je 2,5 mM) und Sulfid (10 μM) auf die Wasserstoffperoxidproduktion, die durch Succinat hervorgerufen wurde, untersucht. Für die Kalibrierung wurde aus einer frischen 0,1 mM Maßlösung H_2O_2 in 0,5 nmol-Portionen eingesetzt.

2.7 Enzymatische Tests

Alle Enzymtest wurden bei 25 °C in luftgesättigten Puffern durchgeführt.

2.7.1 Aktivitätsbestimmung der Cytochrom c Oxidase

Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase [$\text{nmol Cytochrom } c_{ox.} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] in den isolierten Mitochondrien wurde nach Hand und Somero (1983) bestimmt. Als Substrat diente reduziertes Cytochrom c, das kurz vor Versuchsbeginn frisch hergestellt wurde. Eine Stammlösung, die ca. 2 mM Cytochrom c aus Pferdeherz (Sigma) und 1 mM EDTA in 2,5 ml mit Stickstoff begastem 10 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0) enthielt, wurde mit Natriumdithionit versetzt, bis sich die Lösung von rotbraun nach leuchtend orange verfärbte. Überschüssiges Natriumdithionit wurde mittels Gelfiltration mit einer PD-10 Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) entfernt, und die Konzentration des reduzierten

Cytochrom c's im Eluat wurde bei 550 nm mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von $18,5 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ bestimmt. Der Ansatz für den Aktivitätstest enthielt 50 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl und $100 \mu\text{M}$ reduziertes Cytochrom c. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Mitochondriensuspension ($1\text{-}5 \mu\text{g}$ Protein) gestartet und die Extinktionsänderung bei 550 nm wurde aufgezeichnet.

2.7.2 Aktivitätsbestimmung der Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase

Für die Bestimmung der SQR-Aktivität wurde die Rate der enzymatischen Reduktion von decyl-Ubichinon (Sigma) mit $100 \mu\text{M}$ Sulfid als Substrat in einem Spektrophotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia) verfolgt (modifiziert nach Shahak et al. 1994, Vande Weghe & Ow 1999). Der Reaktionsansatz (1 ml) enthielt 20 mM Tris (pH 8,0), $100 \mu\text{M}$ decyl-Ubichinon, 2 mM KCN und Mitochondrienmembranen ($140\text{-}280 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Protein). Die SQR-Aktivität wurde aus der Extinktionsabnahme bei 275 nm berechnet mit einem millimolaren Extinktionskoeffizienten für oxidiertes decyl-Ubichinon von $15 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Morton 1965). Nachdem $30 \mu\text{M}$ decyl-Ubichinon reduziert worden waren, die Extinktion also um 0,45 Einheiten abgenommen hatte, wurden Proben aus dem Reaktionsansatz genommen, um die Konzentrationen der möglichen Reaktionsprodukte Thiocyanat, Thio-sulfat und Sulfid sowie die Abnahme des Substrates Sulfid zu analysieren (s. 2.8.2). Als Kontrolle dienten Ansätze ohne decyl-Ubichinon.

2.7.3 Aktivitätsbestimmung der Schwefeldioxygenase

Die Aktivität der Glutathion-abhängigen Schwefeldioxygenase (SDO) wurde polarographisch in einem geschlossenen Respirometer (s. 2.6.1) nach einer modifizierten Methode von Suzuki (1965a) bestimmt. Als Substrat dienten Glutathionpersulfide (GSSH), die auch durch die bei acidophilen Laugungsbakterien beschriebene SDO bezogen umgesetzt werden (Rohwerder & Sand 2003). Der Versuchsansatz enthielt 1 mM GSH und $2\text{-}10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ der gereinigten oder teilweise gereinigten Enzyme in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4). Die Reaktion wurde durch Injektion von $30 \mu\text{l}$ einer schwefelgesättigten Acetonlösung gestartet (s. 2.8.1.2). Die SDO-Aktivität [$\text{nmol O}_2\cdot \text{mg Protein}^{-1}\cdot \text{min}^{-1}$] wurde in DatLab 2.1. aus der Ableitung der Sauerstoffkonzentration [μM] in der Versuchskammer über jeweils fünf Datenpunkte (d.h. 0,083 min) berechnet, wobei für luftgesättigten Kaliumphosphatpuffer bei 25°C eine Sauerstoffkonzentration von $244 \mu\text{M}$ angenommen wurde (Robinson & Cooper 1970). Um die Stöchiometrie der Reaktion zu ermitteln, wurden Proben zur Analyse der Schwefelverbindungen (s. 2.8.2) genommen, nachdem der injizierte

Schwefel vollständig verbraucht worden war und der Sauerstoffverbrauch daraufhin aufgehört hatte. Durch kalte Cyanolyse (s. 2.8.2.2) wurde überprüft, ob tatsächlich keine Persulfide mehr im Ansatz vorhanden waren. Da der Phosphatpuffer sich nicht für die ionenchromatographische Bestimmung der Sulfatkonzentration eignete, wurden zusätzlich Versuche in 10 mM Tris (pH 7,4) durchgeführt. Um den Verlauf der Glutathionpersulfidoxidation zu verfolgen, wurden die Konzentrationen von GSSH, Sulfit und Thiosulfat nach unterschiedlichen Reaktionszeiten (0; 1; 2,5; 5; 7,5; 10; 15 und 20 min) bestimmt. Das pH-Optimum der SDO wurde durch Variation des Puffers im Bereich von pH 6,0 bis 10,5 ermittelt. Dazu fanden MES pH 6,0 und 6,5; Kaliumphosphat pH 6,8 und 7,4; Tris pH 7,2; 7,8; 8,0; 8,4; 8,7 und 9,0; Carbonat pH 9,5 sowie Caps pH 10,0 und 10,5 jeweils in einer Konzentration von 50 mM Verwendung.

2.7.4 Bestimmung der Enzymaktivitäten von Schwefeltransferasen

Die enzymatische Umsetzung von Glutathionpersulfid (GSSH) und Sulfit zu Thiosulfat und GSH wird in der vorliegenden Arbeit als Persulfidtransferase-Aktivität bezeichnet. Je nach zur Verfügung stehender Enzymmenge wurden unterschiedlich große Ansätze (0,1 - 2 ml) gewählt, die 1 mM GSH und 2-4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gereinigte Schwefeltransferase aus Rattenleber, 1-3 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ teilweise gereinigte Schwefeltransferase aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* oder 10-30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Rinderleberhämorrhodanase (Sigma) in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) enthielten. Um die Reaktion zu starten, wurden unmittelbar nacheinander 15 μl pro ml Gesamtansatz schwefelgesättigtes Aceton (s. 2.8.1.2) und 200 μM Natriumsulfit zugegeben. Für den Standard-Aktivitätstest wurde die Thiosulfatkonzentration im Ansatz nach unterschiedlichen Reaktionszeiten (1-30 min) per HPLC bestimmt (s. 2.8.2.4). Die Persulfidtransferase-Aktivität wird in $\text{nmol Thiosulfat} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. U/mg angegeben. Zusätzlich wurde die Konzentrationsabnahme der Substrate GSSH und Sulfit mit Hilfe der entsprechenden Tests (s. 2.8.2) verfolgt, bis die zugegebenen Persulfide vollständig verbraucht worden waren, um die Stöchiometrie der Reaktion zu ermitteln. Das pH-Optimum der PT-Aktivität wurde mit den Puffern MES pH 6,0; Kaliumphosphat pH 6,8 und 7,4; Tris pH 8,0; 8,4; 8,7 und 9,0 sowie Caps pH 10,0 und 10,5 (50 mM) bestimmt.

Die Rhodanaseaktivität der Schwefeltransferasen wurde anhand der Produktion von Thiocyanat mit den Substraten KCN und Thiosulfat erfasst (Sörbo 1955). Der Reaktionsansatz (0,5 ml) enthielt 0,1 M Tris (pH 9,0), 50 mM Thiosulfat und die Enzymlösung. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 mM KCN gestartet und nach unterschiedlichen Reaktionszeiten (0,5 - 20 min) mit 0,5 ml saurem Eisenreagenz (1,2 % Formaldehyd und 67,2 mM Eisennitrat in 1,4 % Salpetersäure) gestoppt. Nach fünfminütiger Zentrifugation

bei 12000 g (Eppendorf Centrifuge 5415D) wurde die Extinktion des roten $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ -Komplexes bei 460 nm bestimmt (UV-1700 Spektrophotometer, Shimadzu, Duisburg). Als Leerwert dienten Ansätze ohne Enzym. Die Kalibrierungsgerade wurde mit 10-150 μM NaSCN (Sigma) erstellt.

2.7.4.1 Bestimmung der K_m -Werte der Schwefeltransferasen

Die K_m -Werte der aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* gereinigten Schwefeltransferasen sowie der gekauften Rinderleberrhodanase (Sigma) wurden jeweils für die Persulfidtransferase- und die Rhodanaseaktivität bestimmt. In separaten Messreihen wurde die Konzentration jedes der beteiligten Substrate einzeln variiert, während die Konzentration des anderen Substrates aus den Standardbedingungen der entsprechenden Aktivitätstests übernommen wurde. Aus Vorversuchen waren die optimalen Enzymkonzentrationen und Reaktionszeiten bekannt, die zu einem linearen Reaktionsverlauf führten. Die Aktivitätstests für die Persulfidtransferase und die Rhodanase wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Dabei variierten die Substratkonzentrationen im Bereich von 5-50 μM Sulfit und 13-132 μM GSSH bzw. 0,5-50 mM Thiosulfat und 0,01-50 mM KCN. Die Auswertung und Darstellung der Daten erfolgte mit dem Enzymkinetik-Modul 1.2 des Programms Sigma Plot 9.01 (Jandel Scientific, Corte Madera, USA) durch nicht-lineare Regression nach der Michaelis-Menten Gleichung:

$$V = V_{max} \cdot [S] / ([S] + K_m).$$

2.7.4.2 Oxidationsempfindlichkeit der Schwefeltransferasen

Um herauszufinden, ob beide Enzymaktivitäten der Schwefeltransferasen aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* gleichermaßen durch oxidativen Stress gehemmt werden, wurden die gereinigten Enzyme in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) eine Stunde lang mit 100 μM H_2O_2 bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 1000 U Katalase (aus Rinderleber, Roche) versetzt und weitere 10 min inkubiert, bevor die Rhodanase- und Persulfidtransferase-Aktivitäten der Proben bestimmt wurden. Als Kontrollen dienten Ansätze ohne H_2O_2 und Ansätze ohne Schwefeltransferase.

Zu allen Versuchen wurden die entsprechenden Kontrollen mit hitzedenaturierten Enzymen durchgeführt (30 min bei 85 °C). Wenn nicht explizit anders beschrieben, zeigten diese Kontrollen keine Aktivität.

2.8 Schwefelverbindungen

2.8.1 Herstellung der Substratlösungen

2.8.1.1 Herstellung von Sulfid- und Sulfit-Stammlösungen

Sowohl Sulfid als auch Sulfit wird in Anwesenheit von Sauerstoff schnell chemisch oxidiert (McCord & Fridovic 1969, Yang 1970, Millero 1986). Die entsprechenden Stammlösungen wurden daher kurz vor Versuchsbeginn frisch angesetzt und in gasdichten Schliffflaschen aufbewahrt. Jeweils 100 ml deionisiertes Wasser wurden für 1 Stunde mit Stickstoff 5.0 (Messer Griesheim) begast, bevor die Natriumsulfid-Kristalle ($\text{Na}_2\text{S} \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$, Sigma) bzw. das Natriumsulfit (Fluka) darin gelöst wurden. Die Konzentrationen der Sulfid-Stammlösungen wurden mittels eines kommerziellen Sulfittests bestimmt (s. 2.8.2).

2.8.1.2 Sulfanschwefel als Substrat

Für die Versuche zu Oxidation und Transfer von Sulfanschwefel durch Enzyme der mitochondrialen Matrix wurde mit Schwefel gesättigtes Aceton als Substrat verwendet. Ca. 1 ml Aceton (Chomasolv, Riedel-de Haën) wurde mit elementarem Schwefel (p.a., Fluka) versetzt bis sich dieser nicht mehr löste. Das Gemisch wurde jeden Tag frisch angesetzt und auf Eis aufbewahrt, um eine konstante Löslichkeit zu gewährleisten. Um zu überprüfen, ob das Aceton die Enzymaktivitäten beeinflusste, wurde ein wässriges System aus grobdispertem Schwefel hergestellt (Rohwerder & Sand 2003). Dazu wurden 3 ml einer gesättigten acetonischen Schwefellösung bei Raumtemperatur mit dem gleichen Volumen deionisierten Wassers gemischt. Die weiß gefärbte Lösung wurde für 15 Stunden bei 4 °C gegen 2 L deionisiertes Wasser dialysiert, um das Aceton zu entfernen. Dabei wurden Dialyseschläuche mit einer Porengröße von 12-14 kDa verwendet (Medicell International, London, GB). Die fertige wässrige Schwefellösung wurde innerhalb von 10 h als Substrat eingesetzt.

Da in der mitochondrialen Matrix Sulfanschwefel nur in Form von Persulfiden umgesetzt wurde, musste neben der Schwefellösung immer auch reduziertes Glutathion (GSH) zugegeben werden. GSH greift den S_8 -Ring des elementaren Schwefels nucleophil an, so dass lineare Monoorganylpolysulfane (GS_nH , $n > 1$) entstehen. Höhere Polysulfane sind in polaren Lösungsmitteln sehr instabil und zerfallen schnell zu Elementarschwefel und kurzkettigen Polysulfanen (Huxtable 1986):



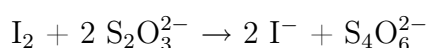
GSSH steht daraufhin als Substrat für die Schwefeldioxygenasen und die Schwefeltransferasen zur Verfügung. Glutathion wird durch die SDO nicht oxidiert und hat ausschließlich die katalytische Funktion, Persulfide zu generieren (Rohwerder & Sand 2003).

2.8.2 Analyse von Schwefelverbindungen

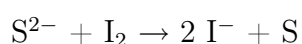
2.8.2.1 Sulfidbestimmung

Der Spektroquant-Sulfidtest (Merck) wurde nach Herstellerangaben verwendet, um die Konzentrationen der Sulfidstammlösungen zu überprüfen. Die photometrische Methode basiert auf einer Farbreaktion, die 1877 das Patent für die Herstellung des Farbstoffs Methylenblau erhielt. Sulfid reagiert mit N,N'-Dimethyl-1,4-phenylendiamin zu farblosem Leukomethylenblau, das dann durch Eisen(III)-sulfat zu Methylenblau oxidiert wird. Die Konzentrationsbestimmung erfolgt im Absorptionsmaximum bei 665 nm (Ultrospec 2000 Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, Freiburg). Vor der Analyse wurde das Sulfid mit 50 mM Zinkacetat und 150 mM NaOH als Zinksulfid fixiert, um eine Oxidation zu verhindern.

Mittels Iodometrischer Titration (Poethke 1973) wurden die Konzentrationen der Sulfidlösungen exakt bestimmt, die für die Kalibrierungsgerade des Spektroquant-Sulfidtests und die Thiolstandards (s. 2.8.2.4) verwendet werden sollten. Die Iodometrie beruht auf der in Anwesenheit von Stärke quantitativ erfassbaren Reduktion von elementarem Iod durch Natriumthiosulfat.



Zunächst wurde die Konzentration einer Iodlösung (ca. 0,1 N) durch Titration mit Natriumthiosulfat (0,1 M; Titrisol; Merck) ermittelt. Dann wurden 5 ml der Iodlösung mit 25 ml der zu untersuchenden Sulfidstammlösung versetzt, woraufhin ein Teil des Iods reduziert wurde.



Die Konzentration des noch verbliebenen elementaren Iods wurde wieder durch Titration mit Natriumthiosulfat bestimmt. Aus der Differenz zur ersten Titration wurde anschließend die Konzentration der Sulfidlösung berechnet.

2.8.2.2 Bestimmung von Persulfiden

Die kalte Cyanolyse (Wood 1987) wurde verwendet, um die Ausgangskonzentration der Glutathionpersulfide zu bestimmen, die sich unter den Standardbedingungen der Aktivitätstests für die Schwefeldioxygenase (s. 2.7.3) und die Persulfidtransferase (s. 2.7.4) im Versuchsansatz bildeten. Bei der Cyanolyse greift Cyanid die Bindung zwischen zwei Schwefelatomen nucleophil an und reagiert mit einem der Schwefelatome zu Thiocyanat. Persulfide sind relativ instabil und daher schon bei Raumtemperatur sehr reaktiv gegenüber KCN. Die Versuchsansätze (0,5 ml) enthielten 1 mM GSH, 50 mM KCN und unterschiedliche Volumina der acetonischen oder der wässrigen Schwefellösung (s. 2.8.1.2) in 0,1 M Tris (pH 9,0). Nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Thiocyanatkonzentration in den Ansätzen photometrisch bestimmt (s. 2.8.2.3).

Als weitere Methode zur Bestimmung von Persulfiden wurde ein Test verwendet, der eigentlich zum Nachweis von Thiosulfat dient (Pachmayr 1961). Unter sauren Bedingungen reduziert GSSH Methylenblau quantitativ zur farblosen Leukoform. Dadurch kann die GSSH-Konzentration anhand der Extinktionsabnahme bei 670 nm bestimmt werden. 250 μ l Probe wurden mit 375 μ l 10 M HCl und 375 μ l 75 μ M Methylenblau bei Raumtemperatur 30 min lang inkubiert. Die Extinktion des verbliebenen oxidierten Methylenblaus wurde bestimmt (UV-1700 Spektrophotometer, Shimadzu, Duisburg) und von den entsprechenden Leerwerten, die Puffer statt Probe enthielten, abgezogen. Für die Kalibrierungsgerade wurden unterschiedliche Volumina der schwefelgesättigten Acetonlösung (s. 2.8.1.2) mit 1 mM GSH 5 min lang in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) inkubiert, so dass sich Glutathionpersulfide bildeten. Die GSSH-Konzentrationen in diesen Ansätzen waren zuvor mittels kalter Cyanolyse (s.o.) bestimmt worden. Die Methylenblau-Methode ermöglichte es, die Raten des Substratverbrauchs bei der Persulfidoxidation durch die Schwefeldioxygenase und der Persulfidübertragung durch die Schwefeltransferase zu messen. Dazu wurden nach unterschiedlichen Reaktionszeiten Proben aus den Ansätzen der entsprechenden Aktivitätstests genommen (s. 2.7.3 und 2.7.4). Für Thiosulfat wurde eine separate Kalibrierungsgerade erstellt, da es ebenfalls Methylenblau reduziert. So konnten die Extinktionsdifferenzen der Proben mit Hilfe der durch HPLC ermittelten Thiosulfatkonzentration (s. 2.8.2.4) korrigiert werden.

2.8.2.3 Bestimmung von Thiocyanat

Thiocyanat wurde anhand der Extinktion des $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ -Komplexes bei 460 nm bestimmt, nachdem die zu analysierende Probe mit dem gleichen Volumen eines sauren Eisenrea-

genzes (1,2 % Formaldehyd und 67,2 mM Eisennitrat in 1,4 % Salpetersäure) versetzt worden war (s. 2.7.4, Rhodanaseaktivität).

2.8.2.4 Bestimmung von Thiolen mittels HPLC

Die Thiole Sulfid, Cystein, Glutathion (GSH), Thiosulfat und Sulfit konnten gleichzeitig nach einer modifizierten Methode von Fahey et al. (1980), Newton et al. (1981) und Vetter et al. (1989) per Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) nachgewiesen werden. Die reduzierten Schwefelverbindungen wurden mit dem Fluoreszenzfarbstoff Monobromobimane (Sigma) derivatisiert, wodurch sie ihr Laufverhalten auf dem Säulenmaterial der Reversed-Phase-HPLC änderten und nach der chromatographischen Trennung detektiert werden konnten. Der Reaktionsansatz enthielt 5 μl Monobromobimane (46 mM), 25 μl Puffer (160 mM HEPES, pH 8, mit 16 mM EDTA), 25 μl Probe sowie 25 μl Acetonitril (Baker), um die in der Probe enthaltenen Proteine zu fällen. Nach 30minütiger Inkubation im Dunkeln bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 50 μl Methansulfonsäure (65 mM) stabilisiert und bei minus 20 °C aufbewahrt. Die Thioladdukte wurden mit einer HPLC-Anlage von Merck/Hitachi (Darmstadt, Tokyo) analysiert, die aus einem Autosampler (AS-2000), einem Niederdruckpumpensystem (L-6200) und einem Fluoreszenzdetektor (F-1050) bestand. Das Interface (D-6000) ermöglichte die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme mit dem Softwareprogramm D-7000 HPLC System Manager Version 2.1 (Hitachi, Tokyo). Unmittelbar vor der Analyse wurden die Proben 10 min bei 4 °C und 12000 g zentrifugiert (Centrifuge 5402, Eppendorf, Hamburg) und der Überstand wurde im vierfachen Volumen Laufmittelgemisch (88 % A, 12 % B) aufgenommen. Die Trennung der Thiole erfolgte auf einer LiChrospher 60 RP-select B Säule (5 μm , LiChroCART 125-4, Vorsäule LiChroCART 4-4, Merck) im Essigsäure/Methanol-Gradienten (Tab. 2.1) mit einer Flussrate von 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ bei 18 °C. Die Monobromobimane-Derivate wurden mit einer Wellenlänge von 380 nm angeregt und bei 480 nm detektiert.

Tab. 2.1: Zusammensetzung des Essigsäure/Methanol-Gradienten für die Bestimmung von Thiolen mittels HPLC (Laufmittel A = 0,25 % Essigsäure, pH 4; Laufmittel B = Methanol, HPLC-grade, Baker Deventer, Niederlande)

Zeit [min]	0	2	7	20	21	22	30	30,1	35
Laufmittel A [%]	88	88	80	60	40	0	0	88	88
Laufmittel B [%]	12	12	20	40	60	100	100	12	12

Diese Methode wurde mit einem gemischten Thiolstandard kalibriert, der je 100 μM Sulfit, Thiosulfat, Glutathion, Cystein und Sulfid enthielt. Die fünf Bestandteile wurden

zunächst einzeln in stickstoffbegastem, deionisiertem Wasser gelöst und mit Monobromobimane derivatisiert. Anschließend wurden sie vermischt und lichtgeschützt bei minus 80 °C aufbewahrt. Die Konzentration der zur Kalibrierung eingesetzten Sulfidlösung wurde iodometrisch überprüft.

2.8.2.5 Sulfatbestimmung

Sulfat wurde mit Hilfe der Hochleistungsionenchromatographie quantifiziert nach einer leicht modifizierten Methode von Völkel und Grieshaber (1994). Ein Dionex DX 100 Ionenchromatograph wurde mit einer Ionpac AS-A4 Anionenaustauschsäule und einer AG-4A Vorsäule bei Raumtemperatur eingesetzt. Zum Probenauftrag war ein Autosampler angeschlossen. Das Laufmittel bestand aus 1,8 mM Na₂CO₃ und 1,7 mM NaHCO₃ und wurde mit einer Flussrate von 1,8 ml · min⁻¹ über die Säule gepumpt. Dem Leitfähigkeitsdetektor war ein AMMS 1 Micromembransuppressor vorgeschaltet, der mit 12,5 mM Schwefelsäure regeneriert wurde. Alle verwendeten Geräte waren von der Firma Dionex (Idstein). Die Proben wurden mit 1 % Formaldehyd und 25 % Acetonitril versetzt, um sie zu stabilisieren und die enthaltenen Proteinen zu denaturieren. Vor der Analyse wurden die Proben 10 min lang bei 12000 g zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5417R). Die Kalibrierungsgerade wurde mit 10 bis 100 µM Natriumsulfat erstellt, das wie die Proben in 10 mM Tris (pH 7,4) gelöst war und mit 1 % Formaldehyd und 25 % Acetonitril versetzt wurde. Die Daten wurden computergestützt mit dem Programm Maestro (Chrompack) aufgezeichnet und ausgewertet.

2.9 Statistik

Die Daten wurden mit Sigma Plot 9.01 (Jandel Scientific, Corte Madera, USA) graphisch dargestellt als arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen. Wenn nicht explizit anders beschrieben, handelt es sich immer um Mittelwerte aus mindestens 3 unabhängigen Präparationen. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student t-Tests in SigmaStat (Version 3.1, Jandel Scientific, Corte Madera, USA). Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurden die Messwerte als signifikant unterschiedlich angesehen. In den Abbildungen sind signifikant verschiedene Datenreihen mit * gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Die enzymatische Sulfidoxidation besteht, wie alle Stoffwechselwege, aus einem Zusammenspiel verschiedener Einzelreaktionen und kann daher in ihrem Gesamtablauf von zahlreichen, noch unbekanntem Faktoren beeinflusst werden. Entscheidend für den Organismus ist das Endergebnis, nämlich die Aufrechterhaltung als Signal benötigter und die Beseitigung schädlicher Sulfidkonzentrationen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher zunächst die Fähigkeit von Wattwurm- und Rattenmitochondrien zur Sulfidoxidation untersucht, um anschließend die einzelnen enzymatischen Reaktionsschritte zu analysieren.

3.1 Mitochondrielle Sulfidoxidation

Die Mitochondrien wurden bei allen bisher untersuchten Tieren als Hauptort der Sulfidoxidation identifiziert. Dabei sind hauptsächlich die beiden Aspekte Entgiftung und Energiegewinnung von Interesse, denn Sulfid hemmt die Atmungskette und ist gleichzeitig Substrat dieser Enzymsequenz.

3.1.1 Regulation der Sulfidoxidation bei *A. marina*

Arenicola marina kann mittels mitochondrieller Enzyme Sulfid in geringen mikromolaren Konzentrationen energiekonservierend oxidieren, höhere Sulfidkonzentrationen werden dagegen ohne ATP-Produktion entgiftet (Völkel & Grieshaber 1997). In der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, unterschiedliche Aktivatoren für die beiden Oxidationswege zu identifizieren.

Die für die Versuche verwendeten Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* waren gekoppelt und in der Lage, ATP zu produzieren. Sie oxidierten das Atmungssubstrat Malat mit einer Rate von $7,84 \pm 2,46 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und produzierten dabei $51,63 \pm 6,34 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Bei der Succinatoxidation entstanden $45,92 \pm 6,24 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, und der Sauer-

stoffverbrauch lag bei $18,64 \pm 3,59$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹. Der Respiratorische Kontrollfaktor für die Malatatmung war mit $6,93 \pm 3,71$ um ein Vielfaches höher als mit Succinat als Substrat (RCR = $1,97 \pm 0,24$).

Sulfid konnte ohne den Einsatz von Modulatoren in einer Konzentration von 5-10 μM als Substrat für die mitochondrielle Atmung bei *A. marina* verwendet werden (Abb. 3.1, A). Mit $17,94 \pm 3,50$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹ war der Sauerstoffverbrauch in state 3 bei der Oxidation von 5 μM Sulfid vergleichbar mit der Succinatatmung und ebenfalls deutlich gekoppelt (RCR = $2,44 \pm 0,58$). ATP wurde dagegen nur mit etwa der Hälfte der Rate produziert ($24,80 \pm 1,48$ nmol ATP · mg Protein⁻¹ · min⁻¹). Bei der Oxidation von 5 μM Sulfid entstanden insgesamt $7,50 \pm 0,84$ μM ATP, es wurden also $1,50 \pm 0,17$ Moleküle ATP pro Sulfidmolekül gebildet. Mit steigender Sulfidkonzentration wurde der Sauerstoffverbrauch zunehmend gehemmt. Er sank bis auf $3,69 \pm 0,31$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹ mit 50 μM Sulfid und blieb darüber hinaus relativ konstant bei etwa 3 nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹. Die Wattwurmmitochondrien produzierten dementsprechend mit 20 μM Sulfid bereits nur noch halb so viel ATP ($11,78 \pm 1,33$ nmol ATP · mg Protein⁻¹ · min⁻¹) wie mit 10 μM Sulfid und bei hohen Konzentrationen (ab 75 μM) oxidierten sie das Sulfid, ohne dabei ATP zu gewinnen. Auch der Einsatz von Inhibitoren zeigte, dass die Sulfidoxidation in den Mitochondrien von *A. marina* im Gegensatz zur ATP-Produktion aus unterschiedlichen Komponenten zusammengesetzt ist (Abb. 3.1, D). Sowohl Myxothiazol als auch KCN, also Hemmstoffe der Atmungskettenkomplexe III und IV, brachten die ATP-Produktion mit Sulfid als Substrat vollständig zum Erliegen. Der Sauerstoffverbrauch dagegen wurde nur zu $65,91 \pm 4,97$ % bzw. $69,91 \pm 4,28$ % gehemmt. Der Inhibitor der Alternativen Oxidase SHAM beeinflusste die ATP-Produktion nicht und senkte die Sulfidoxidationsrate auf $40,02 \pm 29,60$ %.

3.1.1.1 Einflüsse von GSH, Ascorbat und DHA

Sowohl reduziertes Glutathion (GSH) als auch Ascorbat in seiner reduzierten und in der oxidierten Form Dehydroascorbat (DHA) verhindern die Substrathemmung der Sulfidoxidation in Wattwurmmitochondrien. Wenn Glutathion und Ascorbat (je 2,5 mM) oder Dehydroascorbat (1 mM) im Versuchsansatz enthalten waren, wurde Sulfid unabhängig von seiner Konzentration mit einer konstanten Rate oxidiert (Abb. 3.1, B und C). Der Sauerstoffverbrauch unterschied sich nicht signifikant von den maximalen Atmungsraten, die ohne die Aktivatoren nur bei niedrigen Sulfidkonzentrationen von bis zu 10 μM erreicht wurden. Dementsprechend wurde beispielsweise die Oxidationsrate von 100 μM Sulfid durch GSH und Ascorbat oder DHA mehr als verfünffacht auf $14,20 \pm 2,84$ bzw. $13,76 \pm 4,11$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹. Obwohl die resultierenden Sauerstoffver-

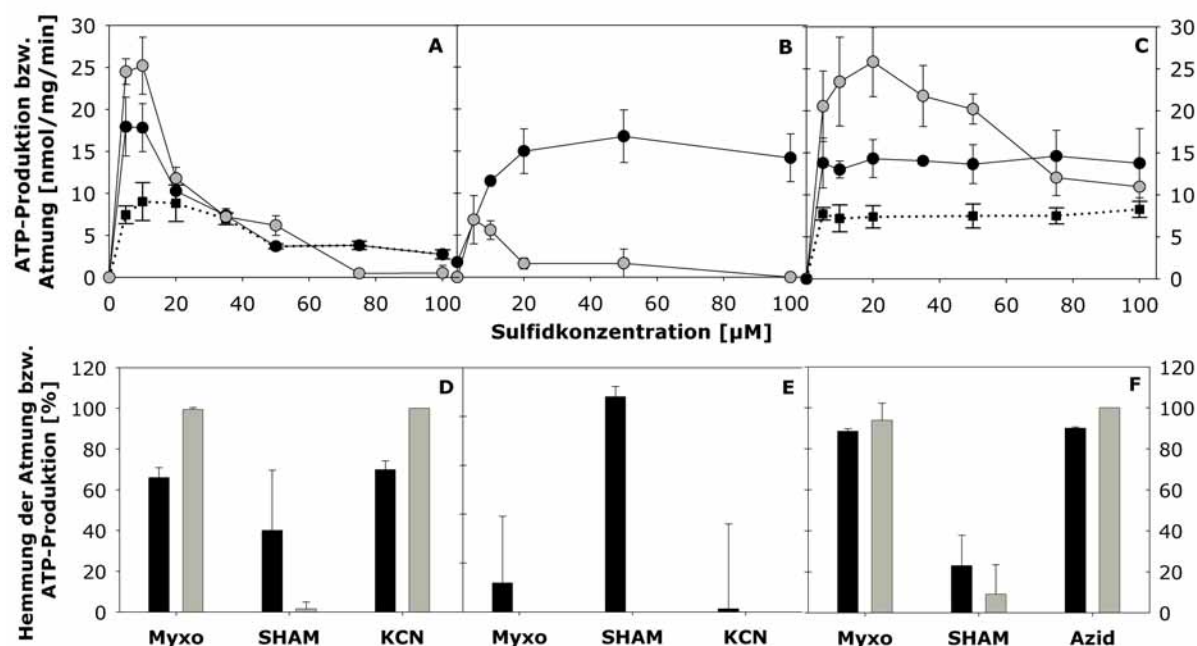


Abb. 3.1: Regulation der mitochondrialen Sulfidoxidation bei *A. marina* durch Glutathion (GSH), Ascorbat und Dehydroascorbat (DHA). Im oberen Abbildungsteil: Sauerstoffverbrauch [$\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] mit 1 mM ADP (schwarze Kreise) und ohne ADP (Quadrate) sowie ATP-Produktion [$\text{nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] (graue Kreise) isolierter Wattwurmmitochondrien bei der Oxidation unterschiedlicher Sulfidkonzentrationen ($5\text{-}100 \mu\text{M}$) ohne Modulatoren (A) sowie in Anwesenheit von 2,5 mM GSH und 2,5 mM Ascorbat (B) bzw. 1 mM DHA (C) bei 15°C . Im unteren Abbildungsteil: Prozentuale Hemmung der maximalen Raten des Sauerstoffverbrauchs (schwarze Balken) und der ATP-Produktion (graue Balken) durch Myxothiazol ($5 \mu\text{M}$), SHAM ($0,5 \text{ mM}$), KCN ($50 \mu\text{M}$) und Natriumazid ($0,5 \text{ mM}$) bei der Sulfidoxidation ohne Modulatoren (D) sowie in Anwesenheit von 2,5 mM GSH und 2,5 mM Ascorbat (E) bzw. 1 mM DHA (F).

brauchsdaten fast identisch sind, aktiviert Dehydroascorbat ein anderes Enzymsystem zur Sulfidoxidation als Glutathion und Ascorbat. Die Unterschiede lassen sich anhand der ATP-Produktion und der Wirkung der verschiedenen Atmungsketteninhibitoren herausstellen.

Schon die als Beispiel abgebildete Originalaufzeichnung des Sauerstoffgehaltes in der Oxygraphenkammer (Abb. 3.2, A, Spur 2) zeigt deutlich, dass die Atmung mit $50 \mu\text{M}$ Sulfid als Substrat in Gegenwart von 1 mM DHA gekoppelt war. Der Sauerstoffverbrauch stieg von $7,47 \pm 1,43$ auf $13,65 \pm 2,31 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, nachdem ADP in die Kammer injiziert worden war. Die Raten der DHA-aktivierten Sulfidatmung in state 3 und 4 waren im untersuchten Bereich von $5\text{-}100 \mu\text{M}$ Sulfid konstant (Abb. 3.1, C), so dass sich ein einheitlicher RCR von $2,07 \pm 0,18$ ergab. Der ATP-Test bestätigte, dass die Wattwurmmitochondrien den bei der Sulfidoxidation aufgebauten Protonengradienten in Gegenwart von DHA auch bei hohen Sulfidkonzentrationen energiekonservierend einsetzten. $5 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$ Sulfid führten gleichermaßen zur Produktion von über $20 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Erst bei einer Sulfidkonzentration von $75 \mu\text{M}$, bei der

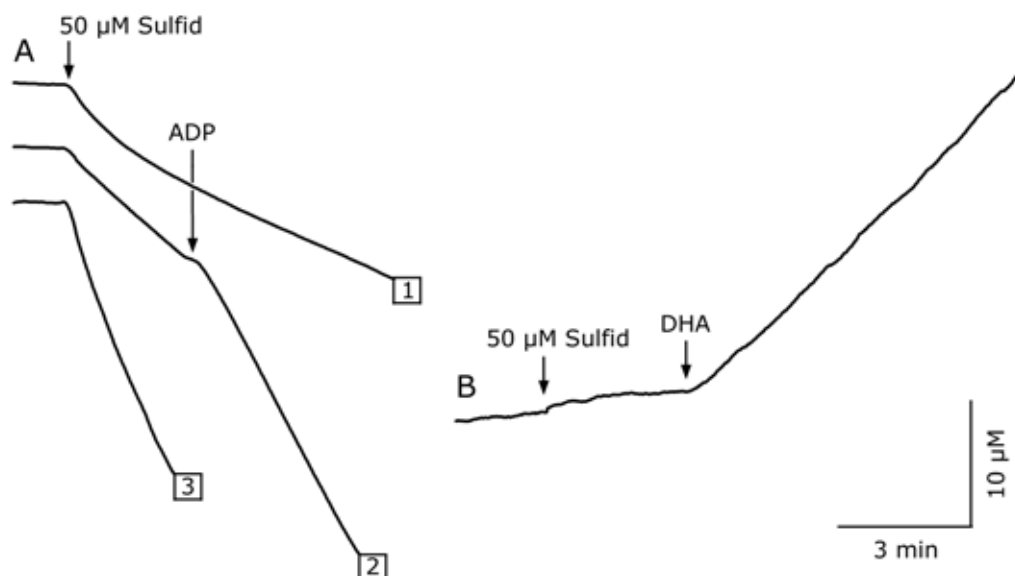


Abb. 3.2: Originalaufzeichnungen des Sauerstoffverbrauchs (A) und der ATP-Produktion (B) der Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* bei der Oxidation von $50 \mu\text{M}$ Sulfid bei 15°C . Ansatz A enthielt $0,45 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein und 1 mM DHA (Spur 2) bzw. je $2,5 \text{ mM}$ GSH und Ascorbat (Spur 3) in Reaktionsmedium (s. 2.6.1). In Ansatz B wurde die ATP-Produktion der Wattwurmmitochondrien ($0,16 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Protein) nach Powell und Somero (1986) bestimmt (s. 2.6.2). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Injektion von $50 \mu\text{M}$ Sulfid, 1 mM ADP und 1 mM DHA (Endkonzentrationen im Ansatz)

ohne DHA im Ansatz kein ATP mehr gebildet wurde, sank die Produktionsrate leicht ab und erreichte schließlich $10,96 \pm 2,87 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bei $100 \mu\text{M}$ Sulfid. Somit produzierten die Wattwurmmitochondrien durch den Einfluss von DHA signifikant mehr ATP, wenn die umgebende Sulfidkonzentration $10 \mu\text{M}$ überstieg, also ohne den Modulator die Atmungskette hemmte. Während des enzymatischen Tests war anschaulich zu beobachten, dass DHA die ATP-Produktion direkt beeinflusste (Abb. 3.2, B). Die ATP-Konzentration in der Küvette stieg nur langsam, nachdem $50 \mu\text{M}$ Sulfid als Substrat zu der Mitochondriensuspension pipettiert worden waren. Erst die Zugabe von 1 mM DHA steigerte die Rate der ATP-Produktion innerhalb weniger Sekunden auf $20,20 \pm 1,79 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. DHA alleine änderte weder den ATP- noch den Sauerstoffgehalt im Ansatz. Inhibitoren sollten zeigen, welche Komplexe der Atmungskette an der DHA-aktivierten Sulfidatmung beteiligt sind. Die Cytochrom c Oxidase wurde mit Natriumazid gehemmt, da das für die übrigen Versuchsreihen verwendete KCN mit DHA reagierte. Sowohl Myxothiazol als auch Natriumazid brachten den sulfidbedingten Sauerstoffverbrauch und die ATP-Produktion gleichermaßen fast vollständig zum Erliegen. SHAM hatte dagegen einen vergleichsweise geringen Einfluss auf die DHA-aktivierte Sulfidatmung und senkte die Raten nur leicht um $22,97 \pm 14,81 \%$ für die Atmung und $8,99 \pm 14,43 \%$ im Fall der ATP-Produktion (Abb. 3.1, F).

Reduziertes Glutathion und Ascorbat aktivierten einen anderen Sulfidoxidationsweg, denn obwohl der Sauerstoffverbrauch bei der Oxidation hoher Sulfidkonzentrationen wie durch DHA signifikant erhöht war (Abb. 3.2, A, Spur 3), wurde dabei kein ATP produziert (Abb. 3.1, B). Ganz im Gegenteil unterdrückte die Anwesenheit von GSH und Ascorbat bei niedrigen Sulfidkonzentrationen sogar die ATP-Bildung der Wattwurmmitochondrien. Maximal wurden $6,83 \pm 2,87$ nmol ATP · mg Protein⁻¹ · min⁻¹ mit 5 μM Sulfid als Substrat produziert, also nur etwa 1/4 so viel wie ohne die Aktivatoren. Dementsprechend war die Sulfidatmung nicht gekoppelt, ADP hatte unabhängig von der Sulfidkonzentration keinerlei Einfluss auf die Sauerstoffverbrauchsraten. Auch einzeln verwendet zeigten GSH und Ascorbat einen ähnlichen Effekt. 5 mM GSH ermöglichten es den Mitochondrien, Sulfid im untersuchten Konzentrationsbereich (5-100 μM) mit einer durchschnittlichen Rate von $16,73 \pm 3,67$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹ vergleichsweise schnell zu oxidieren (Daten nicht gezeigt). Allerdings verlief der Oxidationsprozess nicht immer konstant, sondern der Sauerstoffverbrauch erreichte in einigen Versuchen schnell ein Maximum und nahm anschließend kontinuierlich ab. Leichter auszuwerten waren die Versuche, in denen 5 mM Ascorbat eingesetzt wurden, um die Hemmung der Sulfidoxidation zu verhindern. In diesem Fall änderte sich die Oxidationsrate nicht, bevor das zugegebene Sulfid vollständig verbraucht worden war. Der aktivierende Effekt war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als mit GSH, so dass Sulfid nur mit $10,48 \pm 2,20$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹ entgiftet wurde. Durch die Kombination von GSH und Ascorbat ließ sich eine hohe ($15,47 \pm 3,05$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹) und gleichzeitig konstante Sulfidoxidationsrate hervorrufen. Daher diente ein äquimolares Gemisch in den weiteren Versuchen standardmäßig als Aktivator dieses Oxidationsweges. Der Unterschied zu dem durch DHA aktivierten energiekonservierenden Weg konnte auch durch Atmungsketteninhibitoren bestätigt werden (Abb. 3.1, E). Die Komplexe III und IV werden offenbar nicht für die Sulfidoxidation benötigt, wenn GSH und Ascorbat vorhanden sind, denn Myxothiazol und KCN zeigten kaum eine Wirkung. SHAM dagegen blockierte den Sauerstoffverbrauch fast vollständig um $88,08 \pm 4,23$ %. Im Gegensatz zum Vitamin C verhinderte die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) nicht, dass die Atmungskette der Wattwurmmitochondrien durch Sulfid gehemmt wurde. Mit $1,95 \pm 1,12$ nmol O₂ · mg Protein⁻¹ · min⁻¹ wurden 50 μM Sulfid durch die Anwesenheit von 5 mM GSSG sogar etwas langsamer oxidiert (Daten nicht gezeigt).

3.1.1.2 Sauerstoffaffinitäten der terminalen Oxidasen

Mit Hilfe der spezifischen Aktivatoren DHA bzw. GSH und Ascorbat war es nun möglich, die beiden Sulfidoxidationswege gezielt einzeln zu untersuchen. Dabei stellte sich

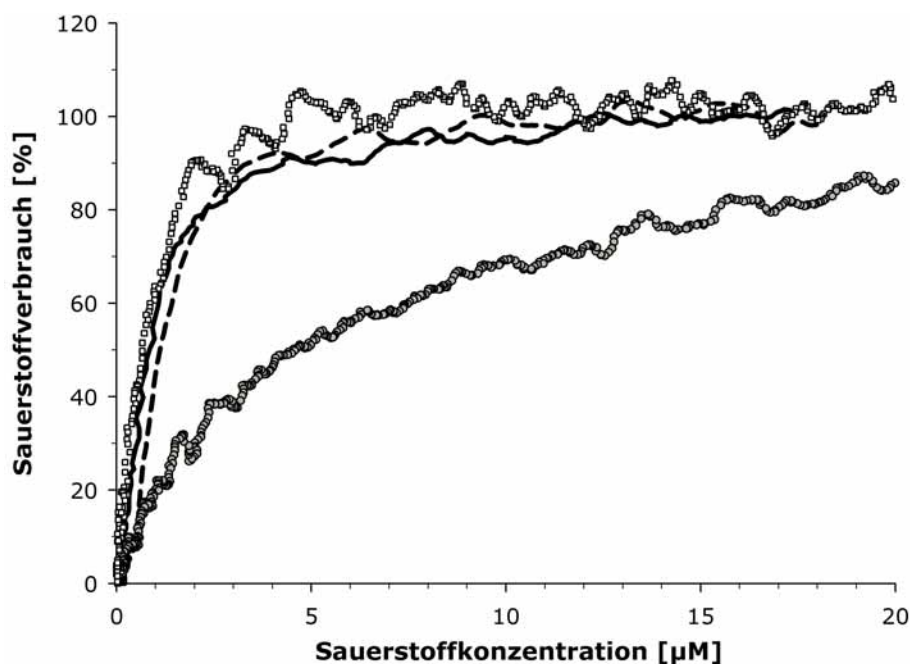


Abb. 3.3: Michaelis-Menten-Diagramm zur Bestimmung der Sauerstoffaffinität der Cytochrom c Oxidase und der terminalen Oxidasen bei der Sulfidoxidation in Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina*. Bei der state 3 Atmung mit den Substraten Malat (durchgezogene Linie), Succinat (gestrichelte Linie) sowie 50 μM Sulfid in Anwesenheit von DHA (1 mM; weiße Quadrate) bzw. GSH und Ascorbat (je 2,5 mM; graue Kreise) wurde der Sauerstoffgehalt im Reaktionsmedium aufgezeichnet, bis die Mitochondrien den Sauerstoff vollständig verbraucht hatten. Die Sauerstoffverbrauchsrate [% der Rate in luftgesättigtem Reaktionsmedium] wurden gegen die zugehörigen Sauerstoffkonzentrationen im Reaktionsmedium [μM] aufgetragen.

heraus, dass die terminalen Oxidasen nicht nur unterschiedlich stark durch die Inhibitoren KCN und SHAM gehemmt wurden, sondern auch verschiedene Affinitäten zu dem Elektronenakzeptor Sauerstoff hatten. Wenn die Mitochondrien mit Succinat oder Malat als Substrat den im Reaktionsmedium gelösten Sauerstoff vollständig verbrauchten, blieb die Atmungsrate konstant, bis nur noch etwa 5 μM Sauerstoff vorhanden waren und fiel anschließend schnell bis auf Null ab. Ganz ähnlich verlief die Reaktion, während die Mitochondrien Sulfid in Anwesenheit von DHA veratmeten. GSH und Ascorbat dagegen bewirkten, dass die Rate der Sulfidoxidation bereits abnahm, sobald die Sauerstoffkonzentration unter 40 μM sank und sich bei 5 μM O_2 schon mehr als halbiert hatte. Um die kinetischen Parameter der beteiligten Oxidasen zu bestimmen, wurden jeweils die Sauerstoffverbrauchsrate gegen die zugehörigen Sauerstoffkonzentrationen im Reaktionsmedium in einer Michaelis-Menten-Darstellung aufgetragen (Abb. 3.3). Auf den ersten Blick ist die deutlich niedrigere Sauerstoffaffinität des durch GSH und Ascorbat aktivierten Sulfidoxidationswegs zu erkennen. Mit $5,38 \pm 0,67 \mu\text{M}$ war der K_m -Wert für Sauerstoff signifikant höher als der mit den Substraten Malat und Succinat für die Cytochrom c Oxidase ermittelte K_m -Wert von $1,77 \pm 0,54 \mu\text{M}$ O_2 . DHA dagegen erhöhte die

Sauerstoffaffinität der an der Sulfidoxidation beteiligten Oxidase sogar leicht gegenüber den Intermediaten des Citratcyclus ($K_m = 0,88 \pm 0,11 \mu\text{M } O_2$).

3.1.1.3 Wasserstoffperoxidproduktion der Mitochondrien

Glutathion und Ascorbat sind in tierischen Zellen in millimolaren Konzentrationen vorhanden und wirken antioxidativ, indem sie einzelne Elektronen reversibel auf Radikale übertragen. Daher zählen sie zu den wichtigsten niedermolekularen Verbindungen zum Schutz vor oxidativem Stress (Ehrhart & Zeevalk 2003). Um zu überprüfen, ob diese gemeinsame Eigenschaft von GSH und Ascorbat mit ihrer aktivierenden Wirkung auf die Sulfidoxidation in Verbindung stehen könnte, wurde die Wasserstoffperoxidproduktion der Wattwurmmitochondrien untersucht. Mit Succinat als Substrat war die stärkste Radikalproduktion nachweisbar. Während der state 4 Atmung setzen die Mitochondrien mit konstanter Rate $5,25 \pm 1,13 \text{ nmol } H_2O_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ frei (Abb. 3.4 und Abb. 3.5) und in Anwesenheit von ADP noch $0,73 \pm 0,22 \text{ nmol } H_2O_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Isocitrat führte nur zur Produktion von Radikalen ($1,29 \pm 0,55 \text{ nmol } H_2O_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$), wenn kein ADP im Ansatz vorhanden war, wohingegen mit den Substraten Malat und Aspartat sowie bei der Sulfidoxidation kein Wasserstoffperoxid entstand. Auch wenn Komplex I mit Rotenon gehemmt wurde, stieg die Radikalkonzentration in den Wattwurmmitochondrien nicht.

In weiteren Versuchen wurde nach Metaboliten mit antioxidativen Eigenschaften gesucht, die in der Lage waren, die durch Succinat induzierte Wasserstoffperoxidproduktion zu verhindern. Der typische Ablauf eines solchen Experiments ist in Abbildung 3.4 (Spur A) dargestellt. Zur Kalibrierung wurde zunächst $1 \mu\text{M } H_2O_2$ in den Ansatz pipettiert. Mit Succinat als Substrat begannen die Mitochondrien nach einigen Sekunden, Radikale zu produzieren, was z.B. durch die Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Sulfid vollständig unterbunden werden konnte. Anschließend wurde erneut H_2O_2 injiziert, um sicherzustellen, dass das Testsystem durch die zugegebenen Substanzen nicht beeinträchtigt war. Alternativ wurden die zu testenden Metabolite, wie z.B. Isocitrat, vorgelegt (Abb. 3.4, B) und überprüft, ob sich dadurch die Succinat-bedingte Wasserstoffperoxidproduktion der Mitochondrien änderte. Am effektivsten, nämlich zu 100 %, unterdrückten die als Radikalfänger bekannten Antioxidantien GSH und Ascorbat die Produktion von H_2O_2 (Abb. 3.5). Auch Malat und Malonat, die in vorhergehenden Studien die Raten der Sulfidoxidation in den Mitochondrien von *A. marina* gesteigert hatten (Przywara 2004), hemmten die Radikalbildung signifikant um über 90 % auf $0,27 \pm 0,29$ bzw. $0,32 \pm 0,33 \text{ nmol } H_2O_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Aspartat und Isocitrat dagegen zeigten keinerlei Wirkung. Daraufhin wurde getestet, inwiefern Malat, Malonat, Succinat, Aspartat und Isocitrat den Sulfidoxi-

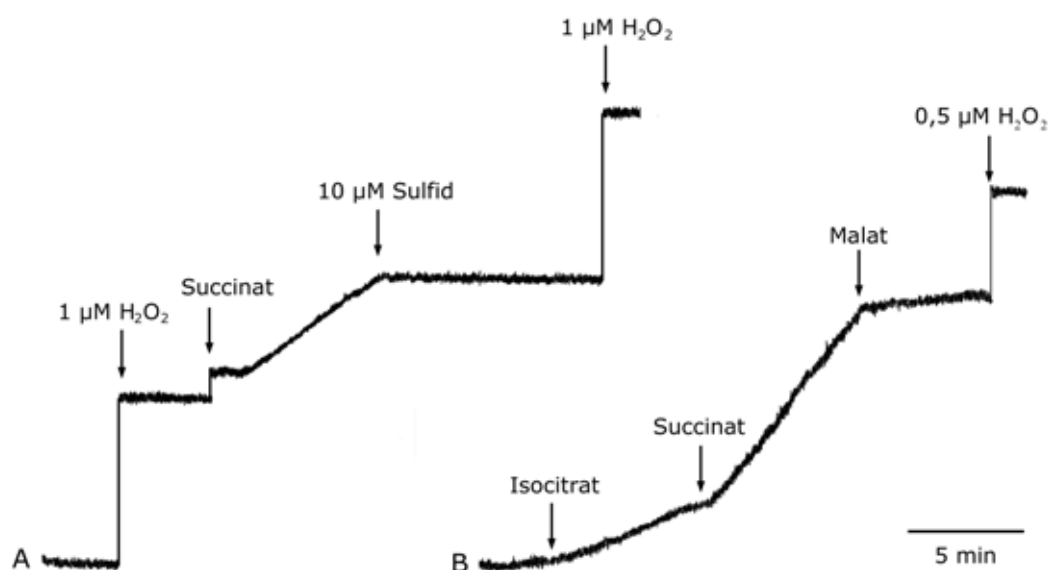


Abb. 3.4: Originalaufzeichnungen der Wasserstoffperoxidproduktion der Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (A: $18 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein, B: $33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein) bei der Succinatoxidation sowie Einflüsse von Sulfid, Isocitrat und Malat. Aufgezeichnet wurde die Fluoreszenzzunahme ($\lambda_{ex} = 317 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 414 \text{ nm}$) durch die Oxidation von p-Hydroxyphenylacetat mittels Wasserstoffperoxid katalysiert durch Meerettich-Peroxidase. Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe von Wasserstoffperoxid, Sulfid, Succinat (4 mM), Malat (8 mM) und Isocitrat (8 mM, Gesamtkonzentration im Ansatz)

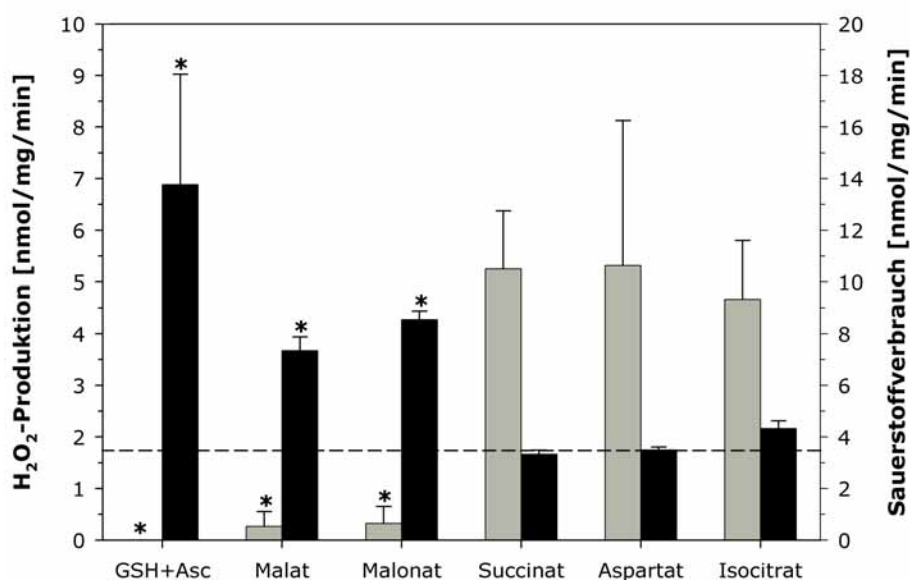


Abb. 3.5: Wasserstoffperoxidproduktion bei der Succinatoxidation (graue Balken) und Sauerstoffverbrauch bei der Sulfidoxidation (schwarze Balken) [$\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] der Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* unter dem Einfluss von GSH und Ascorbat (je 2,5 mM), Malonat (3 mM) sowie Malat, Aspartat oder Isocitrat (je 8 mM). Der Sauerstoffverbrauch bei der Oxidation von $20 \mu\text{M}$ Sulfid wurde in Anwesenheit von Rotenon und Myxothiazol bestimmt. Die gestrichelte Linie markiert zum Vergleich die Rate der Sulfidoxidation in Abwesenheit der untersuchten Substanzen. Mit * gekennzeichnete Werte unterscheiden sich signifikant von der Rate der Wasserstoffperoxidproduktion bei der Succinatoxidation bzw. des Sauerstoffverbrauchs bei der Sulfidoxidation ohne weitere Zusätze

dationsweg beeinflussen, der durch GSH und Ascorbat aktiviert wird. Um ausschließlich dieses sulfidentgiftende Enzymsystem betrachten zu können, wurde der an der energiekon-servierenden Sulfidoxidation beteiligte, hintere Teil der Atmungskette durch Myxothiazol gehemmt. Zusätzlich verhinderte Rotenon, dass die Elektronen aus der Oxidation der zu-gegebenen Substrate an Komplex I in die Atmungskette eingespeist werden konnten. 20 μM Sulfid wurden unter diesen Bedingungen mit einer Rate von $3,50 \pm 0,51 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ oxidiert (Abb. 3.5, gestrichelte Linie). GSH und Ascorbat bewirkten den größten Anstieg und vervierfachten die Sauerstoffverbrauchsrate auf $13,77 \pm 4,27 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Aber auch durch die Anwesenheit von Malat oder Malonat wurde Sulfid von den Wattwurmmitochondrien mit $7,34 \pm 0,53$ bzw. $8,55 \pm 0,33 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant schneller oxidiert. Succinat, Aspartat und Isocitrat dagegen, die bei *A. marina* nicht antioxidativ wirkten, hatten auch keinen Einfluss auf die Rate der mitochondrialen Sulfidoxidation.

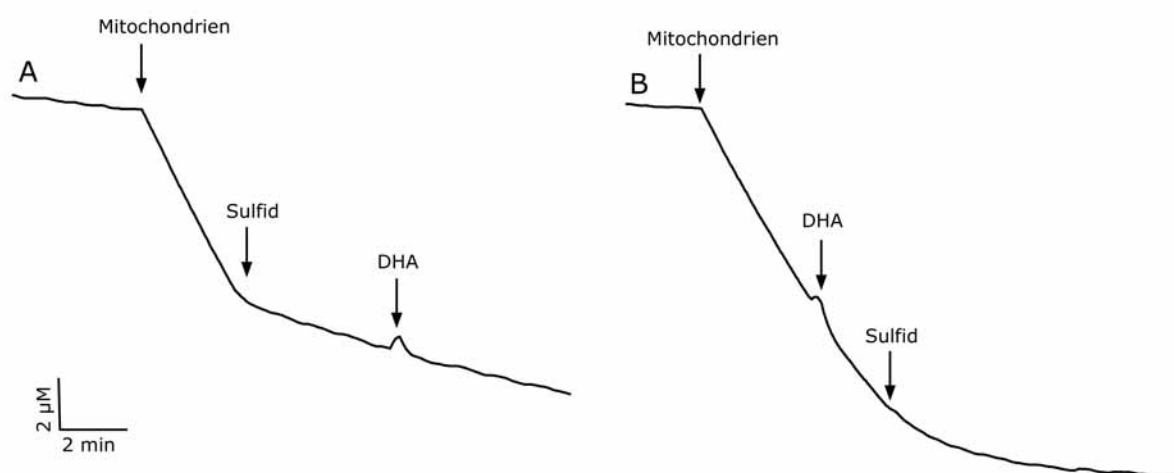


Abb. 3.6: Originalaufzeichnungen der Cytochrom c Oxidation durch Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* sowie Einflüsse von Sulfid und Dehydroascorbat. Beide Ansätze enthielten 50 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl und 100 μM reduziertes Cytochrom c. Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe von $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein, 10 μM Sulfid und 1 mM DHA (Gesamtkonzentrationen im Ansatz). Die Konzentration des reduzierten Cytochrom c's [μM] wurde aus der Extinktion bei 550 nm berechnet.

3.1.1.4 Hemmung der Cytochrom c Oxidase

Bei der Suche nach einer Erklärung für die Wirkungsweise von DHA auf die mitochondrielle Sulfidoxidation beim Wattwurm wurde getestet, ob diese Substanz die Hemmung der Cytochrom c Oxidase durch Sulfid verhindert. Die Aktivität der Cytochrom c Oxidase in isolierten Mitochondrien wurde anhand der Oxidationsrate von extern zugegebenem reduziertem Cytochrom c aus Rinderherz ermittelt und betrug $0,81 \pm 0,05 \mu\text{mol Cytochrom c}$

$ox. \cdot mg \text{ Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. $10 \mu\text{M}$ Sulfid hemmten die Aktivität von Komplex IV um über 90 % und auch die Zugabe von 1 mM DHA erhöhte die Oxidationsrate des Cytochrom *c*'s nicht (Abb. 3.6, A). DHA alleine zeigte keinen Einfluss auf die Extinktionsänderung bei 550 nm. Auch konnte die Anwesenheit von 1 mM DHA im Ansatz nicht verhindern, dass die Oxidation des Cytochrom *c*'s unmittelbar nach der Sulfidzugabe fast vollständig zum Erliegen kam (Abb. 3.6).

3.1.2 Sulfid als Atmungssubstrat bei Rattenlebermitochondrien

Während bereits zahlreiche Studien zur mitochondrialen Sulfidoxidation bei sulfidadaptierten Invertebraten existieren, ist noch sehr wenig darüber bekannt, wie die Mitochondrien von Säugetieren auf Sulfid in unterschiedlichen Konzentrationen reagieren. Da die Rattenleber als Entgiftungsorgan relativ hohe Sulfidoxidationsraten aufweist, wurde dieses Organ ausgewählt, um zunächst einige Grundlagen der Sulfidoxidation bei Säugermitochondrien zu untersuchen.

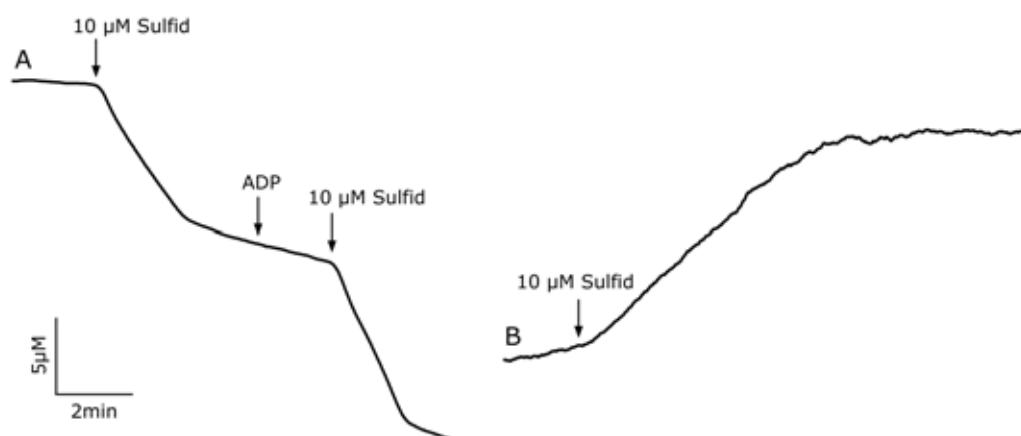


Abb. 3.7: Originalaufzeichnungen des Sauerstoffverbrauchs (A) und der ATP-Produktion (B) isolierter Rattenlebermitochondrien bei der Oxidation von $10 \mu\text{M}$ Sulfid bei 25°C . Ansatz A enthielt $0,35 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein in Reaktionsmedium (s. 2.6.1). In Ansatz B wurde die ATP-Produktion der Mitochondrien ($0,14 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Protein) nach Powell und Somero (1986) bestimmt (s. 2.6.2). Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Injektion von $10 \mu\text{M}$ Sulfid bzw. 1 mM ADP (Endkonzentrationen im Ansatz)

Die aus Rattenleber isolierten Mitochondrien oxidierten Sulfid in niedrigen Konzentrationen und verbrauchten dabei Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Anhand der Originalaufzeichnungen (Abb. 3.7, A) wird deutlich, dass $10 \mu\text{M}$ Sulfid mit einem konstanten Sauerstoffverbrauch von durchschnittlich $9,80 \pm 3,38 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ oxidiert wurden. In Anwesenheit von ADP führte eine zweite Sulfidinjektion zu einer deutlich höheren Oxidationsrate, die ebenfalls konstant blieb, bis das in der Kammer vorhandene Sulfid vollständig oxidiert worden war. Da allerdings weitere Zugaben von Sulfid

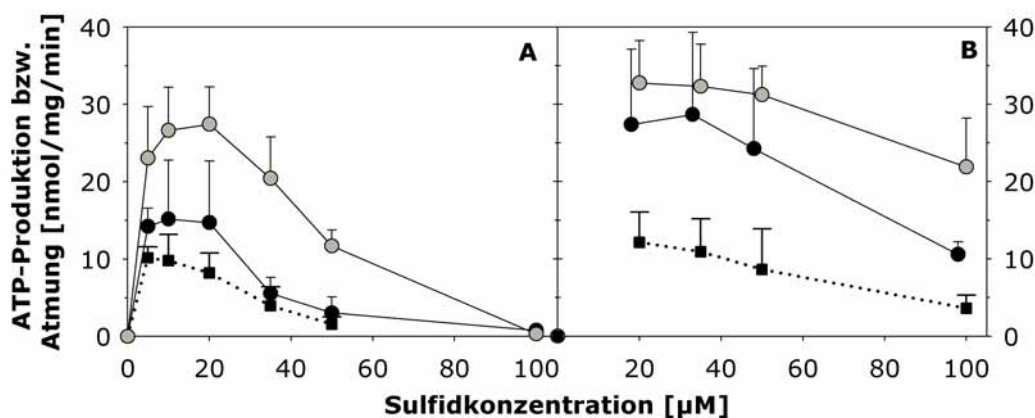


Abb. 3.8: Sauerstoffverbrauch [$\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] und ATP-Produktion [$\text{nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] bei der Oxidation von 5 - 100 μM Sulfid durch isolierte Rattenlebermitochondrien (A) und Aktivierung der Sulfidoxidation mittels Glutamat (B). Die Atmungsraten der Mitochondrien (0,1-0,5 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Protein) in state 3 (mit 1 mM ADP, schwarze Kreise) und in state 4 (ohne ADP, schwarze Quadrate) wurden jeweils in separaten Ansätzen bei 25 °C bestimmt. Die ATP-Produktion (graue Kreise) wurde nach Powell und Somero (1986, s. 2.6.2) ebenfalls bei 25°C mit 21-292 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein ermittelt. In Teil B enthielten alle Ansätze neben 8 mM Glutamat auch 1,5 μM Rotenon, um zu verhindern, dass die Elektronen aus der Glutamatoxidation an Komplex I in die Atmungskette übertragen werden konnten.

die Oxidationsrate zunehmend hemmten, wurden grundsätzlich separate Ansätze verwendet, um die Raten der Sulfidatmung in state 3 und 4 zu bestimmen. Dabei stellte sich heraus, dass die Rattenlebermitochondrien bis zu 20 μM Sulfid mit maximaler Rate oxidierten und dabei deutlich gekoppelt waren (Abb. 3.8, A). Mit $14,72 \pm 6,65 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ übertraf die Sulfidatmung in state 3 sogar die Atmungsraten mit dem Substrat Glutamat (Tab. 3.1), hatte jedoch einen geringeren Respiratorischen Kontrollfaktor ($1,58 \pm 0,44$ gegenüber $5,95 \pm 1,77$), da Sulfid auch ohne ADP mit $9,16 \pm 2,68 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ oxidiert wurde. Mit vierfach höherer Rate als Sulfid wurde dagegen Succinat von den Rattenlebermitochondrien veratmet.

Da die Sulfidatmung der Rattenlebermitochondrien gekoppelt war, wurde offenbar ein Protonengradient aufgebaut. Dementsprechend ließ sich auch direkt nachweisen, dass die Mitochondrien Sulfid in niedrigen Konzentrationen als Substrat für die ATP-Produktion nutzen konnten (Abb. 3.7, B). Bei der Oxidation von 5 μM Sulfid entstanden insgesamt $7,54 \pm 1,02 \mu\text{M}$ ATP, es wurden also pro Sulfidmolekül $1,51 \pm 0,20$ Moleküle ATP gebildet. Die höchste Rate der ATP-Produktion erreichten die Rattenlebermitochondrien mit 20 μM Sulfid (Abb. 3.8, A). Mit $27,45 \pm 4,81 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ war Sulfid dennoch als Atmungssubstrat wesentlich weniger effektiv als Succinat, das $144,26 \pm 17,24 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ lieferte (Tab. 3.1).

Im Gegensatz zu den Wattwurmmitochondrien wurde die Sulfidoxidation bei Rattenlebermitochondrien vollständig durch Hemmstoffe der Atmungskettenkomplexe III und IV

Tab. 3.1: Atmungsraten in state 3 (mit 1 mM ADP) und state 4 (ohne ADP) [$\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$], Respiratorischer Kontrollfaktor (RCR) sowie ATP-Produktion [$\text{nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] von Rattenlebermitochondrien bei 25°C. Als Substrate wurden Succinat (4 mM), Glutamat (8 mM) und Sulfid [5-20 μM] eingesetzt.

Substrat	Atmung		RCR	ATP-Produktion
	state 3	state 4		
	<i>nmol/mg/min</i>	<i>nmol/mg/min</i>		<i>nmol/mg/min</i>
Succinat	59,98 ± 8,84	16,49 ± 4,14	3,91 ± 1,30	144,26 ± 17,24
Glutamat	10,78 ± 1,85	1,94 ± 0,56	5,95 ± 1,77	47,21 ± 5,53
5-20 μM Sulfid	14,72 ± 6,65	9,16 ± 2,68	1,58 ± 0,44	23,65 ± 5,30

blockiert. Myxothiazol hemmte die Sauerstoffverbrauchsrate mit 10 μM Sulfid um 97,50 ± 4,33 % und KCN sogar um 99,69 ± 0,33 %, und es war keine ATP-Produktion mehr nachweisbar. Rotenon und SHAM beeinflussten dagegen weder den Sauerstoffverbrauch noch die ATP-Produktion bei der Sulfidatmung.

Wenn die Sulfidkonzentration im Versuchsansatz etwa 20 μM überstieg, wurde die Sulfidatmung der Rattenlebermitochondrien gehemmt (Abb. 3.8, A). Die Oxidationsrate sank rapide und erreichte bereits mit 35 μM Sulfid nur noch etwa ein Drittel der maximalen Rate (5,54 ± 2,09 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$). Dennoch ließ sich selbst in Anwesenheit von 50 μM Sulfid der Sauerstoffverbrauch durch ADP von 1,56 ± 0,97 auf 3,03 ± 2,06 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ stimulieren. Die Rattenlebermitochondrien produzierten dabei 11,67 ± 2,06 $\text{nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und wurden erst durch 100 μM Sulfid vollständig gehemmt. Allerdings enthielt der Ansatz zur ATP-Bestimmung offenbar eine Substanz, welche die Hemmung durch Sulfid verzögerte. Während das Verhältnis der ATP-Produktion zum Sauerstoffverbrauch bei niedrigen Sulfidkonzentrationen konstant bei etwa 1,7 lag, wurde mit steigender Konzentration scheinbar mehr ATP produziert. Wenn jedoch der gleiche Ansatz wie für die ATP-Bestimmung verwendet wurde, um den Sauerstoffverbrauch bei der Oxidation von 50 μM Sulfid zu ermitteln, war die Rate mit 6,82 ± 2,12 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ leicht erhöht, so dass die Unstimmigkeit beseitigt war.

3.1.2.1 Einfluss von Glutamat

Die Giftigkeit von Sulfid wird teilweise darauf zurückgeführt, dass es die Cytochrom c Oxidase hemmt und so den Energiestoffwechsel der Zellen beeinträchtigt. Daher wurde getestet, wie die auf anderen Substraten basierende Atmung der Rattenlebermitochondrien auf steigende Sulfidkonzentrationen reagierte. Bei der Succinatatmung waren Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion gleichermaßen Sulfid-sensitiv (Abb. 3.9). Als Inhibitor-konzentration halbmaximaler Hemmung (IC_{50}) wurde 27,58 ± 5,49 μM Sulfid ermittelt.

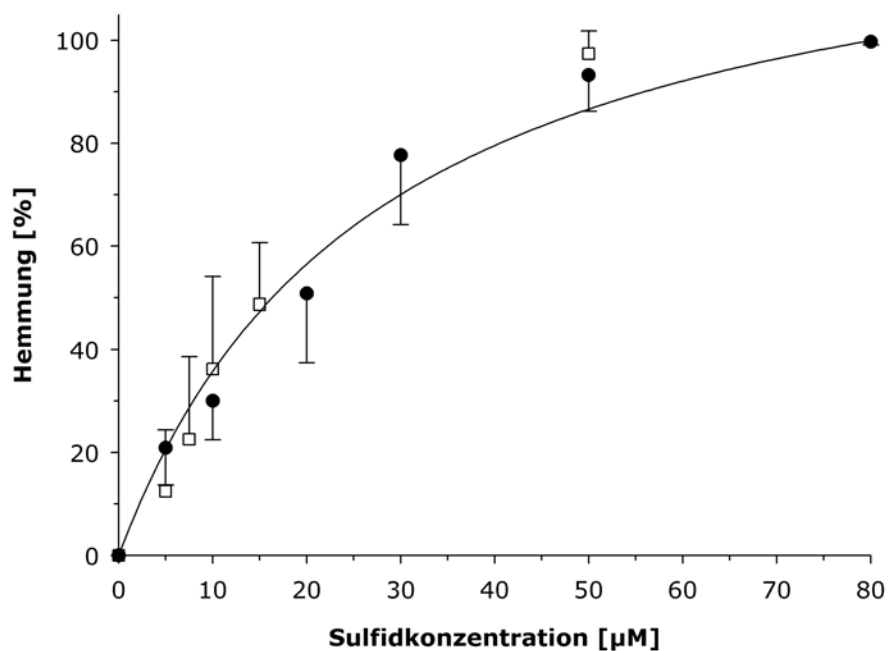


Abb. 3.9: Hemmung [%] des Sauerstoffverbrauchs (weiße Quadrate) und der ATP-Produktion (schwarze Kreise) bei der Succinatatmung von Rattenlebermitochondrien durch Sulfid. Die Atmung wurde zunächst durch Zugabe von 4 mM Succinat und 1 mM ADP stimuliert und anschließend Sulfid in der gewünschten Konzentration injiziert um die prozentuale Hemmung zu ermitteln. Für jede Sulfidkonzentration wurde ein separater Ansatz verwendet. Die Hemmkurve entspricht einer einfach gleichverteilten Hyperbel mit der Funktionsgleichung $y = ax/(b+x)$ und wurde mit SigmaPlot 9.01 berechnet

Dementsprechend brachte die Injektion von 50 μM Sulfid den Sauerstoffverbrauch von Rattenlebermitochondrien, die Succinat als Substrat oxidierten, innerhalb weniger Sekunden fast vollständig zum Erliegen (Abb. 3.10, A, Spur 2). Ganz anders reagierten die Mitochondrien auf dieselbe Sulfidkonzentration, wenn zuvor Glutamat verwendet worden war, um die state 3 Atmung zu induzieren (Abb. 3.10, A, Spur 1). 50 μM Sulfid verdreifachte die Atmungsrate auf 35,30 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, und erst nachdem das zugegebene Sulfid vollständig oxidiert worden war, fiel der Sauerstoffverbrauch abrupt wieder ab. Glutamat steigerte die Raten der Sulfidoxidation unabhängig davon, ob die Elektronen aus der Glutamatoxidation in die Atmungskette übertragen wurden und so zu Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion beitragen konnten. Die als Beispiel abgebildeten Versuche (Abb. 3.10, B) unterschieden sich nur durch die Anwesenheit von Glutamat in Ansatz 2. Beide Proben enthielten neben ADP auch Rotenon, so dass Komplex I gehemmt wurde und zunächst kein Sauerstoffverbrauch zu beobachten war. Unmittelbar nach der Injektion von 50 μM Sulfid nahm die Sauerstoffkonzentration im Reaktionsmedium rapide ab. In Ansatz 1 wurde die Sulfidoxidation jedoch nach einigen Sekunden gehemmt, und erst nach etwa 10 Minuten, nachdem die Mitochondrien einen Großteil des Sulfids oxidiert und die Konzentration auf wenige μM gesenkt hatten, stieg der Sauerstoff-

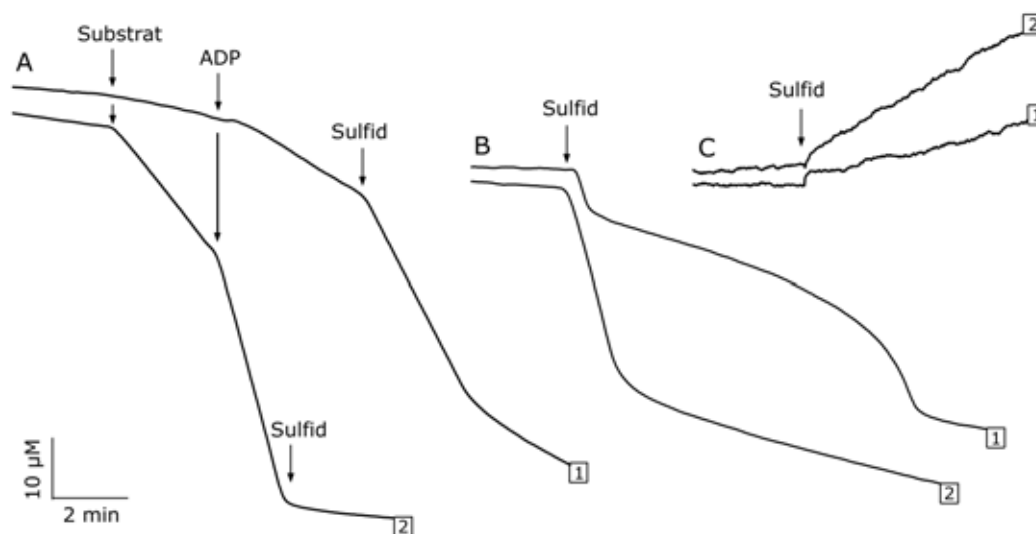


Abb. 3.10: Originalaufzeichnungen des Sauerstoffverbrauchs (A und B) und der ATP-Produktion (C) von Rattenlebermitochondrien bei der Oxidation von $50 \mu\text{M}$ Sulfid unter dem Einfluss von Glutamat bei 25°C . Ansatz A enthielt $0,33 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein in Reaktionsmedium (s. 2.6.1). Vor der Sulfidzugabe wurde zunächst bei den Mitochondrien state 4 Atmung durch Injektion der Substrate Glutamat (Spur 1) bzw. Succinat (Spur 2) hervorgerufen und mittels ADP zu state 3 stimuliert. Ansatz B enthielt $0,69 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein, 1 mM ADP und $1,5 \mu\text{M}$ Rotenon sowie zusätzlich 8 mM Glutamat in Ansatz B2. In Ansatz C wurde die ATP-Produktion der Rattenlebermitochondrien ($0,2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ Protein) nach Powell und Somero (1986) bestimmt (s. 2.6.2). Bei beiden Versuchen wurde $1,5 \mu\text{M}$ Rotenon vorgelegt und Ansatz C2 enthielt außerdem 8 mM Glutamat. Die Pfeile markieren den Zeitpunkt der Injektion von $50 \mu\text{M}$ Sulfid, 1 mM ADP, 4 mM Succinat und 8 mM Glutamat (Endkonzentrationen im Ansatz)

verbrauch langsam wieder. Das Glutamat in Ansatz 2 verhinderte offenbar die Hemmung der Sulfidoxidation, so dass die anfängliche, hohe Rate im gesamten Verlauf der Reaktion aufrecht erhalten werden konnte. Die entsprechenden Versuche zur ATP-Produktion zeigten einen ähnlichen Effekt (Abb. 3.10, C). Die Rattenlebermitochondrien produzierten mit konstanter Rate bei der Sulfidoxidation deutlich mehr ATP, wenn Glutamat im Ansatz vorhanden war (Spur 2). Bei allen weiteren Versuchen zur Wirkung von Glutamat auf die Sulfidoxidation enthielt der Ansatz $1,5 \mu\text{M}$ Rotenon, um Komplex I der Atmungskette zu hemmen und ausschließlich die Elektronen aus der Sulfidoxidation betrachten zu können.

Im gesamten untersuchten Konzentrationsbereich ($20\text{-}100 \mu\text{M}$ Sulfid) erhöhte die Anwesenheit von Glutamat bei Rattenlebermitochondrien signifikant die Rate der Sulfidoxidation in state 3 (Abb. 3.8, B). Bis zu $35 \mu\text{M}$ Sulfid wurden mit maximaler Rate von $28,02 \pm 9,83 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ veratmet. Darüber hinaus sank die Oxidationsrate mit steigender Sulfidkonzentration, war aber dennoch selbst mit $100 \mu\text{M}$ Sulfid mit $10,57 \pm 1,64 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant größer als Null. Da auch der Sauerstoffverbrauch in state 4 dieselbe Tendenz zeigte und von $12,12 \pm 3,92 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ mit $20 \mu\text{M}$ Sulfid bis auf $3,60 \pm 1,72 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ mit $100 \mu\text{M}$ Sulfid abnahm, lag der RCR konstant bei etwa $2,80 \pm 0,71$. Glutamat ermöglichte

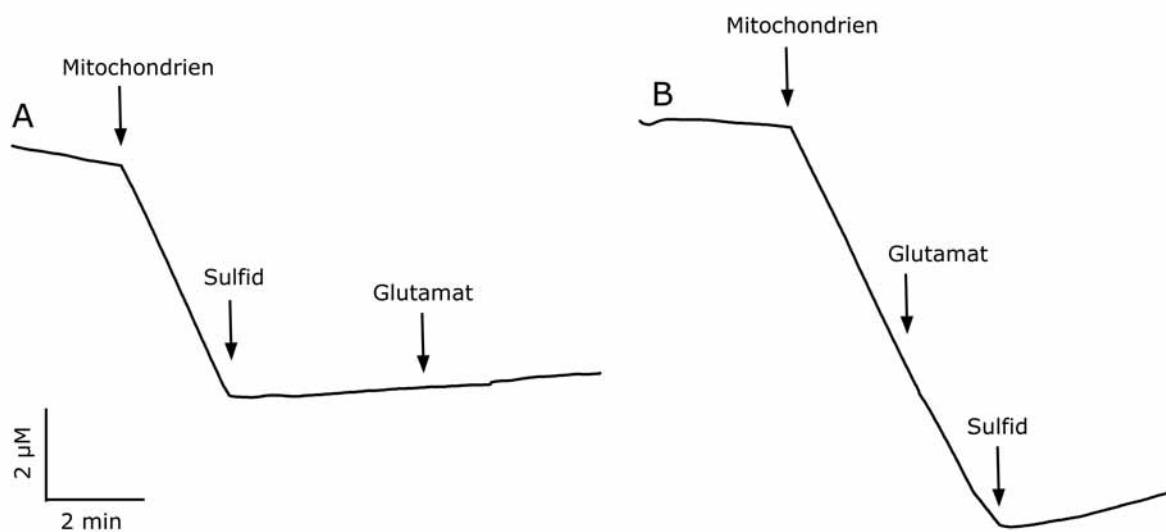


Abb. 3.11: Originalaufzeichnungen der Cytochrom c Oxidation durch Rattenlebermitochondrien mit den Einflüssen von Sulfid und Glutamat. Beide Ansätze enthielten 50 mM Tris (pH 7,5), 50 mM NaCl und 100 μM reduziertes Cytochrom c. Die Pfeile kennzeichnen den Zeitpunkt der Zugabe von $54 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Mitochondrienprotein, 10 μM Sulfid und 8 mM Glutamat (Gesamtkonzentrationen im Ansatz). Die Konzentration des reduzierten Cytochrom c's [μM] wurde aus der Extinktion bei 550 nm berechnet.

es den Rattenlebermitochondrien, Sulfid selbst in vergleichsweise hohen Konzentrationen als Substrat für die oxidative Phosphorylierung zu nutzen. Mit 100 μM Sulfid bildeten die Mitochondrien z.B. $21,89 \pm 6,34 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und somit nicht signifikant weniger als ohne Glutamat nur mit niedrigen Sulfidkonzentrationen ($\leq 20 \mu\text{M}$) erreicht werden konnte. Ohne weitere Zusätze wurde die ATP-Produktion durch 100 μM Sulfid bereits vollständig gehemmt. 20 bis 50 μM erwies sich als optimale Substratkonzentration für die Glutamat-aktivierte Sulfidatmung, denn die Rattenlebermitochondrien bildeten mit konstanter Rate $32,05 \pm 4,56 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Die Wirkung der Atmungsketteninhibitoren auf die Sulfidoxidation änderte sich durch die Anwesenheit von Glutamat nicht. KCN und Myxothiazol hemmten sowohl den Sauerstoffverbrauch als auch die ATP-Produktion vollständig, während Rotenon und SHAM keine Wirkung zeigten. Der Entkoppler 2,4-Dinitrophenol verhinderte die sulfidbedingte ATP-Produktion in An- und Abwesenheit von Glutamat.

Wie auch bei den Wattwurmmitochondrien wurde die Oxidation von extern zugegebenem reduziertem Cytochrom c durch isolierte Rattenlebermitochondrien bereits durch niedrige Sulfidkonzentrationen gehemmt. 10 μM Sulfid brachten die Extinktionsabnahme bei 550 nm vollständig zum Erliegen (Abb. 3.11, A). Glutamat beeinflusste die durch diesen Aktivitätstest ermittelte Cytochrom c Oxidase-Aktivität von $41,36 \pm 1,41 \mu\text{mol Cytochrom } c_{ox.} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ nicht, konnte allerdings auch nicht die Hemmung durch Sulfid verhindern (Abb. 3.11).

Um zu testen, ob Glutamat möglicherweise zuerst von den Lebermitochondrien umgesetzt werden musste, um die Raten der Sulfidoxidation beeinflussen zu können, wurden die Reaktionsprodukte Aspartat, α -Ketoglutarat und Ammonium eingesetzt (0,8 - 8 mM). Aspartat entsteht neben α -Ketoglutarat bei der Transaminierung von Glutamat, und die Glutamatdehydrogenase setzt durch oxidative Desaminierung α -Ketoglutarat und NH_4^+ frei. Keine der drei Substanzen war in der Lage, die Raten des Sauerstoffverbrauchs oder der oxidativen Phosphorylierung mit 50 μM Sulfid als Substrat signifikant zu erhöhen.

Dehydroascorbat verhinderte, ähnlich wie bei den Wattwurmmitochondrien, zumindest teilweise die Hemmung der Sulfidoxidation durch steigende Sulfidkonzentrationen bei Rattenlebermitochondrien. Allerdings war der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt als mit Glutamat. 50 μM Sulfid wurden durch die Anwesenheit von 1 mM DHA mit $9,32 \pm 2,18 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant schneller oxidiert, und die Rate der ATP-Produktion stieg ebenfalls signifikant auf $12,89 \pm 3,63 \text{ nmol ATP} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, wenn 100 μM Sulfid als Substrat eingesetzt wurden. Glutathion und Ascorbat dagegen aktivierten die Sulfidoxidation bei Rattenlebermitochondrien nicht.

3.2 Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation

Die bisher beschriebenen Ergebnisse beschäftigen sich schwerpunktmäßig mit der Regulation der mitochondrialen Sulfidatmung und dem Weg der Elektronen aus der Sulfidoxidation in der Atmungskette. Der enzymatische Weg, der zur Bildung des Endproduktes Thiosulfat führt, wurde ebenfalls noch nicht beschrieben und war daher Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden werden die sehr ähnlichen Ergebnisse, die mit den Rattenleber- und Wattwurmmitochondrien ermittelt wurden, parallel dargestellt.

3.2.1 Stöchiometrie der mitochondrialen Sulfidoxidation

Damit die enzymatischen Reaktionen der einzelnen Teilschritte bei der Sulfidoxidation bei den beiden untersuchten Tierarten besser vergleichbar sind, wurden alle Versuche bei 25 °C durchgeführt. Die Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* oxidierten 5-10 μM Sulfid bei dieser Temperatur mit $25,43 \pm 2,22 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ signifikant schneller als die Rattenlebermitochondrien, für die eine Rate von $14,39 \pm 2,37 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ermittelt worden war (Tab. 3.2).

Die Mitochondrien aus Rattenleber und aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* setzten gleichermaßen Sulfid quantitativ zu Thiosulfat um und nutzen dabei molekularen

Tab. 3.2: Aktivitäten der sulfidoxidierenden Enzymsysteme in aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* isolierten Mitochondrien sowie der Teilreaktionen in der mitochondrialen Membran und Matrix bei 25°C. Die Sulfidoxidationsraten der Mitochondrien [$\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] wurden mit 5-10 μM Sulfid als Substrat in Reaktionsmedium bestimmt (s. 2.6.1). Die SQR-Aktivität in den Mitochondrienmembranen [$\text{nmol dQ}_{red} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] entspricht der Reduktionsrate von 100 μM decyl-Ubichinon durch 100 μM Sulfid in Anwesenheit von 2 mM KCN in 20 mM Tris (pH 8,0). In der mitochondrialen Matrix wurde die Sauerstoffverbrauchsrate bei der Oxidation von 79,3 \pm 4,5 μM Glutathionpersulfid [$\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) ermittelt.

Kompartiment	Reaktion	Aktivität	
		Ratte	Wattwurm
		<i>nmol/mg/min</i>	
Mitochondrien	Sulfidoxidation	14,39 \pm 2,37	25,43 \pm 2,22
Membranen	Sulfidoxidation	56,63 \pm 8,21	226,32 \pm 11,41
Matrix	Persulfidoxidation	138,11 \pm 27,95	133,16 \pm 14,19

Sauerstoff als Elektronenakzeptor (Abb. 3.12, A). Um die Stöchiometrie der Reaktion zu ermitteln, wurde den Mitochondriensuspensionen insgesamt 50 μM Sulfid als Substrat zugesetzt, aufgeteilt in mehrere Injektionen subinhibitorischer Konzentrationen (5-10 μM). Bei den Rattenlebermitochondrien führte die vollständige Oxidation von 50 μM Sulfid zur Akkumulation von 23,50 \pm 5,21 μM Thiosulfat, während die Sauerstoffkonzentration im Reaktionsmedium um 43,67 \pm 2,25 μM abnahm. Die Wattwurmmitochondrien produzierten 27,77 \pm 2,51 μM Thiosulfat und verbrauchten dabei 44,78 \pm 1,90 μM Sauerstoff. Sulfat wurde in keiner der Mitochondriensuspensionen bei der Sulfidoxidation gebildet.

3.2.2 SQR: Oxidation von Sulfid zu Sulfanschwefel

Der erste Schritt der mitochondrialen Sulfidoxidation wird von der membrangebundenen Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase katalysiert, die zumindest bei *A. marina* schon mehrfach untersucht wurde (Gagneur 2006, Theißen 2006). Beim Aktivitätstest der SQR wird die sulfidbedingte Reduktionsrate von decyl-Ubichinon aufgezeichnet, das als künstlicher Elektronenakzeptor das eigentliche Substrat, Coenzym Q_{10} , ersetzt. Die eukaryotische SQR benötigt außerdem einen Persulfidakzeptor, wie anhand der Originalaufzeichnung (Abb. 3.13, A) zu erkennen ist. Erst nachdem das thiophile KCN zugegeben worden war, begann die Extinktion bei 275 nm abzunehmen. Die Reaktionsgeschwindigkeit ließ sich nicht steigern, indem der Ansatz vor dem Versuch mit Stickstoff begast wurde, um eine potentielle Reoxidation des decyl-Ubichinols zu verhindern. Eine solche Reoxidation ist also offenbar auch unter den normoxischen Bedingungen auszuschließen, die standardmäßig bei dem verwendeten SQR-Aktivitätstest herrschten.

Die aus Wattwurmmitochondrien isolierten Membranen zeigten mit 100 μM Sulfid als Substrat eine SQR-Aktivität von 226,32 \pm 11,41 $\text{nmol dQ}_{red} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Tab. 3.2).

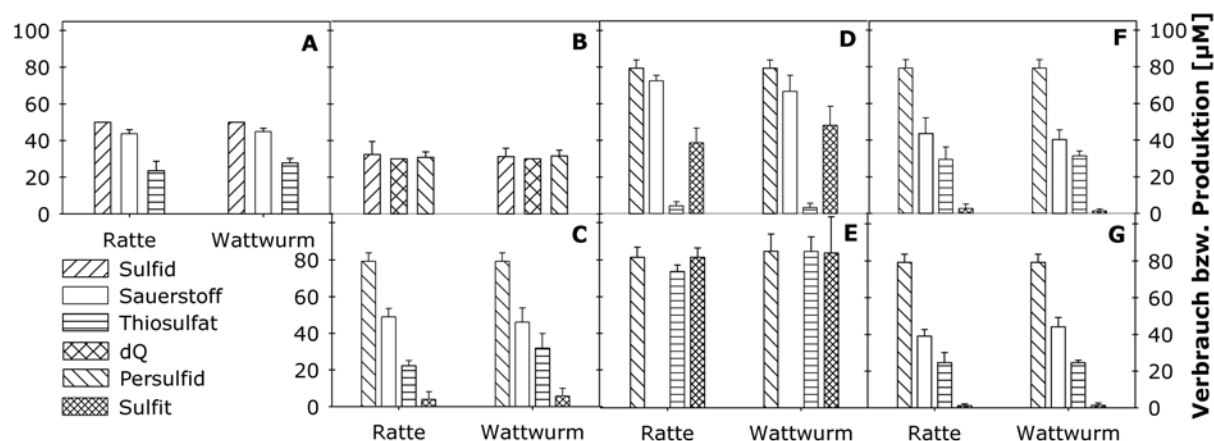


Abb. 3.12: Stöchiometrien der mitochondrialen Sulfidoxidation (A) der aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* isolierten Mitochondrien sowie der Teilreaktionen in den Mitochondrienmembranen (B) und der mitochondrialen Matrix (C-G). Aufgetragen sind jeweils die Konzentrationsabnahmen der Substrate und die Konzentrationszunahmen der Produkte [μM]. Den Mitochondriensuspensionen (A) wurde insgesamt $50 \mu\text{M}$ Sulfid als Substrat zugesetzt, aufgeteilt in mehrere Injektionen subinhibitorischer Konzentrationen ($\leq 10 \mu\text{M}$), um anschließend den Sauerstoffverbrauch und die Thiosulfatproduktion zu ermitteln. Die Konzentrationsänderungen des Produktes (Thiocyanat) und des Substrates (Sulfid) der SQR-Reaktion (B) wurden bestimmt, nachdem die Membranen nach der Zugabe von $100 \mu\text{M}$ Sulfid genau $30 \mu\text{M}$ decyl-Ubichinon reduziert hatten. Die Oxidation von ca. $80 \mu\text{M}$ Glutathionpersulfiden zu Thiosulfat und Sulfit unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff wurde in der Mitochondrienmatrix (C), mit teilweise gereinigter Schwefeldioxygenase (D) sowie mit einem Gemisch aus der teilweise gereinigten SDO und gereinigter Schwefeltransferase (F) bzw. gekaufter Rinderleberhomonase (G) untersucht. Nachdem die gereinigten Schwefeltransferasen ca. $80 \mu\text{M}$ GSSH in Anwesenheit von $200 \mu\text{M}$ Sulfit vollständig umgesetzt hatten, wurde die Konzentrationsabnahme des Sulfits und die Zunahme der Thiosulfatkonzentration bestimmt (E).

Nur knapp ein Viertel dieser Aktivität, nämlich $56,63 \pm 8,21 \text{ nmol dQ}_{red} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, war unter den gleichen Bedingungen mit den Mitochondrienmembranen aus Rattenleber nachweisbar. Dennoch verlief die Reaktion auch bei der Ratte schnell genug, um eindeutig auswertbar zu sein und blieb für einige Minuten konstant, bevor decyl-Ubichinon limitierend wurde (Abb. 3.13, B). In Vorversuchen war sichergestellt worden, dass die gewählte Sulfidkonzentration die SQR-Aktivität bei beiden Versuchstieren maximal stimulierte. Eine Hemmung war bei den Wattwurmmembranen erst mit 2 mM Sulfid feststellbar, bei den Rattenlebermembranen sank die Aktivität bereits ab $300 \mu\text{M}$ Sulfid (Abb. 3.14). Der K_m -Wert der SQR-Reaktion für Sulfid lag mit den Mitochondrienmembranen aus Rattenleber bei $2,87 \pm 0,29 \mu\text{M}$. In Anwesenheit hitzedenaturierter Enzymsuspensionen wurde decyl-Ubichinon nicht durch Sulfid reduziert.

Um das Verhältnis der Substrate und Produkte der SQR-Reaktion zu ermitteln, wurden Proben aus dem Versuchsansatz entnommen, nachdem die Extinktion um exakt $0,45$ Extinktionseinheiten abgenommen hatte, also $30 \mu\text{M}$ decyl-Ubichinon reduziert worden waren (Abb. 3.13, B). Sowohl die Ratten-SQR als auch die Wattwurm-SQR setzten dabei

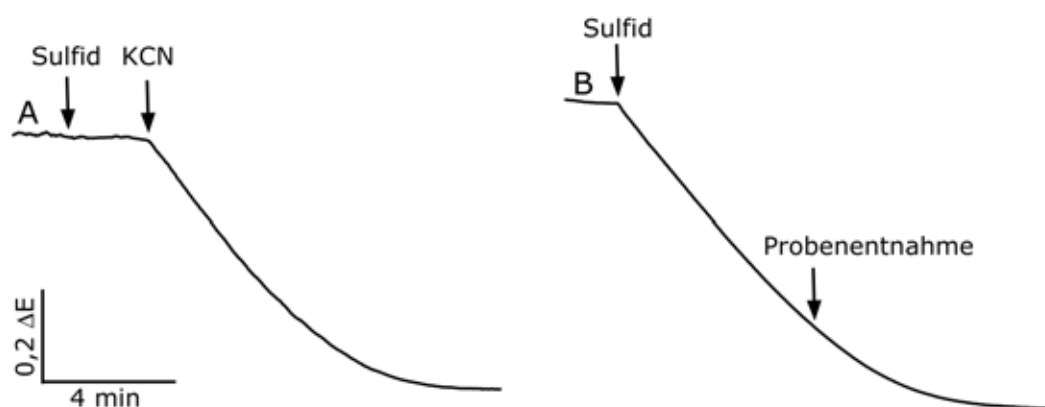


Abb. 3.13: Originalaufzeichnungen der Extinktion bei 275 nm zur Ermittlung der SQR-Aktivität mitochondrialer Membranen aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (A) und aus Rattenleber (B) anhand der enzymatischen Reduktion von decyl-Ubichinon. Die Ansätze enthielten 20 mM Tris (pH 8,0), 100 μM decyl-Ubichinon und Wattwurmmembranen mit einem Proteingehalt von 31 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ bzw. Rattenmembranen mit einem Proteingehalt von 92 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Bei Versuch A wurde zunächst als Substrat 100 μM Sulfid zugegeben und anschließend der Persulfidakzeptor KCN (2 mM). Versuch B entspricht dem Standard-Aktivitätstest für die SQR. Der Ansatz enthielt bereits 2 mM KCN und die Reaktion wurde mit 100 μM Sulfid gestartet. Der zweite Pfeil markiert den Zeitpunkt der Probenentnahme für die Bestimmung der Sulfid-, Thiocyanat-, Sulfit- und Thiosulfatkonzentration im Ansatz.

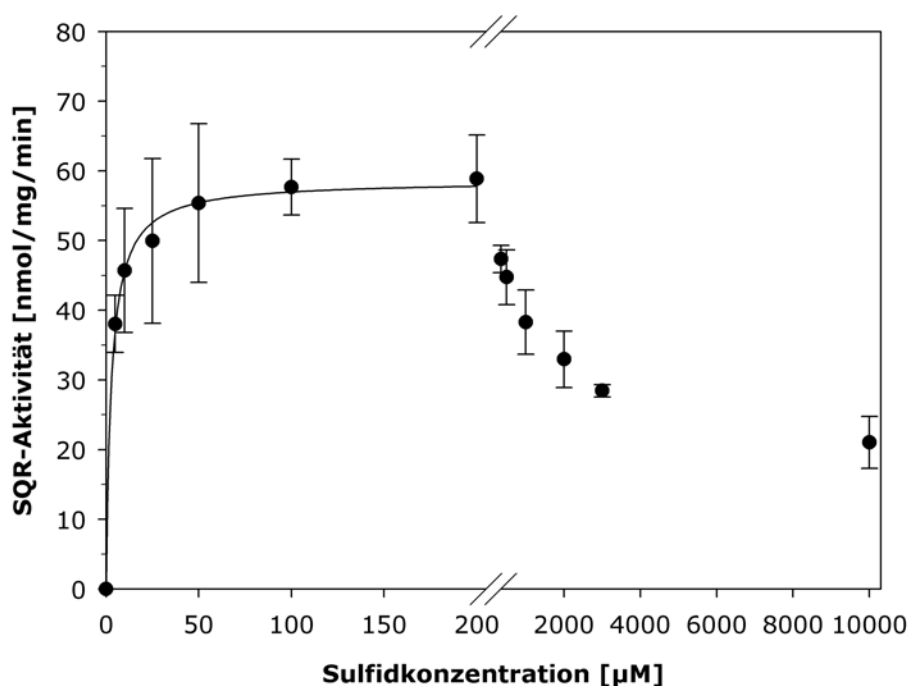


Abb. 3.14: SQR-Aktivität [nmol dQ_{red} · mg Protein⁻¹ · min⁻¹] der aus Rattenleber isolierten Mitochondrienmembranen in Abhängigkeit von der Sulfidkonzentration [μM] bei 25 °C. Die Ansätze enthielten 20 mM Tris (pH 8,0), 100 μM decyl-Ubichinon, 2 mM KCN und Mitochondrienmembranen mit einem Proteingehalt von 140 - 280 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Die Reaktion wurde durch Zugabe unterschiedlicher Sulfidkonzentrationen (5 μM bis 10 mM) gestartet. Im Bereich der niedrigen Sulfidkonzentrationen ($\leq 200 \mu\text{M}$), die noch nicht zu einer Hemmung führten, wurde der K_m -Wert der SQR-Reaktion für Sulfid mit der Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt.

Sulfid äquimolar zu cyanolysierbarem Schwefel um (Abb. 3.12, B). $32,25 \pm 7,09 \mu\text{M}$ Sulfid wurden von den Rattenlebermembranen oxidiert während $30 \mu\text{M}$ dQ reduziert wurden und $30,71 \pm 2,99 \mu\text{M}$ SCN^- entstanden. Die Wattwurmmembranen verbrauchten $31,13 \pm 4,57 \mu\text{M}$ Sulfid bei der Produktion von $31,54 \pm 3,19 \mu\text{M}$ SCN^- . Das Endprodukt der mitochondrialen Sulfidoxidation, Thiosulfat, wurde dagegen in diesem Reaktionsschritt nicht gebildet, und auch die Sulfidkonzentration war in den Proben nicht höher als in den Kontrollen.

3.2.3 Oxidation von Sulfanschwefel in der Mitochondrienmatrix

Wenn die Mitochondrien, wie oben beschrieben, in einem ersten, membrangebundenen Oxidationsschritt Sulfid zu cyanolysierbarem Schwefel der Oxidationsstufe Null umsetzen, ist für die vollständige Reaktion, die schließlich zur Produktion von Thiosulfat führt, mindestens ein weiterer Reaktionsschritt erforderlich. Dieser sollte in der Lage sein, die an der SQR gebildeten Persulfide, die im *in vitro* Assay mit CN^- zu SCN^- reagieren, zu oxidieren und miteinander zu verbinden. Tatsächlich oxidierten die Mitochondrien sowohl aus Rattenleber als auch aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* Sulfanschwefel, wenn er in Form von Glutathionpersulfiden (GSSH) zur Verfügung gestellt wurde, unter Sauerstoffverbrauch zu Thiosulfat. Eine solche Reaktion katalysiert auch die bei acidophilen Laugungsbakterien beschriebene glutathionabhängige Schwefeldioxygenase (SDO) (Rohwerder & Sand 2003). Erste Tests zeigten, dass die SDO-Aktivität sich fast ausschließlich in den Matrixfraktionen der Mitochondrien befand. Sulfid wurde dagegen von der Matrix nicht umgesetzt. Auch GSH und elementarer Schwefel erhöhten den Sauerstoffverbrauch der Matrixfraktion nicht, wenn sie einzeln in die Oxygraphenkammer injiziert wurden (Abb. 3.15). Erst nachdem die Inhalte der beiden Kammern gemischt worden waren, also GSH und Schwefel gleichzeitig als Substrat zur Verfügung standen, konnte eine Reaktion stattfinden und der Sauerstoffverbrauch stieg.

Zunächst wurden geeignete Versuchsbedingungen für einen SDO-Aktivitätstest ermittelt und entsprechende Nachweismethoden für die Substrate und Produkte der Reaktion getestet. Da die Matrixfraktionen in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) gereinigt wurden und die SDO-Aktivität darin, auf Eis gelagert, über mehrere Stunden stabil blieb, wurde dieser Puffer auch für den SDO-Aktivitätstest verwendet. Rohwerder und Sand (2003) konnten GSSH als das eigentliche Substrat der glutathionabhängigen SDO bei Bakterien identifizieren. Die Autoren zeigten, dass GSH nur die katalytische Funktion hat, den zugegebenen elementaren Schwefel in Form von Persulfiden für die Reaktion zur Verfügung zu stellen und selber dabei nicht umgesetzt wird. Die GSH-Konzentration wurde daher so gewählt, dass die maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht war (Abb. 3.16),

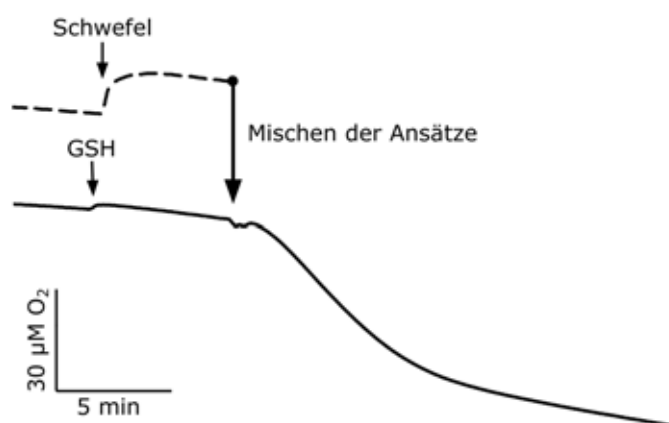


Abb. 3.15: Originalaufzeichnungen des Sauerstoffverbrauchs der Mitochondrienmatrix aus Rattenleber bei der Oxidation von Glutathionpersulfiden. Beide Kammern des Oxygraphen (obere und untere Spur) enthielten $61 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Matrixprotein in $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH } 7,4$) und waren auf $25 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert. Zu den mit Pfeilen markierten Zeitpunkten wurden in einen der Ansätze $30 \mu\text{l}$ schwefelgesättigte Acetonlösung (oben) und in den anderen 1 mM GSH (unten) injiziert. Nach etwa 5 min wurden beide Ansätze gemischt (langer Pfeil), so dass sich GSSH bilden konnte, und der Sauerstoffverbrauch wurde aufgezeichnet bis das Substrat vollständig verbraucht worden war.

es aber dennoch möglich war, Proben für die Thiolbestimmung per HPLC zu entnehmen. Da der Fluoreszenzfarbstoff Monobromobimane auch mit GSH reagiert, hätten zu hohe Konzentration die Detektion von Thiosulfat und Sulfit gestört. Mit 1 mM entsprach die GSH-Konzentration im Standard-Aktivitätstest mindestens dem dreifachen K_m -Wert, der für Rattenmatrix bei $0,31 \pm 0,03 \text{ mM}$ und für Wattwurmmatrix bei $0,22 \pm 0,03 \text{ mM}$ GSH lag.

Eine mit Schwefel gesättigte Acetonlösung wurde als Substrat verwendet, denn elementarer Schwefel ist in Wasser sehr schlecht löslich. Die Schwefellösung wurde immer auf Eis aufbewahrt, damit die Schwefelkonzentration konstant blieb und nicht durch schwankende Raumtemperaturen beeinflusst werden konnte. Mit Hilfe der kalten Cyanolyse wurde untersucht, wie hoch die Persulfidkonzentration war, die durch die Zugabe unterschiedlicher Volumina der Schwefellösung in Gegenwart von 1 mM GSH im Ansatz gebildet wurde (Abb. 3.17, A). $4,94 \mu\text{M}$ GSSH entstanden pro μl Schwefellösung in einem Gesamtvolumen von 1 ml . Für den Standard-SDO-Test wurden $30 \mu\text{l}$ Schwefellösung in 2 ml injiziert, so dass der Ansatz $79,26 \pm 4,54 \mu\text{M}$ GSSH enthielt. Um auszuschließen, dass die SDO-Aktivität durch das Lösungsmittel Aceton gehemmt werden könnte, wurde ein grobdisperses, wässriges System von Elementarschwefel als Substrat eingesetzt (s. 2.8.1.2). Da die wässrige Lösung weniger Schwefel enthielt, bildeten sich im Versuchsansatz nur $3,48 \mu\text{M}$ GSSH pro μl , so dass $46 \mu\text{l}$ eingesetzt werden mussten um etwa $80 \mu\text{M}$ GSSH zu erreichen. Die SDO-Aktivität änderte sich nicht, wenn zusätzlich $30 \mu\text{l}$ Aceton in den Ansatz pipettiert wurden. Ohne Enzym oder mit hitzedenaturierter Matrix sank der Sauerstoffgehalt im Ansatz nach der Zugabe von 1 mM GSH und $30 \mu\text{l}$ schwefelgesättigter

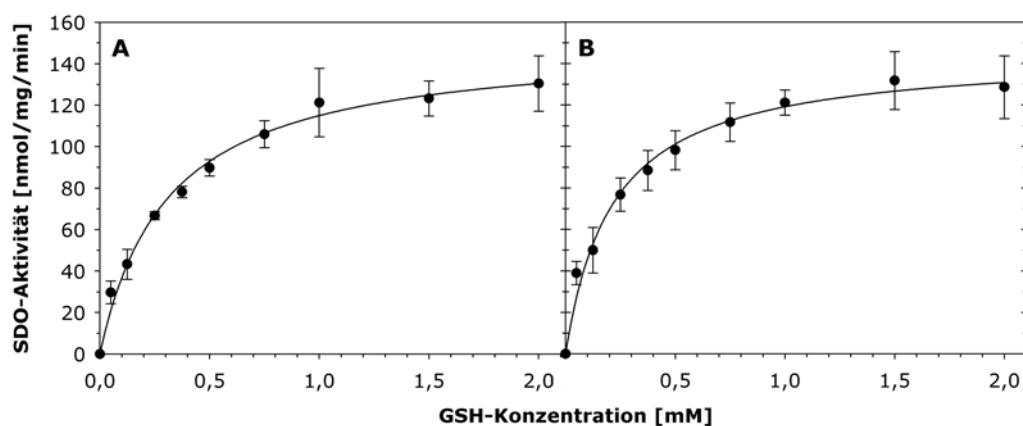


Abb. 3.16: Abhängigkeit der SDO-Aktivität [$\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] in der Mitochondrienmatrix aus Rattentleber (A) bzw. dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (B) von der Konzentration reduzierten Glutathions [mM]. Die Ansätze (2 ml) enthielten 50-150 μl Mitochondrienmatrix, 30 μl acetoneische Schwefellösung und GSH in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) bei 25 °C. Die K_m -Werte wurden nach der Michaelis-Menten-Gleichung durch nicht-lineare Regression mit dem Enzymkinetik-Modul 1.2 des Programms Sigma Plot 9.01 berechnet.

Acetonlösung um $0,95 \pm 0,46 \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Dieser Leerwert wurde bei allen Versuchen vor der Berechnung der Enzymaktivität abgezogen.

Der Verlauf der Persulfidoxidation in der Wattwurm- und Rattentlebermatrix konnte anhand des Sauerstoffverbrauchs im Oxygraphen verfolgt werden. Die bereits etablierte Methode zur Thiol-Bestimmung mittels HPLC gab Aufschluss über die Reaktionsprodukte. Um allerdings auch die Substratabnahme beobachten zu können, wurde eine Methode benötigt, die zu jedem Zeitpunkt im Reaktionsverlauf die verbleibende Konzentration der Glutathionpersulfide ermittelte. Die kalte Cyanolyse war zu diesem Zweck nicht anwendbar, da der Ansatz nicht denaturiert wurde, die SDO also während der halbstündigen Inkubation weiter Persulfide umsetzte. Als besser geeignet erwies sich der Nachweis der Persulfide anhand der Reduktion von Methylenblau (s. 2.8.2.2). Diese Reaktion wurde ursprünglich als Thiosulfatstest beschrieben (Pachmayr 1961), aber auch GSSH führt zu einer quantitativen Abnahme der Extinktion bei 670 nm (Abb. 3.17, B). Da die Thiosulfatkonzentration durch die HPLC-Proben bekannt war, konnte die Konzentration der Glutathionpersulfide nach Abzug der entsprechenden Extinktionsdifferenzen berechnet werden. Kontrollen zeigten, dass Sulfid (50 μM), Sulfit (100 μM) und Aceton nicht mit Methylenblau reagierten. Auch wenn GSH oder die schwefelgesättigte Acetonlösung einzeln eingesetzt wurden, änderte sich die Extinktion des Testansatzes bei 670 nm nicht.

Im Gegensatz zur Sulfidoxidation wurde Sulfanschwefel in den Mitochondrien der Rattentleber und des Hautmuskelschlauchs von *A. marina* etwa gleich schnell umgesetzt (Tab. 3.2). Die Matrixfraktion der Rattentleber oxidierte die zugegebenen Glutathionpersulfide mit einer Sauerstoffverbrauchsrate von $138,11 \pm 27,95 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$,

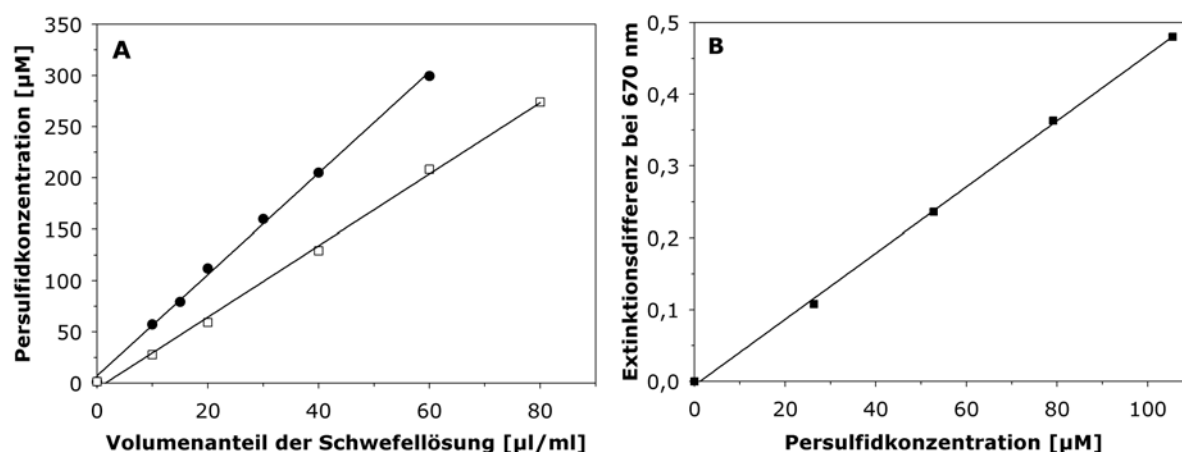


Abb. 3.17: Bestimmung der Persulfidkonzentration im Versuchsansatz durch kalte Cyanolyse (A) und anhand der Reduktion von Methylenblau (B). Abbildung A zeigt die Konzentrationen cyanolysierbaren Schwefels [μM], die nach der Zugabe unterschiedlicher Volumina einer acetonischen (schwarze Kreise) bzw. einer wässrigen (weiße Quadrate) Schwefellösung im Ansatz (0,1 M Tris (pH 9,0), 50 mM KCN, 1 mM GSH) zur Verfügung standen. Die Persulfidkonzentrationen wurden anhand der nach 30minütiger Inkubation bei Raumtemperatur gebildeten Thiocyanatkonzentration quantifiziert. Abbildung B zeigt die Kalibrierungsgerade für die Persulfidbestimmung mittels Methylenblau. Die Ansätze enthielten 0,1 M Kaliumphosphat (pH 7,4), 1 mM GSH und unterschiedliche Volumina der acetonischen Schwefellösung. Nach 5 min bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 3,75 M HCl und 28 μM Methylenblau versetzt, um nach 30 min die Extinktionen bei 670 nm zu bestimmen. Aufgetragen wurden die Extinktionsdifferenzen zu den Leerwerten, die keinen Schwefel enthielten.

während für die Wattwurmmatrix eine SDO-Aktivität von $133,16 \pm 14,19 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ ermittelt wurde. Als Hauptprodukt der Reaktion akkumulierte in beiden Fällen Thiosulfat. Der Verlauf einer vollständigen Oxidation von 80 μM GSSH in der Ratten- bzw. Wattwurmmatrix ist in Abbildung 3.18 (A und B) dargestellt. Die Matrixenzyme der Wattwurmmitochondrien produzierten Thiosulfat und verbrauchten dabei in etwa die doppelte Molekülzahl GSSH (Abb. 3.18, B). Der Sauerstoffgehalt im Medium nahm gleichzeitig von 205 auf 160 μM ab, also ebenfalls ca. halb so viel wie die Persulfidkonzentration. Durchschnittlich entstanden bei der Oxidation von $79,26 \pm 4,54 \mu\text{M}$ GSSH $31,89 \pm 7,97 \mu\text{M}$ Thiosulfat und $5,77 \pm 4,20 \mu\text{M}$ Sulfit unter Verbrauch von $43,95 \pm 6,79 \mu\text{M}$ Sauerstoff (Abb. 3.12, C). Die Sulfatkonzentration im Ansatz unterschied sich nicht von den Kontrollen. In der Matrix aus Rattenlebermitochondrien nahmen die Sauerstoff- und Persulfidkonzentrationen nach der Injektion von 30 μl Schwefellösung ebenfalls parallel ab, und Thiosulfat wurde gebildet (Abb. 3.18, A). Allerdings akkumulierten insgesamt nur $22,21 \pm 2,74 \mu\text{M}$ Thiosulfat, während der Sauerstoffverbrauch mit $48,91 \pm 4,63 \mu\text{M}$ O_2 leicht erhöht war (Abb. 3.12, C). Neben $3,97 \pm 4,20 \mu\text{M}$ Sulfit wurden außerdem $3,45 \pm 2,99 \mu\text{M}$ Sulfat produziert. In den Kontrollen mit hitzedenaturierter Matrix sank die Sauerstoffkonzentration im gleichen Zeitraum um $5,08 \pm 1,72 \mu\text{M}$, und es entstanden $2,91 \pm 2,10 \mu\text{M}$ Thiosulfat sowie $0,96 \pm 1,08 \mu\text{M}$ Sulfit. Da die Persulfide nicht verbraucht wurden, reagierten sie mit überschüssigem GSH (Rohwerder & Sand 2003),

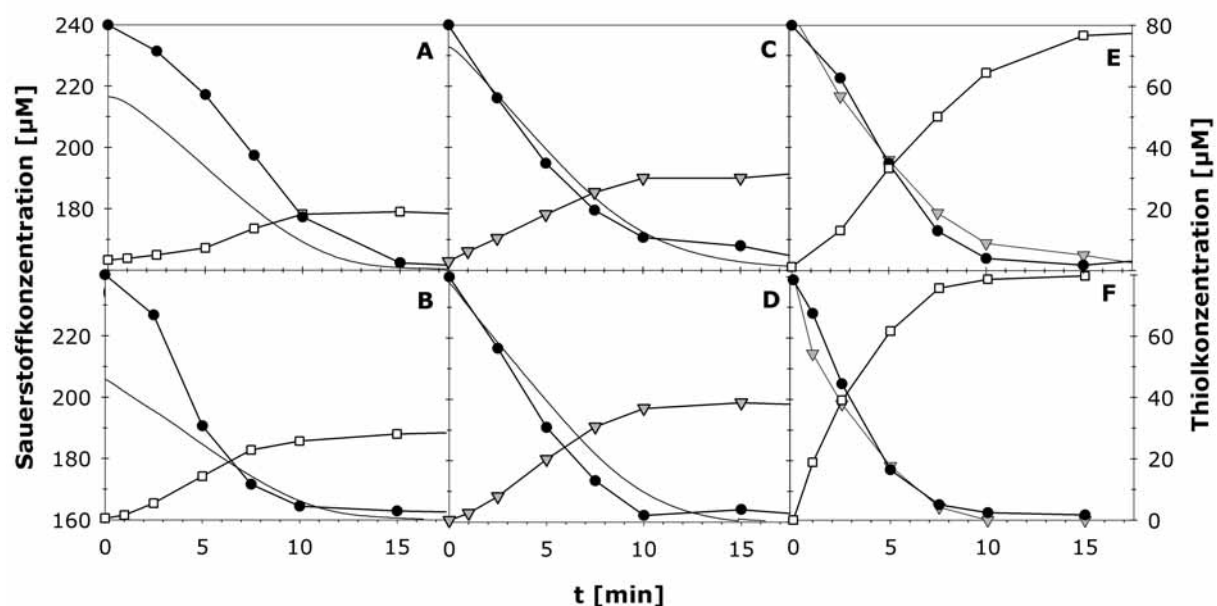


Abb. 3.18: Verlauf der Persulfidoxidation zu Thiosulfat in der Mitochondrienmatrix aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* sowie Verlauf der beiden Teilreaktionen. Die vollständige Umsetzung von $80 \mu\text{M}$ GSSH (schwarze Kreise) zu Thiosulfat (weiße Quadrate) bzw. Sulfit (graue Dreiecke) sowie der damit verbundene Sauerstoffverbrauch (schwarze Linie) wurden mit Mitochondrienmatrix (A und B) und gereinigter Schwefeldioxigenase (C und D) verfolgt. Bei der Persulfidtransferase-Reaktion (E und F) diente Sulfit neben GSSH als Substrat. Alle Versuche wurden in $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Die Ansätze enthielten außerdem $65 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Matrixprotein aus Rattenlebermitochondrien (A), $48 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ Matrixprotein aus Wattwurmmitochondrien (B), $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ teilweise gereinigte Ratten-SDO (C), $9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ teilweise gereinigte Wattwurm-SDO (D), $3 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ gereinigte Ratten-Schwefeltransferase (E) und $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ teilweise gereinigte Wattwurm-Schwefeltransferase (F).

so dass außerdem $21,87 \pm 6,43 \mu\text{M}$ Sulfid freigesetzt wurde, das in den Kontrollansätzen deutlich riechbar war.

3.2.3.1 Identifizierung der Teilreaktionen

Da die bakterielle SDO sich bei Reinigungsversuchen auf Ionentauschern als sehr instabil erwiesen hatte (Suzuki & Silver 1966), wurden die Matrixfraktionen aus Rattenleber- und Wattwurmmitochondrien zunächst einer Größenausschlusschromatographie auf einer Superdex 75 Säule (120 ml, GE Healthcare) unterzogen. Dabei konnte der $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) beibehalten werden, in dem sich die Matrixenzyme bereits befanden. Die SDO-Aktivität eluierte jeweils kurz hinter dem größten Proteinpeak nach 54 bis 60 ml (Abb. 3.19, Kreuze). Laut der Kalibrierung ($\log_{MW} [\text{kDa}] = -0,0252 \cdot \text{Elutionsvolumen} [\text{ml}] + 3,1336$; $R^2 = 0,999$) entsprach dieses Elutionsvolumen einem Molekulargewicht von etwa 46 kDa. Als Reaktionsprodukt wurde allerdings nicht Thiosulfat gebildet, sondern Sulfit akkumulierte bei der GSSH-Oxidation genau in den Fraktionen, die auch SDO-Aktivität zeigten (Abb. 3.19, schwarze Punkte mit durchgezogener Linie). Auch nach

30minütiger Inkubation stieg die Thiosulfatkonzentration in den Ansätzen nicht, während in der Matrix die Thiosulfatproduktion bereits innerhalb der ersten Minute einsetzte. Daher konnte eine nichtenymatische Reaktion, wie sie bei der bakteriellen SDO-Reaktion vorgeschlagen wurde (Suzuki & Silver 1966), nicht die Umsetzung von Sulfit zu Thiosulfat in der mitochondrialen Matrix erklären. Vielmehr wurde diese Aktivität von einem zweiten Matrixenzym katalysiert, das durch die Kombination jeder einzelnen Fraktion mit der Fraktion höchster SDO-Aktivität identifiziert werden konnte. Bei den Versuchen mit Ratten- und Wattwurmenzymen befand sich gleichermaßen der SDO-Aktivitätsspeak in Fraktion 28 (55-57 ml Elutionsvolumen). Mit 80 μM GSSH als Substrat produzierten die Versuchsansätze dieser Fraktionen etwa 25 μM Sulfit innerhalb von 30 min. In den Fraktionen ohne SDO-Aktivität bildete sich in dieser Zeit höchstens 1 μM Sulfit. Wurde nun Fraktion 28 mit dem gleichen Volumen jeweils einer anderen Fraktion gemischt, akkumulierte in den meisten Fällen unverändert etwa 25 μM Sulfit (Abb. 3.19, schwarze Punkte mit gepunkteter Linie). In einigen Ansätzen verschob sich allerdings das Verhältnis der Endprodukte, und Thiosulfat wurde vermehrt produziert (Abb. 3.19, weiße Punkte mit gepunkteter Linie), während die Sulfitkonzentration in den Ansätzen gleichzeitig abnahm. Im Gelfiltrations-Chromatogramm der Rattenlebermatrix (Abb. 3.19, A) ergab sich auf diese Weise anhand der Thiosulfatkonzentration ein zweiter Peak nach 62 bis 72 ml mit seinem Maximum in Fraktion 33 (ca. 66 ml). Die Sulfitkonzentration verhielt sich genau umgekehrt, so dass an der gleichen Stelle ein negativer Peak entstand. Wurde Wattwurmmatrix für den Lauf eingesetzt, eluierte das Thiosulfat produzierende Enzym etwas später bei 66 bis 80 ml, wobei die maximale Aktivität sich in den Fraktionen 35 und 36 (ca. 71 ml) befand (Abb. 3.19, B). Der Aktivitätsspeak fiel bei beiden Versuchstieren mit einem Proteinpeak im Chromatogramm zusammen.

Das Endprodukt Thiosulfat wurde also in der Mitochondrienmatrix von einem weiteren Enzym aus Sulfit, dem Produkt der SDO, gebildet. Sulfit alleine setzte besagtes Enzym allerdings nicht um, sondern es benötigte Persulfide als zweites Substrat, um Thiosulfat zu produzieren. Da die katalysierte Reaktion offenbar den Transfer einer Persulfidgruppe von einem Donor auf den Akzeptor Sulfit umfasst, wird die entsprechende Enzymaktivität im Folgenden als Persulfidtransferase (PT) bezeichnet. Um die PT-Aktivität nicht nur indirekt, anhand der Endprodukte der SDO-Reaktion, bestimmen zu können, wurde ein separater Aktivitätstest für die Persulfidtransferase entwickelt. Als Substrate dienten 200 μM Sulfit sowie 1 mM GSH und 15 μl pro ml Ansatz schwefelgesättigtes Aceton, woraus sich wie beim SDO-Aktivitätstest ca. 80 μM Glutathionpersulfide bildeten. Die PT-Aktivität [$\text{nmol Thiosulfat} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] wurde als Rate der Thiosulfatproduktion mit Hilfe von HPLC-Proben gemessen.

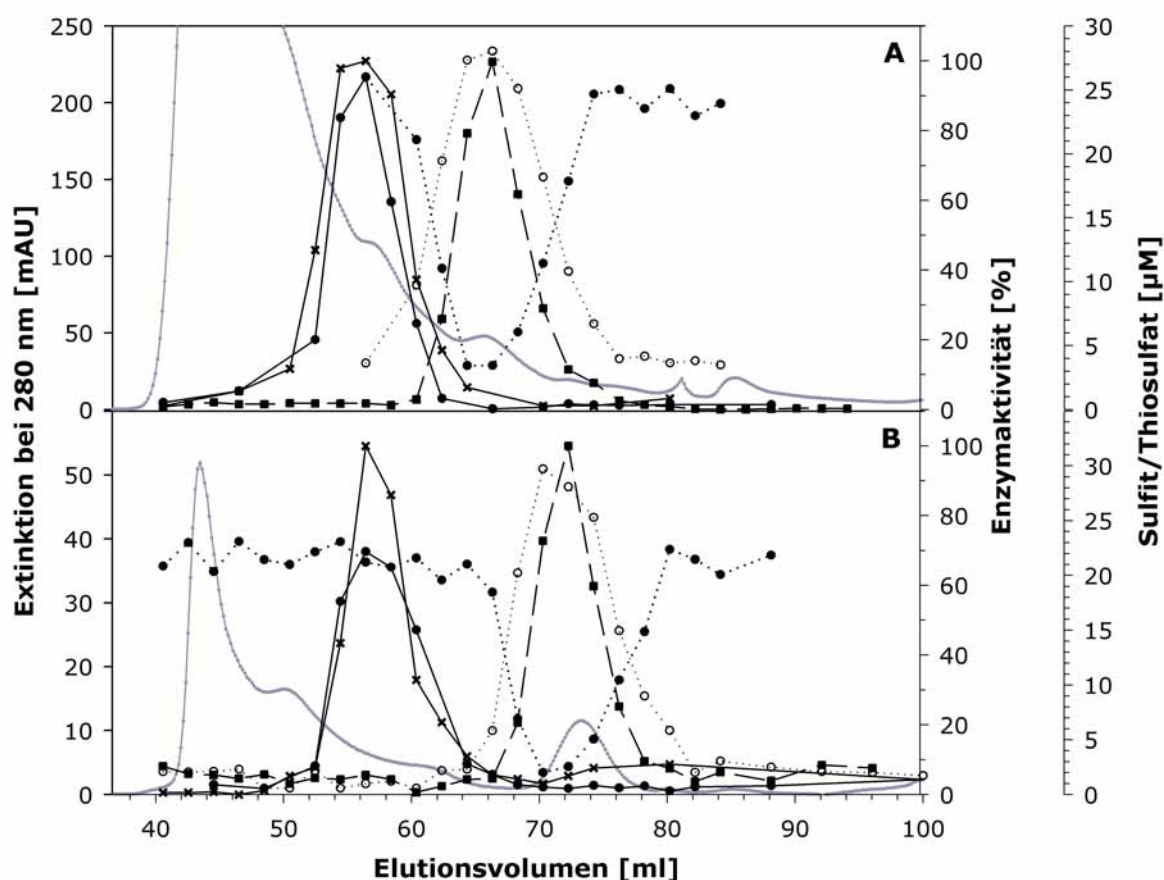


Abb. 3.19: Elutionsprofile der Größenausschlusschromatographie mit einer Superdex 75 Säule. 2 ml Mitochondrienmatrix aus Rattenleber (A) bzw. dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (B) wurden bei einer Flussrate von $0,5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ aufgetragen und in $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) eluiert. Dabei wurden 2 ml Fraktionen gesammelt und die Volumenaktivitäten [% der maximalen Aktivität] der SDO (schwarze Kreuze mit durchgezogener Linie) und der Rhodanase (schwarze Quadrate mit gestrichelter Linie) darin bestimmt. Zusätzlich wurden die Reaktionsprodukte der GSSH-Oxidation ermittelt. Dargestellt sind die Sulfitkonzentration [μM] nach der GSSH-Oxidation für jede einzelne Fraktion (schwarze Kreise mit durchgezogener Linie) sowie die Sulfit- und Thiosulfatkonzentrationen [μM], die im Ansatz akkumulierten, wenn die entsprechende Fraktion mit dem gleichen Volumen von Fraktion 28 (55,5-57,5 ml Elutionsvolumen) kombiniert wurde (schwarze bzw. weiße Punkte mit gepunkteter Linie). Die graue durchgezogene Linie gibt die Extinktion bei 280 nm an.

Schwefeltransferasen, wie z.B. die Rhodanase, katalysieren ebenfalls die Übertragung von Sulfanschwefel. Die klassische Rhodanaseaktivität entspricht allerdings eher der Rückreaktion der Persulfidtransferase, denn Thiosulfat wird neben KCN als Substrat eingesetzt und als Produkt entsteht Thiocyanat (Sörbo 1955). Um zu überprüfen, ob es sich bei den beiden Enzymaktivitäten um Reaktionen der gleichen Schwefeltransferase handeln könnte, wurden alle Fraktionen der Größenausschlusschromatographie auf ihre Rhodanaseaktivität getestet. Sowohl bei den Rattenleber- als auch bei den Wattwurmproben war die Rhodanaseaktivität ausschließlich in exakt den gleichen Fraktionen wie die PT-Aktivität nachweisbar (Abb. 3.19, schwarze Quadrate mit gestrichelter Linie). Daher wurden bei den

weiteren Reinigungs- und Charakterisierungsschritten immer beide möglichen Aktivitäten der Schwefeltransferasen betrachtet.

Nach der Gelfiltration blieb die SDO-Aktivität in den Fraktionen mehrere Stunden auf Eis stabil und ließ sich, mit 50 % Glycerin versetzt, über Wochen bei -20 °C weitgehend (> 70 %) erhalten. Wenn die Proben ohne Glycerin eingefroren wurden, verblieb nach dem Auftauen etwa 85 % der Aktivität. Die Enzyme konnten anschließend weiter gereinigt, aber nicht erneut eingefroren werden. Die Schwefeltransferasen aus Rattenleber und Wattwurmgewebe behielten in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) auf Eis mindestens eine Woche lang ihre maximale Aktivität und konnten über längere Zeiträume problemlos bei -20 °C gelagert werden.

3.2.3.2 Reinigung der Schwefeldioxygenasen und -transferasen

Im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie wurden die Schwefeldioxygenase und die Schwefeltransferase aus Rattenleber mittels Ionenaustauschchromatographie weiter gereinigt. Die drei Fraktionen mit der maximalen SDO-Aktivität wurden vereinigt, umgepuffert und auf eine Anionentauschersäule (Resource Q, GE Healthcare) mit einem Säulenvolumen von 1 ml aufgetragen. Die Proteine wurden in 20 mM Tris (pH 8,0) mit einem dreistufigen, linearen Gradienten durch steigende NaCl-Konzentrationen (0 - 300 mM) eluiert (Abb. 3.20). SDO-Aktivität ließ sich in den Fraktionen zwischen 90 und 120 mM NaCl nachweisen. Die maximale Aktivität befand sich in drei Fraktionen, also 6 ml, bei etwa 101 mM NaCl. An dieser Stelle war im Chromatogramm kein Proteinpeak erkennbar, vielmehr lag das Maximum der SDO-Aktivität genau zwischen zwei Peaks. Als zusätzliche Schwierigkeit kam hinzu, dass die SDO im Verlauf der Ionenaustauschchromatographie sehr viel Aktivität verlor. Etwa ein Viertel jeder Fraktion musste für den Aktivitätstest eingesetzt werden, um das Enzym überhaupt lokalisieren zu können. Die SDO-Aktivität in den Proben war außerdem relativ instabil und verschwand innerhalb von etwa 10 Stunden vollständig. Daher war es nicht möglich, weitere Reinigungsschritte anzuschließen. Auch wenn die Fraktionen mit der höchsten Aktivität unmittelbar nach dem Lauf erneut auf die Resource Q Säule aufgetragen wurden, war im Eluat die SDO nicht mehr nachweisbar. Um dennoch zu versuchen, das entsprechende Protein zu identifizieren, wurden die drei Fraktionen mit der maximalen SDO-Aktivität (je 2 ml) einzeln eingengt und auf ein SDS-Gel aufgetragen (Abb. 3.22, 3-5C). In jeder der Fraktionen befanden sich noch mehrere verschiedenen Proteine, so dass auf dem Gel jeweils etwa fünf bis zehn Banden erkennbar waren. Die drei Banden (mit Pfeilen markiert), die sich in allen drei Proben befanden, wurden ausgeschnitten und per Massenspektrometrie analysiert. Die Peptidsequenzen konnten eindeutig einer putativen Butyryl-CoA-Synthetase

Tab. 3.3: Reinigungsprotokolle für die Schwefeldioxygenase und die Persulfidtransferase aus Rattenleber. Aus 3,2 bzw. 2,6 g Lebergewebe wurden die Mitochondrien präpariert, um die Enzyme der Mitochondrienmatrix weiter mittels Größenausschlusschromatographie (Superdex 75) und Ionenaustauschchromatographie (Resource Q bzw. Source S) zu reinigen.

	Volumen	Protein		Aktivität			Ausbeute	Reinigungs- faktor
	<i>ml</i>	<i>mg/ml</i>	<i>mg</i>	<i>U/ml</i>	<i>U</i>	<i>U/mg</i>	%	
Schwefeldioxygenase								
Rohextrakt	196,0	2,46	482,16	0,050	9,87	0,020	100	1,0
Mitochondrien	5,0	18,77	93,85	0,735	3,67	0,039	37	2,0
Matrix	4,4	8,77	38,59	1,466	6,45	0,167	65	8,4
Gelfiltration	6,0	0,44	2,64	0,245	1,47	0,557	15	27,9
Anionentauscher	8,0	0,04	0,32	0,033	0,26	0,871	3	43,6
Persulfidtransferase								
Rohextrakt	210,0	1,72	361,20	0,033	6,95	0,019	100	1,0
Mitochondrien	4,0	18,40	73,60	1,025	4,10	0,056	59	2,9
Matrix	3,9	7,29	28,07	1,022	3,93	0,140	57	7,3
Gelfiltration	6,0	0,11	0,64	0,119	0,72	1,115	10	58,7
Kationentauscher	2,0	0,03	0,06	0,126	0,25	4,275	4	225,0

(Bande I) und der Carboxylesterase 6 (Bande II) zugeordnet werden. Die dritte ausgeschnittene Bande enthielt zwei Aminotransferasen, die Ornithin-Aminotransferase und die Kynurenin-Aminotransferase 3.

Der typische Verlauf einer Reinigung der Schwefeldioxygenase aus Rattenleber ist in Tabelle 3.3 aufgelistet. 3,2 g Lebergewebe wurden in etwa 200 ml Isolationsmedium homogenisiert und die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert. Der Rohextrakt enthielt anschließend 9,87 U SDO-Aktivität. Nach der Mitochondrienpräparation wurde die mitochondrielle Matrix isoliert, in der noch 6,45 U, also 64 % der ursprünglichen SDO-Aktivität nachweisbar waren. Die spezifische Aktivität war auf 0,167 U/mg gestiegen, was einem Reinigungsfaktor von 8,4 entspricht. 92 % der im Rohextrakt enthaltenen Proteine waren bis zu diesem Reinigungsschritt entfernt worden. Bei der Größenausschlusschromatographie blieb nur etwa ein Sechstel der SDO-Aktivität erhalten, so dass die Ausbeute bei 15 % lag. Die spezifische Aktivität stieg jedoch auf 0,557 U/mg und der Reinigungsfaktor dementsprechend auf 27,9. Als Endprodukt der SDO-Reinigung wurden im dargestellten Versuch die vier Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit der höchsten Aktivität vereinigt. Sie enthielten insgesamt 0,26 U SDO-Aktivität, also 3 % des Rohextraktes, mit einer spezifischen Aktivität von 0,871 U/mg. Im Verlauf der Reinigung waren 99,93 % der Proteine entfernt worden und es wurde letztendlich ein Reinigungsfaktor von 43,6 erreicht.

Die Schwefeltransferase aus den Rattenlebermitochondrien wurde nach der Größenausschlusschromatographie einem letzten Reinigungsschritt, der Kationenaustauschchromatographie, unterzogen. Die drei Fraktionen mit der höchsten PT-Aktivität, die auch gleich-

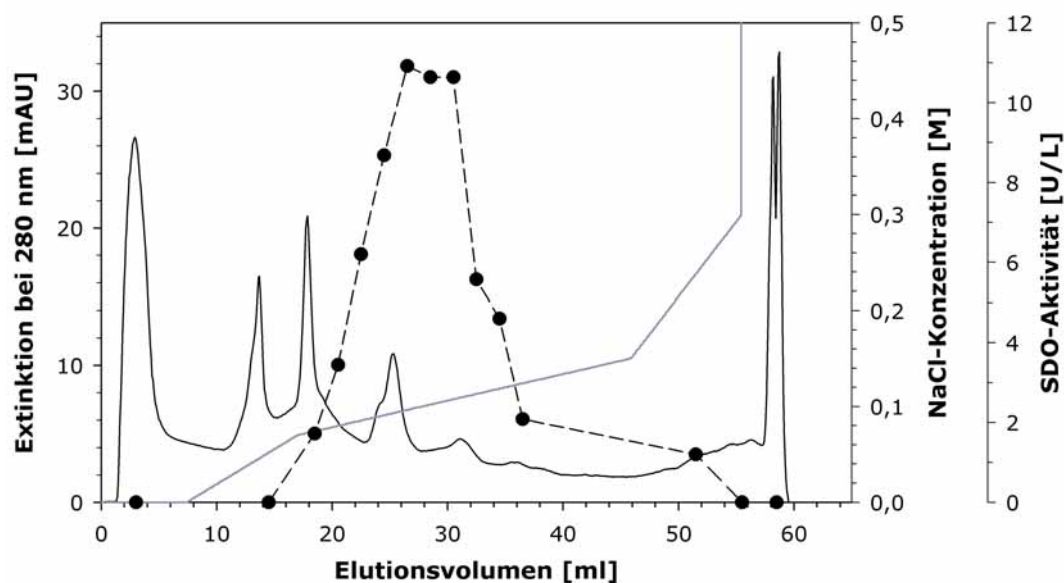


Abb. 3.20: Anionenaustauschchromatographie auf einer Resource Q Säule (1 ml) als letzter Schritt bei der Reinigung der Schwefeldioxygenase aus Rattenleber. 2 ml Probe mit einem Proteingehalt von 3,1 mg und einer SDO-Aktivität von 1,8 U wurden in 20 mM Tris (pH 8,0) bei einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten (0-300 mM) über 50 ml eluiert. Es wurden 2 ml Fraktionen gesammelt. Das Chromatogramm zeigt die Extinktion bei 280 nm (schwarze Linie), die NaCl-Konzentration im Elutionspuffer [mM] (graue Linie) und die SDO-Aktivität in den Fraktionen [U/L] (schwarze Kreise mit gestrichelter Linie) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen [ml]

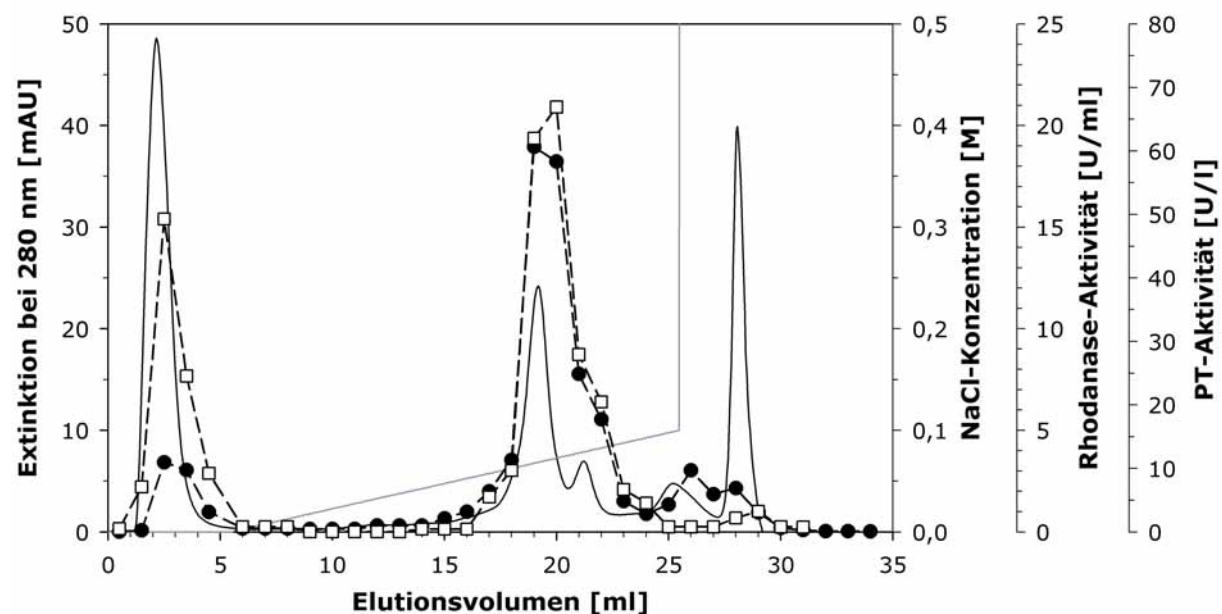


Abb. 3.21: Kationenaustauschchromatographie mittels Source S (1 ml Säule, \varnothing 0,5 cm) als letzter Reinigungsschritt der Schwefeltransferase aus Rattenleber. 1 ml Probe mit einem Proteingehalt von 0,80 mg und einer PT-Aktivität von 0,92 U sowie einer Rhodanaseaktivität von 125 U wurde in 50 mM MES (pH 6,0) bei einer Flussrate von $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ aufgetragen und mit einem NaCl-Gradienten (0-100 mM) über 20 ml eluiert. 1 ml Fraktionen wurden gesammelt und die PT-Aktivitäten [U/l] (weiße Quadrate) sowie die Rhodanaseaktivitäten [U/ml] (schwarze Kreise) darin bestimmt. Dargestellt sind außerdem die Extinktion bei 280 nm (schwarze Linie) und die NaCl-Konzentration im Elutionspuffer [mM] (graue Linie).

zeitig maximale Rhodanaseaktivität zeigten, wurden vereinigt und in 50 mM MES (pH 6,0) umgepuffert, um anschließend auf eine Source S Säule (1 ml, GE Healthcare) aufgetragen zu werden. Im linearen Gradienten von 0 bis 100 mM NaCl eluierte die Schwefeltransferase zwischen 58 und 98 mM in einem Gesamtvolumen von etwa 8 ml (Abb. 3.21). Sowohl die PT- als auch die Rhodanaseaktivität war in den beiden Fraktionen um 70 mM NaCl am höchsten, die folglich als Endprodukt vereinigt wurden. An dieser Stelle zeigte sich im Chromatogramm auch ein Proteinpeak. Unmittelbar dahinter eluierte ein weiteres Protein, das ebenfalls beide Schwefeltransferase-Aktivitäten hatte. Dieser zweite Peak war jedoch in allen Läufen deutlich kleiner als der Peak des Endproduktes, so dass eine Schulter an den Aktivitätspeaks entstand. Die Schwefeltransferase hatte zu Beginn des Laufs nicht vollständig an die Kationentauschersäule gebunden, ein Teil der Aktivität befand sich auch im Durchfluss. Alle Proben, in denen die Schwefeltransferase nachweisbar war, zeigten eine wesentlich höhere Rhodanase- als PT-Aktivität. In den Fraktionen der Gelfiltration, die auf die Source S Säule aufgetragen wurden, betrug das Verhältnis der beiden Aktivitäten etwa 150 zu 1. Auch das Endprodukt der Schwefeltransferase-Reinigung hatte 150 mal mehr Rhodanase- als PT-Aktivität, während im Durchfluss der Ionenchromatographie der Quotient der Aktivitäten mit 71 etwas niedriger war. Mittels SDS-PAGE wurde überprüft, ob die gereinigte Schwefeltransferase tatsächlich homogen war. Sowohl nach der sensitiven Coomassie-Färbung als auch nach Silberfärbung war nur eine Bande bei ca. 35 kDa erkennbar (Abb. 3.22, 8C & 8S). Diese wurde ausgeschnitten und durch Massenspektrometrie analysiert. Alle sequenzierten Peptidstücke waren Teil der bereits bekannten Sequenz der Rattenleberrhodanase (Abb. 3.23; Weiland & Dooley 1991). Somit konnte eindeutig gezeigt werden, dass die gereinigte Schwefeltransferase mit der bereits ausführlich untersuchten Rhodanase identisch ist.

Eine typische Reinigung der Persulfidtransferase aus Rattenleber umfasste wie bei der Schwefeldioxygenase fünf Schritte (Tab. 3.3). 2,6 g Lebergewebe enthielten 6,95 U PT-Aktivität mit einer spezifischen Aktivität von 0,019 U/mg. In den Mitochondrien lag die Ausbeute bei 59 % und etwa 80 % der Proteine waren entfernt worden. Im nächsten Schritt, der Matrixpräparation, erhöhte sich die spezifische Aktivität 2,5fach auf 0,140 U/mg, ohne dass dabei Enzym verloren ging. Die Matrixfraktion enthielt insgesamt 3,93 U Persulfidtransferase, die gegenüber dem Rohextrakt 7,3fach gereinigt war. Die anschließende Größenausschlusschromatographie verachtachte den Reinigungsfaktor auf 58,7, war jedoch auch mit relativ hohen Verlusten verbunden, denn die Ausbeute lag hinterher bei 10 %. Im letzten Schritt konnte die spezifische Aktivität auf 4,28 U/mg gesteigert werden. Das Endprodukt der Reinigung enthielt 0,25 U Persulfidtransferase und noch 0,02 % der ursprünglichen Proteinmenge. Insgesamt war ein Reinigungsfaktor von 225 erreicht worden.

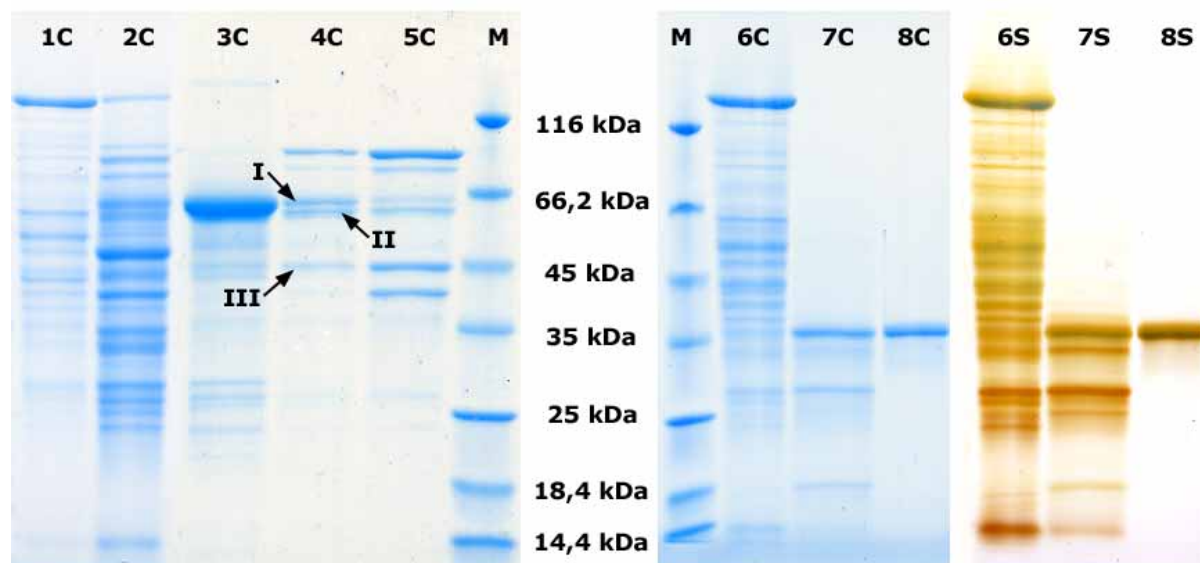


Abb. 3.22: SDS-PAGE zur Kontrolle des Reinigungsverlaufs und massenspektrometrischen Identifizierung der SDO (links) und PT (rechts) aus Rattenlebermitochondrien. Die im Gel getrennten Proteine wurden mittels Coomassie- (C) und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. M = molekularer Größenmarker, 1 und 6 = Mitochondrienmatrix, 2 = SDO nach Größenausschlusschromatographie, 3-5 = Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie mit maximaler SDO-Aktivität, die mit Pfeilen markierten Banden wurden ausgeschnitten um die Peptidsequenzen durch Massenspektrometrie zu ermitteln, 7 = PT nach Größenausschlusschromatographie, 8 = Endprodukt der PT-Reinigung nach Kationenaustauschchromatographie, die einzig sichtbare Bande wurde ebenfalls ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert.

HQVLYRALVSTK WLAESIR SGKVGPSLR VLDASWYSPGTR QARKEYQERH	50
VPGASFFDIEE CRDTTSPYEMMLPSEAHFGDYVGNLGI SNDTHVVVYDGD	100
DLGSFYAPR VWWMFRV FGHRT VSVLN GGFRNWL KEGHPVTSEPSRPEPAV	150
FKATL NRSLLK TYEQV LENL QSKRFQLVDS RAQGR YLG TQPEPDAVGLDS	200
GHIRGSVNVPF MN FLTE DGF EKSPEEL RAIFQDKKVDLSQPLIATCRKGV	250
TACHIALAAYLCGKPDVAVYDGSWSEWFRRAPPETRV SQ GKSGKA	295

Abb. 3.23: Aminosäuresequenz der Rattenleberrhodanase (Weiland & Dooley 1991). Die mittels Massenspektrometrie analysierten Peptidstücke der gereinigten Schwefeltransferase sind im Fettdruck hervorgehoben.

Tab. 3.4: Reinigungsprotokolle für die Schwefeldioxygenase und die Persulfidtransferase aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina*. Aus 20 Hautmuskelschläuchen (11,3 g Gewebe) wurden die Mitochondrien und daraus wiederum die Mitochondrienmatrix präpariert. Als letzter Reinigungsschritt erfolgte eine Größenausschlusschromatographie (Superdex 75).

	Volumen	Protein		Aktivität			Ausbeute	Reinigungs-
	ml	mg/ml	mg	U/ml	U	U/mg	%	faktor
Schwefeldioxygenase								
Rohextrakt	174,0	1,45	252,30	0,017	3,03	0,012	100	1,0
Mitochondrien	4,0	2,16	8,64	0,145	0,58	0,067	19	5,6
Matrix	3,5	0,73	2,56	0,107	0,38	0,147	13	12,3
Gelfiltration	6,0	0,04	0,25	0,034	0,21	0,860	7	71,7
Persulfidtransferase								
Rohextrakt	174,0	1,45	252,30	0,032	5,55	0,022	100	1,0
Mitochondrien	4,0	2,16	8,64	0,698	2,79	0,323	50	14,7
Matrix	3,5	0,73	2,56	0,539	1,89	0,739	34	33,6
Gelfiltration	6,0	0,03	0,20	0,268	1,78	8,921	32	405,5

Die Schwefeldioxygenase aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* erwies sich als noch empfindlicher gegenüber der Ionenaustauschchromatographie als die Rattenleber-SDO. Bei keinem der Reinigungsversuche war im Eluat SDO-Aktivität nachweisbar. Weder durch Glycerin-Zusatz ($\leq 10\%$) noch durch einen anderen pH-Wert (7,4-9,5) oder Puffer (Kaliumphosphat, Glycin) ließ sich das Enzym ausreichend stabilisieren. Auch unterschiedliche Säulenmaterialien (Fractogel-EMD-DEAE, Mono Q) brachten keinen Erfolg. Daher wurden die drei Fraktionen der Gelfiltration mit der maximalen SDO-Aktivität als teilweise gereinigtes Enzym verwendet, um die Schwefeldioxygenase des Wattwurms zu untersuchen. Diese Enzymsuspension enthielt noch einige verschiedene Proteine, wie aus dem SDS-Gel ersichtlich wird (Abb. 3.24, 2C & 2S).

Nach der Größenausschlusschromatographie lag die Schwefeltransferase aus den Wattwurmmitochondrien bereits fast homogen vor. Im SDS-Gel waren auch nach Silberfärbung nur drei Banden erkennbar (Abb. 3.24, 3S). Mit der höchsten Konzentration lag in der Lösung ein Protein mit einem Molekulargewicht von 12,6 kDa vor (unterste Bande), das massenspektrometrisch als Myoglobin identifiziert wurde. Die anderen beiden Banden, die dicht nebeneinander bei etwa 16,5 kDa lagen, konnten nicht eindeutig zugeordnet werden. Der Versuch, die Schwefeltransferase durch Ionenaustauschchromatographie vom Myoglobin und dem weiteren Protein zu trennen, scheiterte daran, dass das Säulenmaterial (sowohl Source S als auch Mono Q) durch die Probe stark beeinträchtigt wurde. Bereits während des Laufs stieg der Druck an, woraufhin die Flussrate herabgesetzt werden musste. Anschließende Reinigungsversuche verschlimmerten den Zustand der Säule, und das Material konnte nicht mehr weiter verwendet werden. Daher wurde auch die Reinigung der Schwefeltransferase des Wattwurms nach der Gelfiltration beendet, um das teilgereinigte Enzym für die weiteren Versuche einzusetzen.

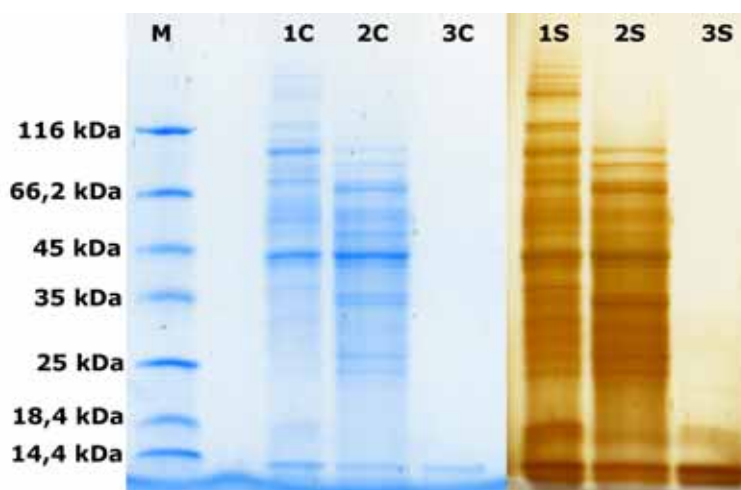


Abb. 3.24: SDS-PAGE zur Kontrolle des Reinigungsverlaufs der SDO und PT aus den Mitochondrien des Hautmuskelschlauchs von *A. marina*. Die im Gel getrennten Proteine wurden mittels Coomassie- (C) und Silberfärbung (S) sichtbar gemacht. M = molekularer Größenmarker, 1 = Mitochondrienmatrix, 2 = SDO nach Größenausschlusschromatographie, 3 = PT nach Größenausschlusschromatographie.

Bei der gleichen Enzymreinigung konnten also die Schwefeldioxygenase und die Schwefeltransferase aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* gewonnen werden. Für die als Beispiel dargestellte Reinigung (Tab. 3.4) wurden 20 Wattwürmer präpariert, so dass 11,3 g Hautmuskelschlauchgewebe zur Verfügung standen. Der Rohextrakt enthielt 3,03 U SDO- und 5,55 U PT-Aktivität. Mit nur 19 % war die Ausbeute der SDO nach der Mitochondrienpräparation sehr niedrig im Vergleich zur PT-Aktivität, die zu 50 % erhalten werden konnte. Im Überstand des entsprechenden Zentrifugationsschrittes, der die cytosolischen Bestandteile enthalten sollte, befanden sich 44 % der PT- und 55 % der ursprünglich detektierten SDO-Aktivität. Etwa ein Viertel letzterer war also an diesem Punkt der Reinigung verloren gegangen. Gleichzeitig war ein Reinigungsfaktor von 5,6 erzielt worden. Für die Schwefeltransferase war der Reinigungsfaktor wie auch die Ausbeute nach der Mitochondrienpräparation etwa 2,5mal höher und lag bei 14,7. In den nächsten beiden Schritten, der Matrixpräparation und der Größenausschlusschromatographie, konnte die spezifische Aktivität der Schwefeldioxygenase auf 0,86 U/mg erhöht werden, was einem Reinigungsfaktor von 71,7 entspricht, und das Endprodukt der Reinigung enthielt insgesamt noch 0,21 U. Die Persulfidtransferase war mit 8,92 U/mg am Ende der Reinigung 405,5fach angereichert worden bei einer Ausbeute von 32 %.

3.2.3.3 Charakterisierung der SDO und PT

Die von den Schwefeldioxygenasen aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* katalysierten Reaktionen wurden anhand der so weit wie möglich gereinigten Enzyme näher untersucht. Als Substrat dienten, wie auch bei der Charakterisierung der

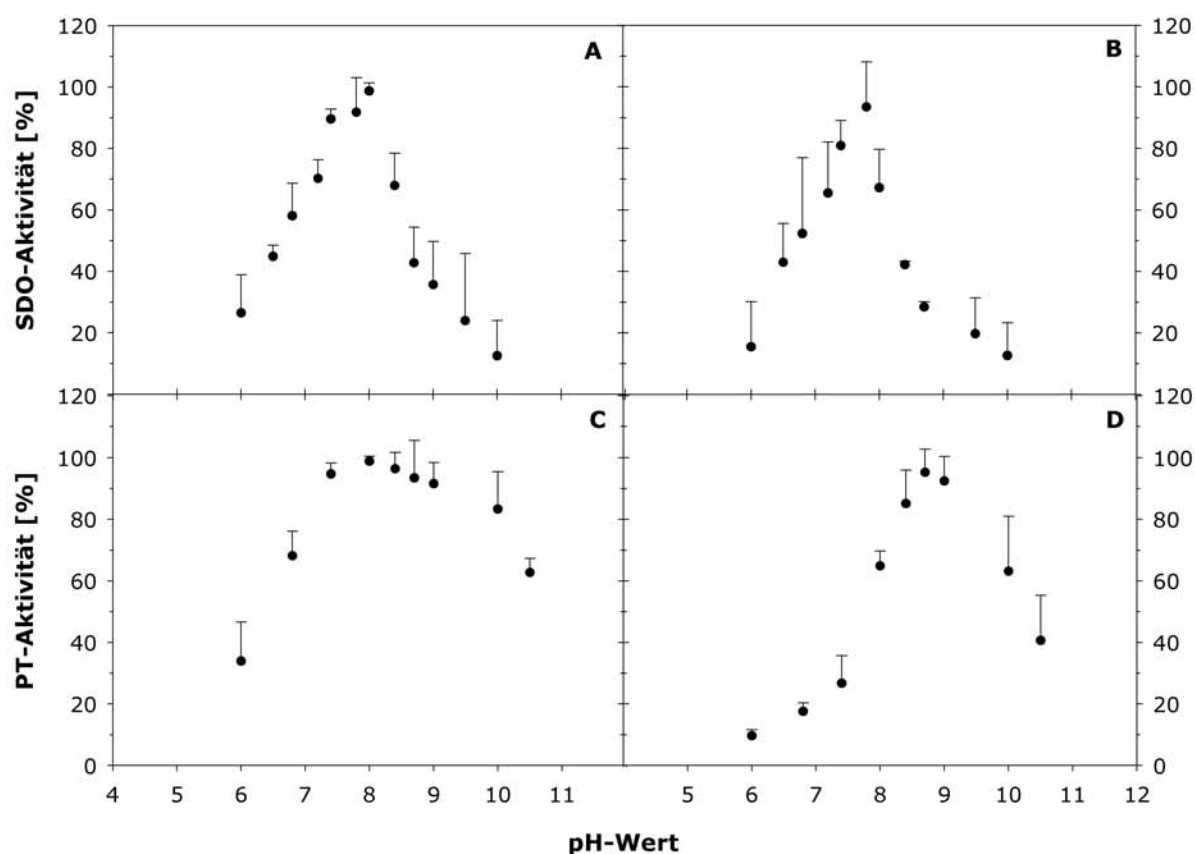


Abb. 3.25: pH-Abhängigkeit der Aktivitäten der Schwefeldioxygenasen aus Rattenleber (A) und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (B) sowie der Persulfidtransferase-Aktivität der Schwefeltransferasen aus Rattenleber (C) und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (D) bei 25 °C. Dargestellt sind die relativen Enzymaktivitäten bezogen auf die maximale Aktivität, die in der entsprechenden Versuchsreihe im pH-Optimum erreicht wurde. Die Ansätze enthielten 50 mM Puffer mit den unterschiedlichen pH-Werten (MES pH 6,0 und 6,5; Kaliumphosphat pH 6,8 und 7,4; Tris pH 7,2; 7,8; 8,0; 8,4; 8,7 und 9,0; Carbonat pH 9,5; Caps pH 10,0 und 10,5) sowie 1 mM GSH und die gereinigten oder teilweise gereinigten Enzyme. Die Reaktionen wurden durch Zugabe der Substrate ($15 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ acetonische Schwefellösung für die SDO bzw. $15 \mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ acetonische Schwefellösung und $200 \mu\text{M}$ Sulfit für die PT) gestartet.

Persulfidoxidation in der Matrix, 1 mM GSH und $30 \mu\text{l}$ schwefelgesättigte Acetonlösung in einem Gesamtvolumen von 2 ml, so dass etwa $80 \mu\text{M}$ GSSH für die Reaktion zur Verfügung stand. Sowohl die Ratten-SDO als auch die Wattwurm-SDO verbrauchte Sauerstoff und GSSH in fast äquimolarem Verhältnis (Abb. 3.18, C und D). Während der ersten 7,5 Minuten sanken die Konzentrationen beider Substrate linear, und erst nachdem nur noch weniger als $10 \mu\text{M}$ GSSH übrig war, verlangsamte sich die Reaktion. Die Sulfitkonzentration in den Ansätzen nahm solange zu, bis die Persulfide vollständig oxidiert worden waren. Dabei akkumulierte Sulfit ebenfalls in der Anfangsphase der Reaktion etwa 7,5 Minuten lang linear und erreichte schließlich $32,72 \mu\text{M}$ im Ansatz des Rattenenzym bzw. $38,92 \mu\text{M}$ mit der Wattwurm-SDO.

Insgesamt verbrauchte die aus Rattenleber isolierte Schwefeldioxygenase bei der Oxidation von $79,26 \pm 4,54 \mu\text{M}$ GSSH durchschnittlich $72,33 \pm 3,00 \mu\text{M}$ Sauerstoff und produzierte $38,51 \pm 8,05 \mu\text{M}$ Sulfit (Abb. 3.12, D). Außerdem waren im Ansatz $4,21 \pm 2,11 \mu\text{M}$ Thiosulfat und $13,18 \pm 10,15 \mu\text{M}$ Sulfat nachweisbar. Als Hauptprodukt der Reaktion der Wattwurm-SDO entstanden $48,06 \pm 10,39 \mu\text{M}$ Sulfit und die Sauerstoffkonzentration sank um $66,57 \pm 8,73 \mu\text{M}$. Sulfat wurde nicht gebildet, aber es entstanden $3,23 \pm 2,36 \mu\text{M}$ Thiosulfat. In den Kontrollansätzen, die hitzedenaturierte Enzyme enthielten, sank der Sauerstoffgehalt im gleichen Zeitraum um $6,74 \pm 3,24 \mu\text{M}$, und $1,58 \pm 0,43 \mu\text{M}$ Sulfit sowie $3,82 \pm 1,78 \mu\text{M}$ Thiosulfat akkumulierten.

Beide untersuchten Schwefeldioxygenasen katalysierten die Oxidation von Glutathionpersulfiden mit maximaler Reaktionsgeschwindigkeit bei einem neutralen bis leicht alkalischen pH-Wert (Abb. 3.25, A und B). Als pH-Optimum wurde 8,0 für die Ratten-SDO und 7,8 für das Wattwurmenzym ermittelt.

Da bei der Sulfidoxidation in den Wattwurmmitochondrien bereits die Sauerstoffaffinitäten der beiden terminalen Oxidasen der Atmungskette bestimmt worden waren (s.3.1.1.2), fehlte nun noch die SDO, um alle sauerstoffverbrauchenden Reaktionsschritte vergleichen zu können. Damit erhöhte Konzentrationen des Lösungsmittels Aceton die Reaktion nicht beeinflussen konnten, wurde der Ansatz zunächst mit Stickstoff begast, bis die Sauerstoffkonzentration auf etwa $40 \mu\text{M}$ gesunken war. Anschließend genügte die übliche Substratkonzentration, um den verbliebenen Sauerstoff vollständig zu verbrauchen, bevor GSSH limitierend werden könnte. Zur Kontrolle wurden zusätzlich Versuche mit wässriger Schwefellösung durchgeführt, die zu identischen Ergebnissen führten. Mit $14,18 \pm 3,35 \mu\text{M}$ O_2 war der für die Schwefeldioxygenase ermittelte K_m -Wert signifikant höher als die K_m -Werte der terminalen Oxidasen. Die Sauerstoffaffinität der SDO war 16mal niedriger als die des energiekonservierenden Sulfidoxidationsweges und entsprach etwa einem Drittel der für die Alternative Oxidase ermittelten Sauerstoffaffinität.

Eine mitochondrielle Schwefeltransferase katalysierte bei der Ratte und dem Wattwurm den letzten Reaktionsschritt der Thiosulfatproduktion aus Sulfid. Dieses Enzym setzte im Aktivitätstest GSSH und Sulfit äquimolar zu Thiosulfat um (Abb. 3.12, E). Dabei nahmen die GSSH- und Sulfitkonzentrationen im Versuchsansatz linear und um den gleichen Betrag ab, während Thiosulfat entsprechend akkumulierte (Abb. 3.18, E und F). So produzierte die Ratten-PT aus $82,06 \pm 5,42 \mu\text{M}$ GSSH und $81,97 \pm 5,13 \mu\text{M}$ Sulfit durchschnittlich $74,38 \pm 3,53 \mu\text{M}$ Thiosulfat. Die Persulfidtransferase aus den Wattwurmmitochondrien katalysierte die Bildung von $85,18 \pm 8,10 \mu\text{M}$ Thiosulfat aus $85,36 \pm 9,34 \mu\text{M}$ GSSH und $81,97 \pm 5,13 \mu\text{M}$ Sulfit. In den Kontrollen mit hitzedenaturierten Enzymen entstand kein Thiosulfat. Das pH-Optimum für die Persulfidtransferase-Aktivität

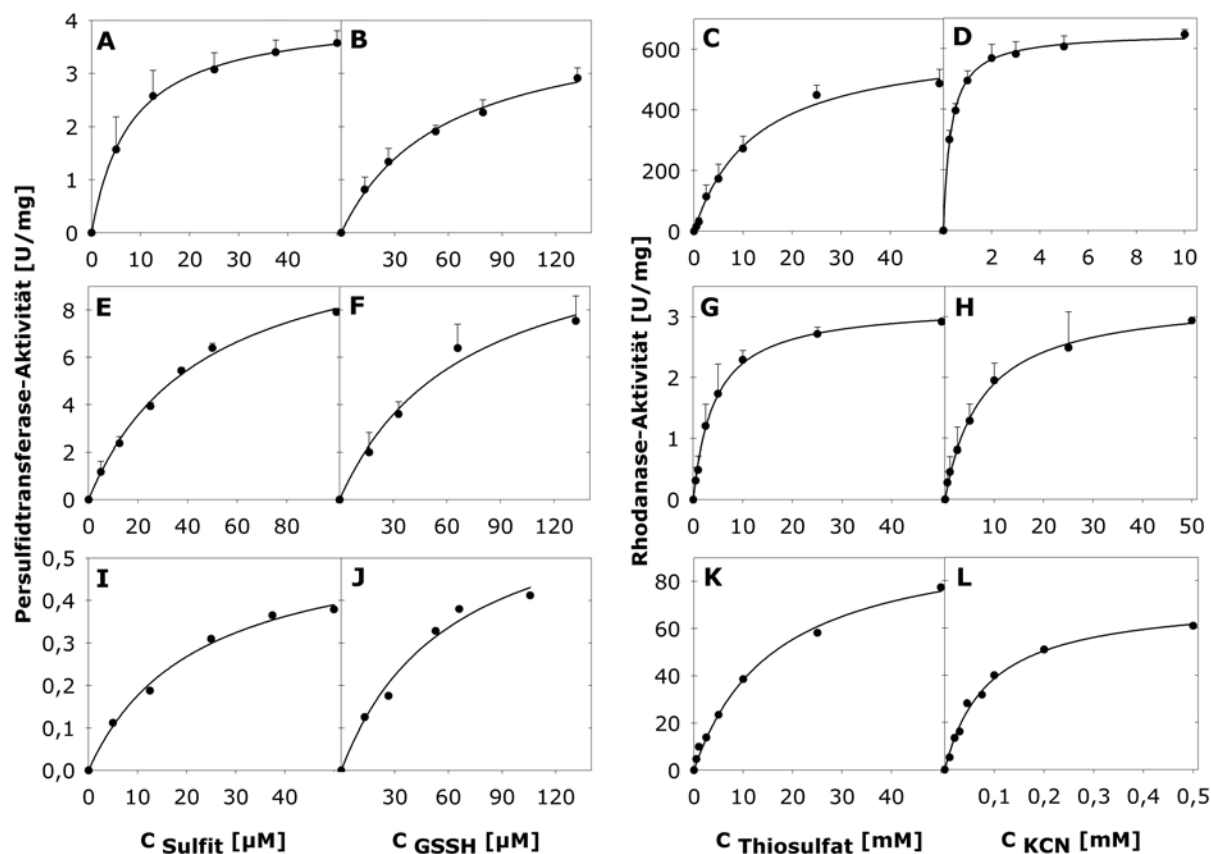


Abb. 3.26: Michaelis-Menten-Diagramme der Persulfidtransferase- und Rhodanaseaktivitäten der Schwefeltransferasen aus Rattenleber (A-D) und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* (E-H) sowie der Rinderleberrhodanase von Sigma (I-L). Die spezifischen Enzymaktivitäten [U/mg] wurden bei 25 °C jeweils in Abhängigkeit einer Substratkonzentration ermittelt, wobei die Konzentration des anderen Substrates den Standardbedingungen entsprach (80 μM GSSH und 200 μM Sulfit in 0,1 M Kaliumphosphat (pH 7,4) für die PT-Aktivität und je 50 mM KCN und Thiosulfat in 0,1 M Tris (pH 9,0) für die Rhodanaseaktivität). Dargestellt sind für die Schwefeltransferasen der Ratte und des Wattwurms Mittelwerte mit Standardabweichungen aus drei unabhängigen Enzymreinigungen. Für die Rinderleberrhodanase wurden die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit der gleichen Enzymlösung gebildet.

der Schwefeltransferase aus Wattwurmmitochondrien lag im Alkalischen bei etwa 8,7 bis 9,0 (Abb. 3.25, D). Die aus Rattenleber isolierte Schwefeltransferase erreichte in einem relativen breiten pH-Bereich von 7,4 bis 8,7 über 90 % ihrer maximalen PT-Aktivität (3.25, C).

Um besser einschätzen zu können, welche Rolle die beiden Enzymaktivitäten der Schwefeltransferase in den Mitochondrien von Säugetieren und sulfidadaptierten Invertebraten *in vivo* spielen könnten, wurden die kinetischen Parameter der PT-Reaktion und der Rhodanase-Reaktion bestimmt (Tab. 3.5, Abb. 3.26). Die aus der mitochondriellen Matrix der Rattenleber gereinigte Schwefeltransferase produzierte etwa 150mal so schnell Thiocyanat aus Cyanid und Thiosulfat, wie sie Sulfit und Glutathionpersulfide zu Thiosulfat umsetzte. Die spezifischen Aktivitäten lagen für die Rhodanase bei $615,2 \pm 106,9$ U/mg und für die Persulfidtransferase nur bei $4,15 \pm 0,52$ U/mg. Das Enzym hatte aller-

dings eine vielfach höhere Affinität zu den Substraten der PT-Reaktion. Mit $7,93 \pm 0,39 \mu\text{M}$ war der K_m -Werte für Sulfit am niedrigsten, gefolgt von GSSH mit $57,3 \pm 7,1 \mu\text{M}$ (Abb. 3.26, A und B). Damit Thiocyanat mit halbmaximaler Geschwindigkeit produziert werden konnte, musste der Persulfidakzeptor KCN in einer Konzentration von $0,31 \pm 0,02 \text{ mM}$ vorliegen, und es waren sogar $12,4 \pm 1,6 \text{ mM}$ Thiosulfat nötig (Abb. 3.26, C und D). Der K_m -Wert der Schwefeltransferase aus Rattenlebermitochondrien für Thiosulfat war also um den Faktor 1500 höher als für Sulfit.

Ähnliche Tendenzen zeigte die von der Firma Sigma vertriebene Rinderleberrhodanase. Dieses Enzym ist die bisher am häufigsten untersuchte Schwefeltransferase eines Säugertieres, so dass es interessant war, zu testen, ob auch diese Rhodanase die Bildung von Thiosulfat aus Persulfiden und Sulfit katalysierte. Nachdem die als lyophilisiertes Pulver gelieferte Rinderleberrhodanase in $0,1 \text{ M}$ Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und mittels Gelfiltration von allen weiteren Bestandteilen befreit worden war, zeigte sie eine Rhodanaseaktivität von $94,5 \pm 5,6 \text{ U/mg}$, und es war eine PT-Aktivität von $0,40 \pm 0,11 \text{ U/mg}$ nachweisbar. Der K_m -Wert für KCN lag mit $87,4 \pm 8,9 \mu\text{M}$ in der gleichen Größenordnung wie die K_m -Werte für Sulfit und GSSH ($21,8 \pm 3,6 \mu\text{M}$ bzw. $61,6 \pm 17,8 \mu\text{M}$; Abb. 3.26; L, I und J). Die Thiosulfat-Affinität der Rinderleberrhodanase war dagegen wesentlich niedriger (K_m -Wert = $16,2 \pm 2,0 \text{ mM}$; Abb. 3.26; K).

Die Schwefeltransferase aus den Mitochondrien des Hautmuskelschlauchs von *A. marina* setzte bevorzugt Sulfit und Persulfide zu Thiosulfat um. Selbst wenn die jeweiligen Substrate in sättigenden Konzentrationen vorlagen, hatte das Enzym etwa 2,6mal so viel PT- wie Rhodanaseaktivität, denn die spezifischen Aktivitäten lagen bei $8,52 \pm 1,00 \text{ U/mg}$ bzw. $3,29 \pm 0,46 \text{ U/mg}$. Die Affinität der Schwefeltransferase zu dem Persulfiddonor GSSH war wie bei den Säugerenzymen deutlich (etwa 60fach) höher als zu dem Persulfiddonor der Rhodanase-Reaktion, Thiosulfat (Abb. 3.26, F und G). Als K_m -Werte wurden $70,0 \pm 20,2 \mu\text{M}$ GSSH und $4,32 \pm 0,26 \text{ mM}$ Thiosulfat ermittelt. Ein Vergleich der beiden Persulfidakzeptoren der durch die Schwefeltransferase des Wattwurms katalysierten Reaktionen zeigte sogar noch größere Unterschiede (Abb. 3.26, E und H). Der K_m -Wert für KCN war mit $7,51 \pm 0,52 \text{ mM}$ etwa um den Faktor 100 höher als bei der Rinderleberrhodanase und entsprach daher sogar dem 160fachen des K_m -Wertes der Wattwurm-Schwefeltransferase für den zweiten Persulfidakzeptor Sulfit, der bei $46,3 \pm 5,0 \mu\text{M}$ lag.

Rinderleberrhodanase wird durch Wasserstoffperoxid inaktiviert, da der an der Katalyse beteiligte Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms oxidiert wird und mit einem weiteren Cystein ein Disulfid bildet (Costa et al. 1977). Daher wurde überprüft, ob beide Enzymaktivitäten der gereinigten Schwefeltransferasen gleichermaßen oxidationsempfindlich sind. Nach einstündiger Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ H_2O_2 war bei der Schwefeltransferase

Tab. 3.5: Persulfidtransferase- und Rhodanaseaktivitäten [U/mg] der Schwefeltransferasen aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* sowie der Rinderleberrhodanase von Sigma mit den K_m -Werten für die einzelnen Substrate. Die spezifischen Enzymaktivitäten wurden bei 25 °C bestimmt, und die Ansätze enthielten neben den Enzymsuspensionen 80 μM GSSH und 200 μM Sulfit in 0,1 M Kaliumphosphat (pH 7,4) beim Aktivitätstest für die PT bzw. je 50 mM KCN und Thiosulfat in 0,1 M Tris (pH 9,0) bei der Bestimmung der Rhodanaseaktivität. Die K_m -Werte wurden aus den in Abb. 3.26 dargestellten Michaelis-Menten-Diagrammen durch nicht-lineare Regression mit dem Enzymkinetik-Modul 1.2 des Programms Sigma Plot 9.01 berechnet.

	Persulfidtransferase-Aktivität			Rhodanaseaktivität		
	Aktivität <i>U/mg</i>	K_m SO_3^{2-} μM	K_m GSSH μM	Aktivität <i>U/mg</i>	K_m $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ <i>mM</i>	K_m KCN <i>mM</i>
Ratte	$4,15 \pm 0,52$	$7,93 \pm 0,39$	$57,3 \pm 7,1$	$615,2 \pm 106,9$	$12,4 \pm 1,6$	$0,31 \pm 0,02$
Wattwurm	$8,52 \pm 1,00$	$46,3 \pm 5,0$	$70,0 \pm 20,2$	$3,29 \pm 0,46$	$4,32 \pm 0,26$	$7,51 \pm 0,52$
Rind	$0,40 \pm 0,11$	$21,8 \pm 3,6$	$61,3 \pm 17,8$	$94,5 \pm 5,6$	$16,2 \pm 2,0$	$0,087 \pm 0,009$

aus Wattwurmmitochondrien noch $3,3 \pm 5,6$ % der PT-Aktivität und $21,6 \pm 14,6$ % der Rhodanaseaktivität nachweisbar. Bei dem Enzym aus Rattenlebermitochondrien waren beide Aktivitäten auf etwa 1 % gesunken. Die im Versuchsansatz enthaltene Katalase hatte keine Rhodanase- oder Persulfidtransferase-Aktivität und beeinflusste die Enzymaktivitäten der untersuchten Schwefeltransferasen nicht.

Weder die Aktivität der SDO noch der PT aus Rattenleber- oder Wattwurmmitochondrien wurde durch die Modulatoren der Sulfidoxidation DHA oder Glutamat beeinflusst. Ascorbat aktivierte die SDO leicht auf $126,35 \pm 4,14$ % in der Rattenlebermatrix und $125,35 \pm 10,92$ % beim Wattwurm.

Nachdem die Schwefeldioxygenasen und Schwefeltransferasen aus den Mitochondrien der Rattenleber und des Hautmuskelschlauchs von *A. marina* gereinigt und charakterisiert worden waren, musste noch überprüft werden, ob diese beiden Enzyme zusammen tatsächlich die in der Matrix beobachtete Bildung von Thiosulfat aus Persulfiden katalysieren konnten. Zu diesem Zweck wurden die gereinigten Enzyme gemischt, und die Endprodukte der vollständigen Oxidation von $79,26 \pm 4,54$ μM GSSH wurden bestimmt (Abb. 3.12, F). Wie die Matrixfraktion produzierten die Schwefeldioxygenase und die Schwefeltransferase des Wattwurms bei der Persulfidoxidation $31,33 \pm 2,64$ μM Thiosulfat und verbrauchten $40,34 \pm 5,18$ μM Sauerstoff. Sulfit, das als Endprodukt der SDO-Reaktion identifiziert worden war, ließ sich nur in sehr geringer Konzentration ($1,32 \pm 1,11$ μM) nachweisen. Die Kombination der gereinigten Schwefeldioxygenase und -transferase aus der Rattenleber führte sogar zu einem leichten Anstieg der Thiosulfatproduktion gegenüber der Matrix auf $29,44 \pm 6,82$ μM . Gleichzeitig sank der Sauerstoffverbrauch auf $43,63 \pm 8,51$ μM . Sulfit war nach Ablauf der Reaktion ebenfalls kaum vorhanden ($2,67 \pm 2,45$ μM). Die Funktion der Schwefeltransferase konnte auch durch Rinderleberrhodanase (Sigma) übernommen werden. Wenn die gereinigte Schwefeldioxygenase der Ratte oder des Wattwurms mit Rin-

derleberrhodanase im Überschuß (ca. 100 U Rhodanaseaktivität pro U SDO-Aktivität) versetzt wurde, entstand als Endprodukt der GSSH-Oxidation fast ausschließlich Thio-sulfat statt Sulfit (Abb. 3.12, G).

4 Diskussion

Die mitochondrielle Sulfidoxidation zu Thiosulfat folgt bei Säugetieren und sulfidadaptierten Invertebraten einem gemeinsamen Mechanismus. Die enzymatische Ausstattung für diesen Stoffwechselweg könnte also bereits mit dem α -Proteobakterium erworben worden sein, das durch Endosymbiose zum Mitochondrium wurde (Martin & Russel 2003). Als Teil des Gesamtstoffwechsels kann die Sulfidoxidation allerdings gewebespezifisch von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Als Anpassung an die erhöhten Sulfidkonzentrationen in seinem Lebensraum besitzt der Wattwurm darüber hinaus eine verzweigte Atmungskette, die zusätzliche Regulationsmöglichkeiten für die Sulfidoxidation bietet.

4.1 Reaktionssequenz der Sulfidoxidation

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Sulfid in den Mitochondrien der Ratteleber genauso wie in den Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* in drei Reaktionsschritten zu Thiosulfat oxidiert wird. Abbildung 4.1 veranschaulicht schematisch den postulierten Reaktionsmechanismus mit dem Zusammenspiel der drei beteiligten Enzyme. Zunächst wird Sulfid durch eine an die innere Mitochondrienmembran gebundene Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR) zu Schwefel der Oxidationsstufe Null oxidiert. Dabei werden pro Sulfidmolekül zwei Elektronen auf Ubichinon übertragen, das dann als reduziertes Ubichinol im Ubichinon-Pool zur Verfügung steht. Im weiteren Verlauf der Atmungskette können die Elektronen aus der Sulfidoxidation über die Komplexe III und IV auf Sauerstoff übertragen werden. Alternativ können aber auch andere Elektronenakzeptoren genutzt werden, die mit dem Ubichinon-Pool in Verbindung stehen. Als primäres Oxidationsprodukt entsteht wahrscheinlich ein Persulfid (R-SSH), das von einem Cysteinrest im aktiven Zentrum der SQR auf einen Akzeptor übertragen wird:



Eine Schwefeldioxygenase in der mitochondriellen Matrix oxidiert den Sulfanschwefel unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und Wasser zu Sulfit:

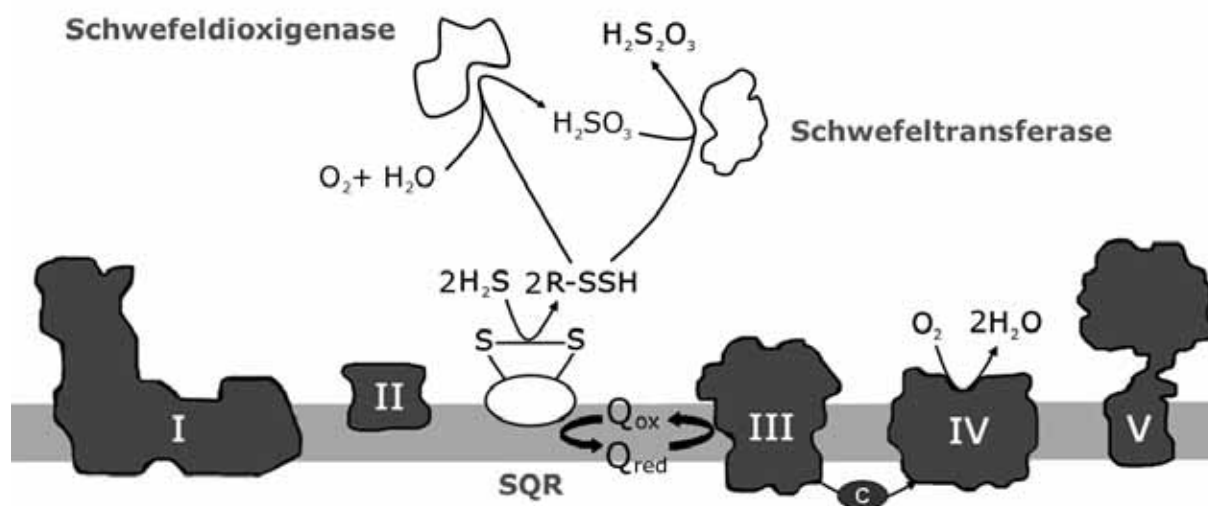
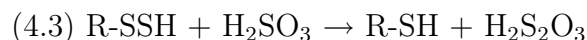


Abb. 4.1: Schema der mitochondrialen Sulfidoxidation. Die Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR) oxidiert Sulfid (H_2S) zu Persulfiden (R-SSH) und überträgt die Elektronen auf Ubichinon (Q_{ox}), das dadurch zu Ubichinol (Q_{red}) reduziert wird. Aus dem Ubichinon-Pool können die Elektronen über die Atmungskettenkomplexe III und IV auf Sauerstoff übertragen werden. Das Persulfid wird durch eine Schwefeldioxygenase in der Mitochondrienmatrix unter Verbrauch von Sauerstoff und Wasser zu Sulfit (H_2SO_3) oxidiert und reagiert anschließend katalysiert durch eine Schwefeltransferase mit einem weiteren Persulfidmolekül zu Thiosulfat ($\text{H}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

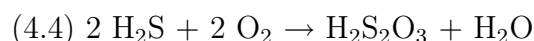


Anschließend überträgt eine Schwefeltransferase ein zweites Persulfid von der SQR auf Sulfit. Dadurch entsteht als Endprodukt der mitochondrialen Sulfidoxidation Thiosulfat:



4.1.1 Thiosulfat als Produkt der mitochondrialen Sulfidoxidation

Die isolierten Rattenleber- und Wattwurmmitochondrien oxidierten Sulfid unter Sauerstoffverbrauch vollständig zu Thiosulfat. Das beobachtete Verhältnis der Substrate und Produkte entsprach bei beiden Versuchstieren ziemlich exakt dem zu erwartenden Verhältnis von 1 : 1 : 0,5 (Tab. 4.1). Dieses Ergebnis bestätigt, dass die mitochondriale Sulfidoxidation in der Gesamtbilanz der Reaktionsgleichung



entspricht. Das Schwefelatom jedes Sulfidmoleküls wird formal von der Oxidationsstufe -II zu +II oxidiert und überträgt dabei vier Elektronen auf ein Molekül Sauerstoff, das somit reduziert wird. Thiosulfat wurde bereits bei zahlreichen Studien mit sulfidadaptierten Tieren als Hauptprodukt der Sulfidoxidation identifiziert. Die Kiemen der Muschel *Geukensia demissa* (Doeller et al. 2001) und auch die Kiemenmitochondrien von *Solemya*

Tab. 4.1: Theoretische Stöchiometrie der mitochondrialen Sulfidoxidation sowie der einzelnen Reaktionsschritte mit den jeweils umgesetzten Substraten und Produkten. RSSH = Persulfid, $Q_{ox.}$ = oxidiertes Ubichinon, $Q_{red.}$ = reduziertes Ubichinol.

	katalysierte Reaktion	Substrate	Produkte	Stöchiometrie
Mitochondrien	Sulfidoxidation	$H_2S + O_2$	$H_2S_2O_3$	1 : 1 : 0,5
Membranen	Sulfidoxidation	$H_2S + Q_{ox.}$	$RSSH + Q_{red.}$	1 : 1 : 1 : 1
Matrix	Persulfidoxidation	$RSSH + O_2$	$H_2S_2O_3$	1 : 0,5 : 0,5
Schwefeldioxygenase	Persulfidoxidation	$RSSH + O_2$	H_2SO_3	1 : 1 : 1
Schwefeltransferase	Persulfidtransfer	$H_2SO_3 + RSSH$	$H_2S_2O_3$	1 : 1 : 1

reidi (O'Brien & Vetter 1990) produzieren Thiosulfat, ebenso wie die Lebermitochondrien des Fisches *Fundulus parvipinnis* (Bagarinao & Vetter 1990) und ganze Individuen der Arten *Nereis diversicolor* und *Marenzelleria viridis* (Hahlbeck et al. 2000). Für *A. marina* wurde gezeigt, dass die Mitochondrien des Hautmuskelschlauchs Sulfid stöchiometrisch zu Thiosulfat oxidieren, und dieses auch tatsächlich als Endprodukt von sulfidinkubierten Wattwürmern ins Wasser abgegeben wird (Völkel & Grieshaber 1994, 1996, Hauschild et al. 1999). Säugetiere dagegen scheiden überwiegend Sulfat mit dem Urin aus, wenn sie mit Sulfid in sublethalen Konzentrationen konfrontiert werden (Beauchamp et al. 1984). Dennoch zeigen sich gewebsspezifische Unterschiede anhand isolierter Organe, die mit Sulfidlösungen perfundiert werden. Die Lebern und Nieren von Ratten oxidieren Sulfid schnell und ausschließlich zu Sulfat, während die Lunge wesentlich langsamer hauptsächlich Thiosulfat und nur wenig Sulfat produziert (Bartholomew et al. 1980). Wird der Blinddarm von Ratten mit gasförmigem $H_2^{35}S$ durchströmt, taucht im Blut der anliegenden Gefäße zunächst nur radioaktiv markiertes Thiosulfat auf, das aber innerhalb einer Minute im restlichen Körper verteilt und zu Sulfat umgesetzt wird (Levitt et al. 1999). Bei isolierten Rattenlebermitochondrien wurde, wie auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit, ausschließlich Thiosulfat als Sulfidoxidationsprodukt gefunden (Bartholomew et al. 1980). Nur in Gegenwart millimolarer Konzentrationen von Thiolen, z.B. GSH oder Dihydrolipoat, oxidieren die Mitochondrien Sulfid vollständig zu Sulfat, was auf eine Beteiligung der Thiosulfatreduktase hinweist. Das Reaktionsprodukt dieser Schwefeltransferase, Sulfit, wird anschließend durch die Sulfitoxidase zu Sulfat oxidiert (Koj et al. 1967). Thiosulfat wird daher als obligate Zwischenstufe der mitochondrialen Sulfidoxidation in der Rattenleber angesehen.

4.1.2 Erster Reaktionsschritt: SQR

Die aus Rattenleber isolierten Säugetiermitochondrien oxidierten Sulfid nach dem gleichen Prinzip wie die Mitochondrien des Wattwurms. Die Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase ist also offenbar keine spezielle Anpassung des sulfidadaptierten Invertebraten, sondern

gehört wahrscheinlich generell zur Enzymausstattung von Mitochondrien. Diese Vermutung legen auch SQR-ähnliche Sequenzabschnitte in den Genomen diverser Säugetiere, wie z.B. des Menschen, der Maus und des Rindes, nahe (Theißen et al. 2003). Bisher wurde jedoch nur die SQR aus *A. marina* heterolog exprimiert, so dass die Enzymaktivität des Genproduktes nachgewiesen und näher untersucht werden konnte (Theißen 2006). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass nicht nur das Gen der SQR, sondern auch die entsprechende Enzymaktivität über die sulfidadaptierten Organismen hinaus im Tierreich verbreitet ist.

Die isolierten Mitochondrienmembranen der Ratte zeigten ebenso wie die des Wattwurms *in vitro* SQR-Aktivität, sie oxidierten also enzymatisch Sulfid und reduzierten decyl-Ubichinon in äquimolare Konzentrationen (Tab. 4.1). Daraus lässt sich ableiten, dass jedes Sulfidmolekül *in vivo* zwei Elektronen in die Atmungskette abgibt, wodurch ein Molekül Ubichinon zu Ubichinol reduziert wird. Das Schwefelatom erreicht dabei die Oxidationsstufe Null, die bei Sulfanschwefel bzw. Persulfiden vorliegt. Die bakterielle SQR produziert Polysulfide, indem sie weitere Sulfidmoleküle oxidiert und an das enzymgebundene Persulfid anhängt (Griesbeck et al. 2002). Für diese Reaktion wird offenbar ein Cysteinrest benötigt, der bei der bakteriellen SQR konserviert ist, dem eukaryotischen Enzym jedoch fehlt (Theißen 2006). Im Aktivitätstest reagiert das sehr thiophile Cyanidion mit dem an der SQR gebildeten Persulfid zu Thiocyanat. Die Cyanolyse ist als Nachweis für Sulfanschwefel etabliert, da Persulfide leicht zu Thiosulfoxiden tautomerisieren und dann durch KCN nucleophil angegriffen werden (Toohey 1989). Sowohl mit Wattwurm- als auch mit Rattenmembranen war eine SQR-Aktivität ohne den künstlichen Persulfidakzeptor nicht feststellbar, und als Reaktionsprodukt wurde stöchiometrisch Thiocyanat produziert. Diese Befunde bestätigen die Vermutung, dass eukaryotische Sulfid-Chinon-Oxidoreduktasen ein thiophiles Cosubstrat oder Coenzym benötigen (Theißen 2006). Bevor ein neuer Reaktionscyclus beginnt, muss das Persulfid von der Thiolgruppe eines der beiden Cysteine im aktiven Zentrum entfernt werden, damit dieses mit dem anderen Cystein eine Disulfidbrücke bilden und dabei die Elektronen über FAD auf Ubichinon übertragen kann.

Cyanid kommt aus mehreren Gründen nicht als natürliches Cosubstrat der SQR bei der mitochondriellen Sulfidoxidation in Frage. Der K_m -Wert der heterolog exprimierten Wattwurm-SQR für KCN ist mit 2,6 mM so hoch, dass eine nennenswerte Aktivität erst mit Cyanidkonzentrationen erreicht werden könnte, bei denen die Cytochrom c Oxidase und somit die mitochondrielle Atmung bereits vollständig gehemmt wäre (Yoshikawa & Caughey 1990, Theißen 2006). Außerdem wurde bisher stets Thiosulfat und nicht Thiocyanat als Produkt der Sulfidoxidation nachgewiesen, und eine weitere Umsetzung des relativ stabilen Thiocyanats ist eher unwahrscheinlich. Stattdessen könnte beispielsweise eine Schwefeltransferase die Funktion des Persulfidakzeptors für die SQR übernehmen.

Schwefeltransferasen besitzen einen Cysteinrest im aktiven Zentrum, der dazu dient, Persulfide von einem Donor auf einen thiophilen Akzeptor zu übertragen (Westley 1973). Üblicherweise werden niedermolekulare Substanzen wie Thiosulfat und KCN als Substrate verwendet (Sörbo 1955). Mehrfach wurden aber auch Interaktionen der Rhodanase mit anderen Enzymen beschrieben. Die Schwefeltransferase liegt teilweise an die innere Mitochondrienmembran gebunden vor (Ogata & Volini 1990) und ist an der Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren beteiligt (Bonomi et al. 1977, Pagani & Galante 1983). Auch bei der hier postulierten Reaktionssequenz zur mitochondriellen Sulfidoxidation wäre es vorstellbar, dass die Schwefeltransferase, die den letzten Reaktionsschritt katalysiert und dabei ein Persulfid von der SQR auf Sulfit überträgt, direkt mit der Atmungskette interagiert. Das Enzym könnte mit der Mitochondrienmembran assoziiert sein oder einen Komplex mit der SQR bilden. Es kann sich dabei jedoch nur um eine relativ instabile Verbindung handeln, denn nach der Membranpräparation befand sich die Schwefeltransferase-Aktivität ausschließlich in der Matrixfraktion. Möglicherweise ist noch ein weiterer Persulfidüberträger an der Reaktion beteiligt. Die Dithiole Thioredoxin und Dihydrolipoat z.B. können als Persulfidakzeptor der Rhodanase fungieren und übertragen den Schwefel dabei entweder auf Eisen-Schwefel-Zentren oder setzen ihn in Form von Sulfid frei (Cerletti 1986, Nandi et al. 2000). Die heterolog exprimierte Wattwurm-SQR ließ sich auch tatsächlich durch die Zugabe von Thioredoxin und Sulfit aktivieren (Theißen 2006). Allerdings erreichte die spezifische Aktivität nur etwa 10 % der maximalen Aktivität im cyanidhaltigen Standardtest. Für die bakterielle SQR wurde außerdem eine Interaktion mit der SDO bei acidophilen Laugungsbakterien vorgeschlagen, jedoch noch nicht experimentell bestätigt (Rohwerder & Sand 2003). Weitere Versuche sind notwendig, um den tatsächlichen Persulfidakzeptor der eukaryotischen SQR zu identifizieren.

Die Leberzellen von Säugetieren werden normalerweise vorwiegend mit endogen produziertem Sulfid in mikromolaren Konzentrationen konfrontiert. In höheren Konzentrationen wirkt Sulfid dagegen schnell als Gift (Beauchamp et al. 1984). Um eine physiologische Bedeutung für den Sulfidstoffwechsel haben zu können, muss daher die SQR eine ausreichend hohe Substrataffinität besitzen. Mit den aus Rattenlebermitochondrien isolierten Membranen wurde ein K_m -Wert für Sulfid von $2,9 \mu\text{M}$ ermittelt. Die Sulfidaffinität der Ratten-SQR ist somit etwas höher als die des Wattwurmenzyms, denn isolierte Mitochondrienmembranen aus *A. marina* zeigen unter den gleichen Versuchsbedingungen einen K_m -Wert von $8,5 \mu\text{M}$ Sulfid (Gagneur 2006). Für die heterolog exprimierte Wattwurm-SQR liegt der K_m -Wert für Sulfid sogar bei $22,9 \mu\text{M}$ (Theißen 2006). Das Enzym war jedoch vor dem Versuch weitgehend gereinigt worden und befand sich daher nicht mehr in der Membran. Eventuell ändert sich in Lösung die Konformation der SQR geringfügig, und der Zugang zum aktiven Zentrum wird erschwert. Die bisher untersuchten bakteriellen

Sulfid-Chinon-Oxidoreduktasen besitzen ebenfalls vergleichbare K_m -Werte im niedrigen mikromolaren Bereich (2-26 μM Sulfid; Griesbeck et al. 2000).

Größere Unterschiede zeigten sich bezüglich der spezifischen Aktivitäten und der Substrathemmung der SQR aus Rattenleber- und Wattwurmmitochondrien. Die Mitochondrienmembranen aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* oxidierten Sulfid etwa vier mal so schnell wie die Membranen der Rattenlebermitochondrien und wurden erst ab einer Sulfidkonzentration von 2 mM gehemmt, während die Ratten-SQR nur etwa 300 μM problemlos tolerierte. Die unterschiedlichen Eigenschaften der SQR entsprechen den jeweiligen Anforderungen, die unter den Lebensbedingungen der beiden untersuchten Arten an ein sulfidoxidierendes Enzym gestellt werden. *A. marina* wird in seinem Bau regelmäßig mit Sulfid konfrontiert und ist in der Lage, höhere Konzentrationen effektiv zu entgiften, ohne dass die SQR gehemmt wird. In der Rattenleber dient Sulfid wahrscheinlich unter anderem als Signalmolekül (Fiorucci et al. 2006). Daher ist es notwendig, auch geringe Konzentrationen mit maximaler Geschwindigkeit zu oxidieren, um das Signal innerhalb kurzer Zeit beenden zu können. Der vergleichsweise niedrige K_m -Wert der Ratten-SQR für Sulfid würde eine solche Funktion ermöglichen. Im Gegensatz zum sulfidadaptierten Wattwurm überleben Säugetiere Sulfid in millimolaren Konzentrationen nicht, da spezielle Anpassungsmechanismen fehlen. Es schränkt die Funktion der SQR also nicht ein, wenn das Enzym durch 2 mM Sulfid bereits deutlich gehemmt wird, da schon bei wesentlich niedrigeren Sulfidkonzentrationen die Atmungskette vollständig blockiert ist und es aufgrund weiterer Veränderungen im Hirnstamm zum Atemstillstand kommt (Beauchamp et al. 1984).

4.1.3 Zweiter Reaktionsschritt: SDO

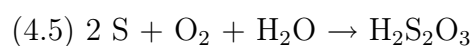
Elementarer Schwefel wird in der Matrix von Ratten- und Wattwurmmitochondrien nur in Gegenwart von reduziertem Glutathion unter Sauerstoffverbrauch zu Thiosulfat oxidiert. Diese Reaktion entspricht exakt der Enzymaktivität der GSH-abhängigen Schwefeldioxygenase, die bei acido-mesophilen Laugungsbakterien beschrieben wurde (Suzuki 1965a und b, Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968, Rohwerder & Sand 2003, 2007). Die mikrobielle Erzlaugung wird im Bergbau eingesetzt, um Kupfer, Zink, Cobalt, Nickel und Gold aus den schwerlöslichen Metallsulfiden zu gewinnen. Chemolithotrophe Laugungsbakterien oxidieren dabei elementaren Schwefel, der in Anwesenheit von dreiwertigem Eisen durch nichtenzymatische Oxidation der Metallsulfide entsteht, zu Schwefelsäure (Rawlings 2002). Der erste Schritt der Schwefeloxidation, die SDO-Reaktion, wurde bei den γ -Proteobakterien *Acidithiobacillus thiooxidans* und *Acidithiobacillus ferrooxidans* sowie dem α -Proteobakterium *Acidiphilium acidiphilum* genauer untersucht.

Erstmals wurde eine GSH-abhängige enzymatische Oxidation von elementarem Schwefel in Zellaufschlüssen von *Atb. thiooxidans* beobachtet (Suzuki & Werkman 1959). Das entsprechende Enzym wurde teilweise gereinigt und als Dioxigenase bezeichnet, denn es baut nach den bisherigen Erkenntnissen beide Atome des als Elektronenakzeptor verwendeten Sauerstoffmoleküls in das Reaktionsprodukt ein. Molekularer Sauerstoff kann nicht durch andere Elektronenakzeptoren, wie z.B. Methylenblau oder Phenazinmethosulfat, ersetzt werden, und außerdem lässt sich $^{18}\text{O}_2$ nach Ablauf der Reaktion im Oxidationsprodukt Thiosulfat nachweisen (Suzuki 1965a, Suzuki 1965b). Wie in der Mitochondrienmatrix wird in den zellfreien Bakterienextrakten bei der Schwefeloxidation Thiosulfat äquimolar zum Sauerstoffverbrauch produziert (Suzuki 1965a, Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968). Die Abnahme der Schwefelkonzentration wurde nicht berücksichtigt, da der elementare Schwefel in den Ansätzen schwer zu quantifizieren war. Die bisher beschriebenen Enzymtests verwenden ein Warburg-Respirometer und ermitteln den Sauerstoffverbrauch der Enzymsuspensionen über einen Zeitraum von mehreren Stunden. Dafür sind relativ hohe Schwefelkonzentrationen notwendig, um eine Substratsättigung über den gesamten Versuchszeitraum voraussetzen zu können. Da bei 25 °C nur 156 nM Schwefel in Wasser löslich sind, werden die Substratlösungen meistens mit Ultraschall behandelt, um eine möglichst feine Schwefelsuspension zu erzielen (Suzuki & Silver 1966, Boulegue 1978). Ohne diese Maßnahme muss die zugegebene Schwefelmenge verdreifacht werden (Suzuki 1994). Alternativ wurde auch ein wässriges System aus grobdispergiertem Schwefel vorgeschlagen, das durch Dialyse einer acetonischen Schwefellösung hergestellt wird (Rohwerder & Sand 2003). Da der Schwefel nicht vollständig gelöst vorliegt, variiert die Konzentration der jeweils zugänglichen Schwefelmoleküle in den Ansätzen leicht, und die Substratabnahme kann nicht quantifiziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurde der Sauerstoffverbrauch der Schwefeldioxigenase mittels polarographischer Sauerstoffelektroden bestimmt. Dadurch konnten auch geringe Änderungen der Sauerstoffkonzentration erfasst und kontinuierlich aufgezeichnet werden. Die Versuchsdauer verkürzte sich auf wenige Minuten, so dass eine acetonische Schwefellösung als Substrat verwendet werden konnte. Der Ansatz für den Standard-Aktivitätstest enthielt 1,5 % Aceton, wodurch die SDO-Aktivität nicht beeinflusst wurde. Da die Substratlösung auf Eis angesetzt und aufbewahrt wurde, enthielt sie immer die gleiche Schwefelkonzentration. Mit Hilfe des Methylenblau-Tests war es daraufhin möglich, die Substratabnahme bei der SDO-Reaktion zu verfolgen.

Die GSH-abhängige SDO kann elementaren Schwefel erst oxidieren, nachdem die thermodynamisch stabilen S_8 -Ringe aufgebrochen und dadurch aktiviert wurden (Rohwerder & Sand 2003). GSH greift den ringförmigen Octasulfanschwefel nucleophil an, so dass zunächst lineare Monoorganylpolysulfane (GS_nH , $n > 1$) entstehen, die jedoch in polaren Lösungsmitteln sehr instabil sind (Huxtable 1986). Durch nichtenzymatische Reaktionen

bilden sich daraus Glutathionpersulfide, die das unmittelbare Substrat der SDO in zellfreie Extrakten acido-mesophiler Laugungsbakterien darstellen (Rohwerder & Sand 2003). Die Bakterienzellen besitzen wahrscheinlich spezielle Proteine in der äußeren Zellmembran, die mit Hilfe von Cysteinresten den Schwefel in Form von Persulfiden aktivieren und ins Periplasma transportieren. Dort oxidiert die SDO den enzymgebundenen Sulfanschwefel zu Sulfit, und eine Sulfit-Cytochrom *c*-Oxidoreduktase produziert das Endprodukt Sulfat (de Jong et al. 2000, Rohwerder & Sand 2003). In den Mitochondrien der Ratte und des Wattwurms entstehen enzymgebundene Persulfide bei mehreren Stoffwechselschritten. Einerseits oxidiert die SQR Sulfid zu Sulfanschwefel (s. 4.1.2), so dass die SDO die Persulfidoxidation als zweiten Reaktionsschritt im Verlauf der mitochondrialen Sulfidoxidation katalysiert. Andererseits werden Persulfide auch beim oxidativen Abbau schwefelhaltiger Aminosäuren gebildet und könnten direkt oder durch Schwefeltransferasen auf die SDO übertragen werden. Glutathion, bzw. der Cysteinrest des persulfidübertragenden Proteins, wird im Verlauf der Schwefeloxidation nicht oxidiert, sondern hat katalytische Funktion. Für die Schwefeldioxygenasen der acid-mesophilen Laugungsbakterien wurden K_m -Werte für GSH zwischen 120 und 240 μM ermittelt (Rohwerder & Sand 2003). Bei niedrigen mikromolaren GSH-Konzentrationen steigt die Reaktionsgeschwindigkeit der SDO daher proportional zur GSH-Konzentration. Die enzymatische Schwefeloxidation in der Mitochondrienmatrix war in ganz ähnlicher Weise glutathionabhängig. Die K_m -Werte lagen mit 312 μM für die Rattenmatrix und 217 μM für die Wattwurmmatrix nur leicht über denen der Bakteriensuspensionen. Wenn der Versuchsansatz GSH im Überschuss enthält und die gebildeten Persulfide nicht unmittelbar enzymatisch oxidiert werden, reagieren zwei Moleküle GSSH miteinander, so dass GSSSG und Sulfid entstehen (Rohwerder & Sand 2003). Diese Reaktion fand in den Kontrollen mit hitzedenaturierter Matrix oder SDO statt, denn die HPLC-Proben zur Bestimmung der Reaktionsprodukte zeigten deutliche Sulfid-Peaks. Dennoch konnte Sulfid als Substrat der SDO ausgeschlossen werden, da die Mitochondrienmatrix weder Sauerstoff verbrauchte noch Thiosulfat produzierte, wenn der elementare Schwefel im Aktivitätstest für die SDO durch Sulfid ersetzt wurde. Auch die bisher untersuchten Laugungsbakterien können Sulfid nicht ohne membrangebundene Enzyme oxidieren (Rohwerder & Sand 2003).

Für die Persulfidoxidation in der mitochondrialen Matrix wurde in der vorliegenden Arbeit ein Verhältnis von ungefähr 2 Molekülen GSSH pro Molekül Thiosulfat bzw. Sauerstoff ermittelt, das gut mit dem für die Gesamtreaktion der bakteriellen SDO vorgeschlagenen Reaktionsschema übereinstimmt:



(Suzuki 1965a; Tab. 4.1). Zwei Schwefelatome der Oxidationsstufe Null geben insgesamt vier Elektronen an ein Molekül elementaren Sauerstoff ab und werden dabei zu Thiosulfat oxidiert. Das unmittelbare Produkt der Persulfidoxidation ist jedoch bei der prokaryotischen genauso wie bei der hier untersuchten eukaryotischen SDO Sulfit. Da auch die Ansätze der teilweise gereinigten SDO aus *Acidithiobacillus* spec. Thiosulfat produzierten, und nur durch Zugabe von Formaldehyd das primäre Reaktionsprodukt Sulfit abgefangen werden konnte, schlossen die Autoren, dass es sich bei der Thiosulfatbildung um eine nichtenzymatische Reaktion handeln muss (Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968). Aus der mitochondriellen Matrix der Ratte und des Wattwurms konnte jedoch eine Schwefeldioxygenase gereinigt werden, die Sulfit produzierte, obwohl sie ebenfalls noch nicht homogen vorlag. Thiosulfat war in den entsprechenden Ansätzen der Enzymtests auch nach 30minütiger Inkubation nicht nachweisbar. Eine nichtenzymatische Oxidation von Sulfit zu Thiosulfat kann also unter den Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden. Ein weiteres Enzym, das als Schwefeltransferase identifiziert wurde, war vielmehr erforderlich, um in den Mitochondrien Sulfit und Persulfide zu Thiosulfat umzusetzen. Verschiedene Erklärungen für diesen Unterschied zwischen der bakteriellen und der mitochondriellen SDO wären denkbar. In den Enzympräparationen der bakteriellen SDO könnten Metallionen oder andere chemische Verbindungen enthalten gewesen sein, die katalytisch wirken. Möglicherweise bildet auch eine Schwefeltransferase einen relativ stabilen Komplex mit der bakteriellen SDO, der im Verlauf der Reinigung bestehen bleibt, oder die beiden Enzyme haben so ähnliche Eigenschaften, dass sie parallel gereinigt wurden. In intakten Bakterienzellen und Rohextrakten von *Atb. ferrooxidans* und *Atb. thiooxidans* wurde Schwefeltransferase-Aktivität nachgewiesen (Gardner & Rawlings 2000), und in *Atb. ferrooxidans* wird eine periplasmatische Schwefeltransferase verstärkt exprimiert, wenn die Bakterien auf schwefelhaltigen Substraten wachsen (Ramirez et al. 2002). Welche Funktion diese Enzym für den Schwefelstoffwechsel der Laugungsbakterien hat, ist noch nicht bekannt, so dass eine Rolle bei der Persulfidoxidation ähnlich wie in der Mitochondrienmatrix durchaus möglich wäre. Obwohl sie scheinbar die gleiche Reaktion katalysiert, könnte die prokaryotische SDO außerdem eine ganz andere Struktur besitzen als das Persulfidoxidierende Enzym in den Mitochondrien und in einem weiteren katalytischen Zentrum den Schwefeltransfer auf das Zwischenprodukt Sulfit katalysieren.

Um den Reaktionsmechanismus der Schwefeldioxygenase aufklären zu können ist es notwendig, das Enzym zu reinigen. Da das Rattengenom bereits vollständig sequenziert ist, würde zusätzlich die Möglichkeit bestehen, anhand einiger Peptidsequenzen der aus Rattenlebermitochondrien gereinigten SDO die gesamte Nukleotidsequenz des Enzyms zu identifizieren. Es ist im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht gelungen, die SDO der Ratte oder des Wattwurms bis zur vollständigen Homogenität zu reinigen, denn die bei-

den Enzyme verlieren sehr schnell ihre Aktivität, nachdem sie an Ionentauscher gebunden haben. Daher lag die Ausbeute am Ende der Reinigungen nur bei etwa 5 % und im Gel waren trotzdem noch mehrere Proteinbanden erkennbar. Im Fall der Ratten-SDO wurden alle sichtbaren Banden, die in jeder der Fraktionen mit maximaler Aktivität vorhanden waren, ausgeschnitten und sequenziert. Da es sich jedoch bei diesen Proteinen um bereits bekannte mitochondrielle Enzyme handelte, ist die SDO offenbar in einer so niedrigen Konzentration im Endprodukt der Reinigung vorhanden, dass die Bande im Gel nicht zu erkennen war. Auch die prokaryotischen Schwefeldioxygenasen konnten bisher nicht vollständig gereinigt werden und bereiteten sehr ähnliche Probleme wie die mitochondriellen Enzyme. Suzuki und Silver (1966) steigerten durch Ethanol-fällung und anschließende Anionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Cellulose die spezifische Aktivität der SDO aus *Atb. thioparus* von 2,1 auf 254,8 nmol Thiosulfat · mg Protein⁻¹ · min⁻¹. Anschließend konnte das Enzym jedoch nicht mehr eingefroren gelagert werden und verlor auf Eis über Nacht etwa die Hälfte seiner Aktivität. Suzuki (1994) beschreibt eine SDO-Reinigung aus *Atb. thiooxidans*, bei der die Enzymsuspension abwechselnd jeweils zwei Mal einer Größenausschlusschromatographie auf einer Sephadex 100 Säule und der Anionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Cellulose unterzogen wurde. Dadurch wurden etwa 10 % der SDO-Aktivität erhalten, und der Reinigungsfaktor war mit 26,5 etwas niedriger als bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten SDO-Reinigungen. Die hohen Aktivitätsverluste auf Ionentauschern könnten darauf hindeuten, dass eine prosthetische Gruppe oder ein Metallion im aktiven Zentrum des Enzyms entfernt wurde. Laut spektroskopischer Studien enthält die bakterielle SDO weder Flavine noch Cytochrome. In Proben der teilweise gereinigten SDO aus *Atb. thioparus* wurde jedoch Eisen nachgewiesen (Suzuki & Silver 1966). Die SDO könnte also zur Gruppe der Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen gehören und das katalytisch notwendige Eisenatom bei der Ionenaustauschchromatographie verlieren.

Anhand der teilweise gereinigten eukaryotischen SDO konnte das bereits für die bakterielle SDO vorgeschlagene Reaktionsschema bestätigt werden (Gl. 4.2, Suzuki & Silver 1966). Das Enzym verbrauchte Sauerstoff bei der Oxidation von Glutathionpersulfiden und produzierte dabei hauptsächlich Sulfit. Theoretisch müssten alle Substrate und Produkte in äquimolarem Verhältnis umgesetzt werden (Tab. 4.1), denn jedes Persulfidmolekül gibt bei der Oxidation zu Sulfit vier Elektronen ab, mit denen ein Molekül elementarer Sauerstoff reduziert werden kann. Zusätzlich wird noch ein Wassermolekül für die Sulfitproduktion benötigt, das die Hydroxylgruppe und das Proton bereitstellt. Der durchschnittliche Sauerstoffverbrauch der Ratten- und Wattwurm-SDO bei der Oxidation von 80 μM GSSH entsprach mit 72,3 bzw. 66,6 μM fast den Erwartungen. Es war jedoch deutlich weniger Sulfit, nämlich nur 38,5 bzw. 48,1 μM im Ansatz nachweisbar. Da in der Matrix bei der

Persulfidoxidation ausschließlich Thiosulfat gebildet wurde, ist offenbar die Persulfidtransferase normalerweise in ausreichend hoher Konzentration vorhanden, um das produzierte Sulfid sofort weiter umzusetzen und eine Akkumulation zu verhindern. Diese Maßnahme ist durchaus sinnvoll, denn Sulfid wirkt cytotoxisch und löst durch seine hohe Reaktivität oxidativen Stress aus (Yang 1970, Gunnison 1981, Vincent et al. 2004). Das Blutplasma gesunder Menschen enthält daher nur etwa $1,5 \mu\text{M}$ Sulfid (Kajiyama et al. 2000). Genetisch bedingte Störungen der Sulfidoxidation führen zum Tod der Patienten innerhalb der ersten Lebensjahre (Woo et al. 2003). Eine Produkthemmung der SDO würde verhindern, dass Sulfid produziert wird, wenn die weitere Umsetzung blockiert ist, und die Reaktion könnte erst fortgesetzt werden, wenn Sulfid wieder aus dem Gleichgewicht entzogen wird. Diese Vermutung wird durch den Reaktionsverlauf der gereinigten SDO gestützt. Nach einer kurzen Anfangsphase mit konstantem Sauerstoffverbrauch nahm die SDO-Aktivität kontinuierlich ab, während in der Matrix die Reaktion erst unmittelbar bevor das Substrat verbraucht war langsamer wurde. Da die gereinigte SDO mehr Sauerstoff verbrauchte als Sulfid produzierte, ist diese Erklärungsmöglichkeit alleine nicht ausreichend. Vermutlich reagierte ein Teil des gebildeten Sulfids nichtenzymatisch zu anderen Verbindungen. Sulfid wird in Gegenwart von Sauerstoff schnell chemisch zu Sulfat oxidiert (McCord & Fridovich 1969, Yang 1970), das aber nur in geringen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte. Als Nukleophil reagiert Sulfid auch mit elementarem Schwefel zu Polysulfanmonosulfonsäuren (Pronk et al. 1990). Außerdem könnte Sulfid mit Cysteinresten der im Ansatz vorhandenen Proteine Sulfonate gebildet haben (Berni et al. 1991).

Das pH-Optimum der SDO aus den Mitochondrien der Rattenleber und des Hautmuskelschlauchs von *A. marina* lag im leicht alkalischen Bereich bei pH 7,8 bis 8,0. Durch den nach innen gerichteten Protonengradienten, der durch die Atmungskette über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut wird, ist der pH-Wert der Matrix generell etwas höher als der des Cytosols (Llopis et al. 1998). Das ermittelte pH-Optimum bekräftigt also die Vermutung, dass die SDO in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist, denn nur dort kann das Enzym mit maximaler Aktivität wirken. Die SQR des Wattwurms, die wahrscheinlich auf der Matrixseite an die innere Mitochondrienmembran gebunden ist, zeigt die höchste Aktivität ebenfalls im Alkalischen bei pH 9,0 (Gagneur 2006, Theißen 2006). Die postulierte Anordnung der beiden Enzyme, die aufeinander folgende Reaktionsschritte bei der mitochondrialen Sulfidoxidation katalysieren, würde eine direkte Interaktion ohne die Beteiligung weiterer Transportproteine erlauben. Für die prokaryotischen Schwefeldioxygenasen wurden pH-Optima zwischen 7,5 und 8,0 ermittelt (Suzuki 1965a, Suzuki & Silver 1966, Silver & Lundgren 1968). Überraschenderweise sind diese Werte dem pH-Optimum der mitochondrialen SDO sehr ähnlich, obwohl die Schwefeloxidation bei den acidophilen Proteobakterien im eher sauren Periplasma vermutet wird (Rohwerder & Sand 2003).

Über den Mechanismus der SDO ist noch nichts bekannt. Wenn dieses Enzym tatsächlich zu den Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen gehört, könnte es der bereits besser untersuchten Cystein-Dioxygenase (CDO) ähneln. Die CDO ist ein 23 kDa großes cytosolisches Enzym, das ausschließlich L-Cystein als Substrat nutzt und zu Cysteinsulfinat oxidiert. Wie vermutlich auch die SDO, katalysiert die CDO die Oxidation eines Sulfhydryls und überträgt dabei beide Atome eines Sauerstoffmoleküls auf das Schwefelatom (Chai et al. 2006). Der Sauerstoff wird durch ein Eisenion aktiviert, das im aktiven Zentrum des Enzyms mit drei Histidinresten koordiniert ist (Simmons et al. 2006). Die Bindung des Eisens ist relativ instabil, so dass etwa 90 % bei der Reinigung entfernt werden (Chai et al. 2005). Eine ähnliche Enzymstruktur würde auch die Schwierigkeiten bei der Reinigung der SDO aus den Laugungsbakterien und der mitochondrialen Matrix erklären. Die Aktivität der Rattenleber- und Wattwurm-SDO ließ sich durch Ascorbat um etwa 25 % steigern. Diese Aktivierung durch Vitamin C könnte ebenfalls auf eine Ähnlichkeit zu anderen Dioxygenasen hindeuten. In Pflanzen dient Ascorbat als Kofaktor von Nicht-Häm-Eisen-Dioxygenasen und α -Ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen (Prescott & John 1996). Ein bekanntes Beispiel bei Säugetieren ist die Collagen-Hydroxylierung, denn die beteiligten Dioxygenasen Prolyl-4-Hydroxylase, Prolyl-3-Hydroxylase und Lysyl-Hydroxylase müssen durch Vitamin C regeneriert werden, um ihre Aktivität zu behalten (Griffiths & Lunec 2001). Dabei wird das Eisenatom im aktiven Zentrum der Enzyme von Fe^{3+} nach Fe^{2+} reduziert.

4.1.4 Dritter Reaktionsschritt: Schwefeltransferase

Eine Schwefeltransferase katalysiert den letzten Reaktionsschritt bei der Oxidation von Sulfid zu Thiosulfat in den Mitochondrien der Rattenleber genauso wie im Hautmuskelschlauch von *A. marina*. Der Sulfanschwefel eines Persulfids wird auf Sulfit, das Produkt der SDO, übertragen, so dass Thiosulfat entsteht (s. Gleichung 4.3). In den Mitochondrien kann z.B. die SQR ein Persulfid für diese Reaktion bereitstellen, das bei der Sulfidoxidation an einem Cysteinrest im aktiven Zentrum des Enzyms gebildet wird (Abb. 4.1, s. Abschnitt 4.1.2). So ergeben die Reaktionsgleichungen der drei Einzelschritte (Gleichungen 4.1 bis 4.3) in der Summe die bereits mehrfach experimentell bestätigte Gesamtbilanz der mitochondrialen Sulfidoxidation (Gleichung 4.4).

4.1.4.1 Identifizierung der Persulfidtransferase

Aus den Matrixfraktionen der Ratten- und Wattwurmmitochondrien wurden die Enzyme gereinigt, die erforderlich sind, um bei der Persulfidoxidation durch die SDO Thiosulfat

statt Sulfit zu erhalten. Da nach jedem Reinigungsschritt die einzelnen Proben auf diese Funktion hin untersucht wurden, war sichergestellt, dass tatsächlich der Interaktionspartner der SDO isoliert wurde und nicht ein anderes Enzym mit vielleicht ähnlichen Eigenschaften. Das einzige Enzym, das in der Rattenlebermatrix diese Reaktion katalysiert, konnte bis zur Homogenität gereinigt werden. Mittels massenspektrometrischer Sequenzierung ließ sich das Thiosulfat-produzierende Enzym der Rattenmitochondrien eindeutig als Rhodanase identifizieren. Die durch Trypsinverdau erhaltenen Peptidfragmente gehörten alle zum Translationsprodukt einer Nucleotidsequenz, die als Rattenleberrhodanase publiziert wurde (Weiland & Dooley 1991). Die Persulfidtransferase der Wattwurmmitochondrien konnte nicht vollständig gereinigt werden. Die entsprechende Enzymaktivität befand sich aber wie bei den Versuchen mit Rattenmatrix ausschließlich in denselben Fraktionen der Größenausschlusschromatographie wie die Rhodanase-Aktivität. Daher ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass auch in der Matrix der Wattwurmmitochondrien eine Schwefeltransferase existiert, die sowohl die klassische Rhodanase-Aktivität zeigt, also Persulfide von Thiosulfat auf KCN überträgt, als auch für die Produktion von Thiosulfat aus Persulfiden und Sulfit erforderlich ist. Diese Vermutung wird zusätzlich durch die Beobachtung gestützt, dass Rinderleberrhodanase die Funktion der Persulfidtransferase übernehmen kann, indem sie in Kombination mit der Wattwurm-SDO für die Produktion von Thiosulfat aus GSSH sorgt. Die Rhodanase ist also offenbar sehr flexibel bezüglich der Interaktion mit anderen Enzymen. Möglicherweise ist keine spezielle Bindung zwischen der SDO und der Schwefeltransferase für die Reaktion notwendig, sondern das Zwischenprodukt Sulfit wird ins Medium freigesetzt und erst anschließend von der Schwefeltransferase gebunden. Allerdings wurde die Rinderleberrhodanase im deutlichen Überschuss zugegeben, so dass aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden kann, ob die Rinderleberrhodanase die Thiosulfatbildung ähnlich effektiv katalysiert wie die Schwefeltransferase des Wattwurms.

Beim Aktivitätstest wurden Glutathionpersulfide als Substrat eingesetzt, um die Persulfidtransferase-Aktivität unabhängig von anderen Enzymen untersuchen zu können. Die ermittelte Stöchiometrie der Reaktion entspricht genau den Erwartungen (Tab. 4.1), denn für die Produktion jedes Moleküls Thiosulfat wurde eine Persulfidgruppe und ein Sulfitmolekül benötigt. Das pH-Optimum für die PT-Aktivität der Schwefeltransferasen aus Rattenleber und der Wattwurmmuskulatur lag im Alkalischen bei etwa 8 bis 9. In diesem Bereich zeigen Schwefeltransferasen aus verschiedenen Organismen auch ihre maximale Rhodanaseaktivität. Für die Mausleberrhodanase wurde z.B. ein pH-Optimum von 9,4 ermittelt (Lee et al. 1995), und der optimale pH-Wert für die Rinderleberrhodanase liegt bei etwa 8,5 (Sörbo 1953, Horowitz & Bowman 1987). Das relativ hohe pH-Optimum bestätigt, dass es sich bei den untersuchten Schwefeltransferasen um Enzyme der Mito-

chondrienmatrix handelt. Die intrazelluläre Verteilung der Rattenleberrhodanase wurde bereits mit Hilfe von Leitenzymen untersucht, wobei sich ebenfalls herausstellte, dass dieses kerncodierte Enzym ausschließlich in der Mitochondrienmatrix aktiv ist (Koj et al. 1975). Da auch die anderen beiden Enzyme, die an der Reaktionssequenz zur Sulfidoxidation beteiligt sind, in den Mitochondrien lokalisiert sind, kann so der gesamte Oxidationsprozess in unmittelbarer Nähe ablaufen, ohne dass die Zwischenprodukte über Membranen transportiert werden müssen.

4.1.4.2 Struktur und Reaktionsmechanismus

Die Rhodanase wird auch als Thiosulfat-Cyanid-Schwefeltransferase bezeichnet, denn sie katalysiert in dem meistens verwendeten, klassischen Aktivitätstest die Übertragung eines Schwefelatoms von Thiosulfat auf Cyanid (Sörbo 1955). Für die meisten Studien zur Struktur und dem Reaktionsmechanismus der Schwefeltransferase wurde Rinderleberrhodanase verwendet, aber auch Rhodanasen aus einigen anderen Organismen wurden heterolog exprimiert und charakterisiert (Aita et al. 1997, Spallarossa et al. 2001, Bauer & Papenbrock 2002). Die Rattenleberrhodanase unterscheidet sich nur in 27 Aminosäuren von der Rinderleberrhodanase, wobei 22 der Austausch konservativ sind, so dass die beiden Enzyme zu 95 bis 98 % übereinstimmen (Weiland & Dooley 1991). Die Rinderleberrhodanase ist ein Monomer mit einem Molekulargewicht von 33 kDa und besteht aus zwei Domänen mit jeweils etwa 120 Aminosäuren, die trotz unterschiedlicher Sequenz eine ähnliche Tertiärstruktur ausbilden (Ploegman et al. 1978). Das aktive Zentrum ist Teil der C-terminalen Domäne, während die N-terminale Domäne das Enzym stabilisiert (Trevino et al. 1998). Kleinere Schwefeltransferasen, wie z.B. eine 8,7 kDa Rhodanase aus der Froschleber, eine 12 kDa Rhodanase aus *E. coli* und zwei Rhodanasen mit Molekulargewichten von 14,9 kDa bzw. 12,7 kDa aus *Arabidopsis thaliana*, bestehen nur aus einer katalytischen Domäne (Ray et al. 2000, Wrobel & Czubak 2000, Bauer & Papenbrock 2002). Die beiden noch nicht identifizierten Banden im SDS-Gel der weitgehend gereinigten Wattwurm-Schwefeltransferase lagen mit ca. 16,5 kDa ebenfalls in diesem Bereich. Also besitzt die Wattwurm-Rhodanase vermutlich ebenfalls keine zusätzliche, stabilisierende Domäne.

Die Rhodanase-Reaktion folgt einem Doppel-Verdrängungsmechanismus (Abb. 4.2). Ein Persulfidonor, im klassischen Test Thiosulfat, überträgt ein Schwefelatom der Oxidationsstufe Null auf Cystein²⁴⁷ (Westley 1973). Dadurch entsteht ein kovalentes Enzym-Schwefel-Intermediat, das so stabil ist, dass es bei der Reinigung erhalten bleibt. Cystein²⁴⁷ ist der erste Rest einer sechs Aminosäuren umfassenden Schleife, die im aktiven Zentrum einen Halbkreis um die Bindungstasche bildet. Ein Ring aus Wasserstoffbrücken und die positiven Ladungen der ebenfalls essentiellen Aminosäuren Arg¹⁸⁶ und Lys²⁴⁹ stabilisieren

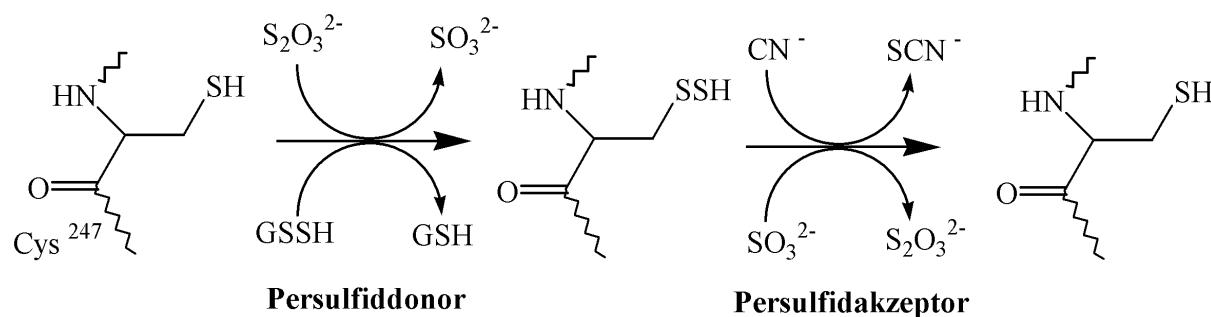


Abb. 4.2: Reaktionsmechanismus einer Schwefeltransferase mit Rhodanase- (obere Pfeile) sowie Persulfidtransferase-Aktivität (untere Pfeile). In einem Doppelverdrängungsmechanismus überträgt zunächst ein Persulfidonor ein Schwefelatom auf einen Cysteinrest im aktiven Zentrum. Anschließend wird das erste Reaktionsprodukt freigesetzt, und der Persulfidakzeptor reagiert mit dem enzymgebundenen Persulfid zum zweiten Reaktionsprodukt.

das Persulfid-Intermediat in der Bindungstasche (Ploegman et al. 1978, Luo & Horowitz 1994). Sulfid wird als erstes Produkt freigesetzt, bevor der Persulfidakzeptor Cyanid ins aktive Zentrum der Rhodanase diffundiert und mit dem Persulfid zu Thiocyanat reagiert. Nach dem gleichen Mechanismus könnte auch die Persulfidtransferase-Reaktion ablaufen, die letztendlich zur Bildung von Thiosulfat bei der mitochondrialen Sulfidoxidation führt (Abb. 4.2, untere Reihe). In diesem Fall wäre das an die SQR gebundene Persulfid, das für den Aktivitätstest durch GSSH ersetzt wird, der Persulfidonor, und Sulfid würde als Akzeptor dienen. Diese beiden Substanzen wurden bei den ersten Studien zum Reaktionsmechanismus der Rhodanase bereits als mögliche Substrate aufgelistet (Sörbo 1957, Szczepkowski & Wood 1967, Westley 1981). Die Relevanz der Persulfidtransferase-Aktivität *in vivo* wurde aber seitdem nicht weiter verfolgt.

Im Vergleich zu den relativ kleinen Molekülen Thiosulfat und KCN stellen enzymgebundene Persulfide als Substrate andere Anforderungen an die Struktur des Enzym. Damit die Schwefeltransferase die Persulfide an der SQR als Substrat nutzen kann, müssen die beiden Enzyme so aneinander binden, dass die aktiven Zentren in räumliche Nähe gebracht werden. Die flexible Struktur der Rhodanase begünstigt die Interaktion mit anderen Proteinen. Die beiden Domänen sind mit einer langen, beweglichen Schleife verbunden, und zwei $\beta\alpha\beta$ -Strukturen in jeder Domäne können zusätzlich knicken. Außerdem werden durch Konformationsänderungen des Enzyms im Verlauf der Reaktion abwechselnd hydrophobe und hydrophile Regionen in der Bindungstasche zugänglich, was die Bindung an bestimmte Enzymregionen oder auch die Mitochondrienmembran beeinflussen könnte (Ploegman et al. 1978, Chow et al. 1985, Horowitz & Criscimagna 1985).

4.1.4.3 Isoformen

Bei der Reinigung der Schwefeltransferase aus Rattenlebermitochondrien ließ sich sowohl die Rhodanase- als auch die PT-Aktivität nach der Kationenaustauschchromatographie in mehreren Fraktionen nachweisen. Kurz nach dem Hauptpeak eluierte ein kleinerer Peak mit etwa 10 bis 20 % des Proteingehaltes und der Aktivität. Außerdem war Aktivität im Durchfluss nachweisbar. Ähnliche Ergebnisse wurden auch von Reinigungen der Rinderleberrhodanase mittels DEAE-Cellulose bzw. DEAE-Sephadex-A50 beschrieben (Blumenthal & Heinrikson 1971, Canella et al. 1981). Blumenthal und Heinrikson (1971) fanden zwei aktive Formen der Rinderleberrhodanase im Eluat der Anionenaustauschchromatographie. Wenn bei der Präparation mehrere Ammoniumsulfatfällungen mit niedrigem pH-Wert durchgeführt wurden, erhielten die Autoren etwa gleiche Mengen der beiden Formen, während durch mildere Präparationsmethoden ohne die Verwendung von Mineralsäuren sich das Verhältnis auf 85-90 % des bei niedrigerer Ionenstärke eluierenden Konformationsisomers verschob. Vier stabile Isoformen der Rinderleberrhodanase konnten mittels präparativer Gelelektrophorese getrennt werden (Canella et al. 1981). Diese entstehen wahrscheinlich durch posttranslationale Modifikationen wie Deamidierungen von Glutamin- und Asparaginresten, Phosphorylierung oder Proteolyse des Carboxyterminus (Miller et al. 1992). Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob die Modifikationen bei der Präparation entstehen, oder bereits *in vivo* vorhanden sind. Für ersteres würde der Befund sprechen, dass die Anzahl und das Verhältnis der Isoformen vom pH-Wert bei der Präparation abhängen (Sörbo 1963, Blumenthal & Heinrikson 1971). Allerdings sind die gereinigten Isoformen stabil und lassen sich auch bei förderlichen Bedingungen, bei 37 °C und pH 8,2, nicht nachträglich deamidieren (Canella et al. 1981).

4.1.4.4 Phosphorylierung und oxidative Inaktivierung

Die Phosphorylierung der Rhodanase kann dagegen keine nichtenzymatische Reaktion sein. Vielmehr wurde in der Matrix von Rinderlebermitochondrien eine cAMP-unabhängige Proteinkinase nachgewiesen, die mitochondrielle Enzyme, wie z.B. die Rhodanase, regulatorisch phosphoryliert (Ogata et al. 1989). Bei der Anionenaustauschchromatographie eluiert das phosphorylierte Enzym bei höherer Ionenstärke, weil die zusätzlichen negativen Ladungen den Isoelektrischen Punkt zu niedrigeren pH-Werten verschiebt (Ogata et al. 1989). Da für die Reinigung der Rattenleber-Schwefeltransferase im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Kationentauscher eingesetzt wurde, könnte hier die Phosphatgruppe aufgrund ihrer negativen Ladungen eine Bindung verhindern, so dass sich in diesem Fall das phosphorylierte Enzym im Durchfluss befinden sollte.

Die Phosphorylierung der Rhodanase ist möglicherweise Bestandteil eines bicyclischen Regulationssystems für die Aktivität der Atmungskette, denn durch die Phosphatgruppe wird die persulfidfreie Konformation der Schwefeltransferase stabilisiert, bei der ein weiteres Cystein in der Nähe von Cystein²⁴⁷ im aktiven Zentrum liegt. Dadurch wird das Enzym besonders leicht oxidativ inaktiviert. Die oxidierte Form der Rhodanase zeigt zwar keine Thiosulfat-Cyanid-Schwefeltransferase-Aktivität mehr, kann aber weiterhin Schwefelatome aus Eisen-Schwefel-Zentren entfernen und die Aktivität der Atmungskette senken. Nur die reduzierte Rhodanase baut dagegen Persulfide aus Thiosulfat in die Atmungskette ein. Also muss die Rhodanase zunächst dephosphoryliert werden, bevor sie die Aktivität der Atmungskette wiederherstellen kann (Ogata et al. 1989, Ogata & Volini 1990).

Auch chemische Modifikationen der Rhodanase durch Sulfit wurden beschrieben, die zur oxidativen Inaktivierung des Enzyms führen (Sörbo 1951, 1962, Berni et al. 1991). Bei der chemischen Oxidation von Sulfit entstehen mehrere verschiedene Radikale, wie z.B. SO_3^- und SO_5^- , sowie H_2O_2 . Diese oxidieren das besonders empfindliche Cystein²⁴⁷ im aktiven Zentrum der Rhodanase, woraufhin sich eine Disulfidbrücke mit dem in der persulfidfreien Konformation benachbarten Cysteinrest bildet. Wenn Cystein²⁴⁷ als Persulfid vorliegt, ist die Rhodanase vor der oxidativen Inaktivierung weitgehend geschützt. Das Disulfid wird anschließend zum Cystein-S-Sulfonat (Cys-S-SO_3^-) sulfitolytisch (Berni et al. 1991). Da bei der Persulfidtransferase-Reaktion Sulfit als Substrat eingesetzt wird, könnte die Bildung von Cystein-S-Sulfonaten für die Reaktion von Bedeutung sein.

Durch Wasserstoffperoxid in äquimolaren Konzentrationen lässt sich gereinigte Rinderleberrhodanase ebenfalls innerhalb von 10 Minuten vollständig inaktivieren. Hohe Thiosulfatkonzentrationen stellen die Rhodanaseaktivität nach mehrstündiger Inkubation zumindest teilweise wieder her. Es wäre denkbar, dass durch die Oxidation zwar die Rhodanase-Aktivität, also die Reaktivität gegenüber Thiosulfat, gehemmt wird, das Enzym aber weiterhin mit Sulfit zum Sulfonat reagieren kann, das dann wiederum in Anwesenheit von Persulfiden Thiosulfat bildet. Dieser Mechanismus würde ebenfalls dem Reaktionsschema entsprechen, das für die PT-Reaktion vorgeschlagen wurde (Gleichung 4.3), aber kein enzymgebundenes Persulfid-Intermediat beinhalten. Diese Möglichkeit konnte anhand der aus Rattenleber- und Wattwurmmitochondrien gereinigten Schwefeltransferasen ausgeschlossen werden, denn die Rhodanaseaktivität und die Persulfidtransferase-Aktivität der Enzyme waren gleichermaßen oxidationsempfindlich. Der gleiche Mechanismus, der für die Regulation der Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren vorgeschlagen wurde, kann also nicht das Verhältnis der Rhodanase- zur PT-Aktivität der Schwefeltransferasen bestimmen. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um herauszufinden, inwiefern die Phosphorylierung der Schwefeltransferase die PT-Aktivität anderweitig beeinflusst.

4.1.4.5 Physiologische Relevanz der Persulfidtransferase-Aktivität

Rhodanasen (EC 2.8.1.1.) sind in allen Reichen des Lebens vertreten, sie wurden sowohl in Tieren, als auch in Pflanzen, Pilzen und Prokaryoten nachgewiesen (Westley 1973). Außerdem findet sich das Rhodanase-Modul, also eine Sequenz mit starker Ähnlichkeit zur katalytisch aktiven Domäne der Rhodanasen, als Bestandteil in verschiedenen Enzymen mit ganz unterschiedlichen Aktivitäten (Cipollone et al. 2007). Die physiologische Funktion dieses offenbar essentiellen Enzyms ist jedoch noch umstritten. Bei der Entdeckung der Schwefeltransferase wurde die namensgebende Reaktion, also die Produktion von Thiocyanat (Rhodanid) im Zuge der Cyanidentgiftung, als Hauptfunktion des Enzyms angesehen (Lang 1933). Es werden zwar geringe Mengen Cyanid, beispielsweise beim Verzehr cyanogener Pflanzen, aufgenommen oder auch endogen produziert, aber die Cyanidkonzentration im Blut gesunder Menschen liegt bei $0,22 \pm 0,08 \mu\text{M}$, und somit deutlich unterhalb des K_m -Wertes der Rhodanase für KCN (Wang & Volini 1973, Schlesinger & Westley 1974, Miller et al. 1992, Tsuge et al. 2000). Um die maximale Umsatzrate zu erreichen, müsste CN^- in millimolaren Konzentrationen vorliegen, die zumindest für Säugetiere tödlich sind, so dass unter physiologischen Bedingungen die Cyanidentgiftung nicht die einzige Aufgabe der Schwefeltransferase sein kann. Inzwischen wurden mehrere weitere Vorschläge aufgebracht. So kann die Rhodanase den reduzierten Schwefel für die Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren liefern (Pagani & Galante 1983), durch die Übertragung von Persulfidgruppen die Aktivitäten einiger Enzyme regulieren (Valentine et al. 1987) und wurde auch mit dem Selen-Metabolismus (Ogasawara et al. 2001) und der Thiamin-Biosynthese (Palenchar et al. 2000) in Verbindung gebracht.

Da die Rhodanaseaktivität im Darm von Patienten, deren Erkrankungen mit zu hohen Sulfidkonzentrationen zusammenhängen könnten, niedriger ist als bei gesunden Probanden, wurde vermutet, dass die Rhodanase als Sulfidoxidase fungieren könnte (Ramasamy et al. 2006). Eine verminderte Expression der Rhodanase ist ein Marker für ein erhöhtes Krebsrisiko der entsprechenden Gewebe (Birkenkamp-Demtroder et al. 2002). Tatsächlich oxidiert gereinigte Rinderleberrhodanase Sulfid zu Thiocyanat, allerdings nur, wenn 50 mM KCN als Cofaktor zugegeben wird, und mit einer sehr niedrigen Affinität für Sulfid ($K_m = 8,8 \text{ mM}$; Picton et al. 2002). Die Schwefeltransferase selber kann also nicht als Sulfidoxidase bezeichnet werden. Die Befunde lassen aber durchaus die Möglichkeit offen, dass dieses Enzym anderweitig an der Sulfidoxidation beteiligt ist. Auch wenn die Rhodanase, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, den letzten Schritt der Sulfidoxidation zu Thiosulfat katalysiert, könnte eine verringerte Expression auf eine Störung des Sulfidstoffwechsels hinweisen. Eine Rhodanase-Defizienz würde zu einer Akkumulation von Sulfid führen, das oxidativen Stress verursacht und cytotoxisch wirkt. Durch den Ausfall

bzw. die Beeinträchtigung des Persulfidtransferase-Schrittes werden außerdem die vorhergehenden Schritte gehemmt, wie anhand der gereinigten SDO in dieser Arbeit gezeigt wurde. Auch dadurch könnten die erhöhten Sulfidkonzentration im Darm der Patienten zustande kommen. Möglicherweise ist auch einer der vorhergehenden Schritte bei der Sulfidoxidation beeinträchtigt, und die Schwefeltransferase wird runterreguliert, da ihr Substrat nur mit geringer Rate gebildet wird. Die Promotorsequenz der Rhodanase ist noch unbekannt, so dass auch die Regulation der Expression noch nicht aufgeklärt werden konnte. Bei Krebszellen der Zelllinie HT-29 erhöht 0,1 mM Sulfid die Expression der Rhodanase, während Konzentrationen ab etwa 0,3 mM cytotoxisch wirken (Ramasamy et al. 2006). Diese Befunde bestätigen, dass die Schwefeltransferase eine Rolle bei der Sulfidentgiftung spielt, lassen aber noch keine Rückschlüsse darüber zu, ob Sulfid selber oder möglicherweise ein Oxidationsprodukt die Rhodanaseexpression reguliert.

Die aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* gereinigten Schwefeltransferasen entsprachen in ihren kinetischen Eigenschaften völlig den bisher bekannten Rhodanasen. Die Substrataffinität dieser Enzyme für Thiosulfat und KCN ist generell relativ niedrig, so dass die K_m -Werte überwiegend im millimolaren Bereich liegen (Pagnani et al. 1993, Ray et al. 2000, Bauer & Papenbrock 2002). Für die bisher am besten untersuchte Rinderleberrhodanase wurden K_m -Werte zwischen 3,7 mM und 15,9 mM für Thiosulfat und von etwa 60 μ M für KCN publiziert (Wang & Volini 1973, Schlesinger & Westley 1974, Miller et al. 1992). Die Thiosulfataffinität der Schwefeltransferase aus den Wattwurmmitochondrien lag mit einem K_m -Wert von 4,3 mM ebenfalls in diesem Rahmen, und für Cyanid wurde ein etwas höherer K_m -Wert von 7,5 mM berechnet. Die bis zur Homogenität gereinigte Schwefeltransferase aus Rattenlebermitochondrien hatte eine Rhodanaseaktivität von etwa 615 U/mg und als K_m -Werte wurden 12,4 mM Thiosulfat und 0,31 mM KCN ermittelt. Auch Oi (1975) erhielt bei der Rhodanase-Reinigung aus Rattenleber ein homogenes Endprodukt mit einer sehr ähnlichen Rhodanaseaktivität von 600 U/mg.

Die Persulfidtransferase-Aktivität von Schwefeltransferasen wurde bisher noch nicht näher untersucht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen erstmals, dass die Rhodanasen aus Rattenleber und dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* ebenso wie die Rinderleberrhodanase um ein Vielfaches höhere Affinitäten zu den Substraten der PT-Reaktion haben als zu KCN und Thiosulfat. Die K_m -Werte für Sulfit und GSSH liegen alle im niedrigen mikromolaren Bereich, so dass die Schwefeltransferasen bei physiologischen Substratkonzentrationen ihre maximale PT-Aktivität erreichen können. Die Rattenleber-Schwefeltransferase hat z.B. einen 1500mal so hohen K_m -Wert für Thiosulfat wie für Sulfit. Daraus lässt sich ableiten, dass die Schwefeltransferase Sulfit bevorzugt bindet und zu Thiosulfat umsetzt, bevor toxische Sulfitkonzentrationen akkumulieren. Die Rückreak-

tion, bei der Sulfit freigesetzt wird, findet dagegen nur bei relativ hohen Thiosulfatkonzentrationen in nennenswertem Umfang statt. Die kinetischen Daten bestätigen somit die vorgeschlagene Reaktionssequenz zur mitochondrialen Sulfidoxidation. Die SQR, deren K_m -Wert für Sulfid wenige μM beträgt, anstelle von mehreren mM wie bei der Rhodanase (Picton et al. 2002), katalysiert wahrscheinlich den ersten Schritt der Sulfidoxidation. Die Schwefeltransferase übernimmt aufgrund ihrer erheblich höheren Affinität zu Persulfiden als zu Sulfid vermutlich eher den nachfolgenden Schritt der Schwefelübertragung. Zwar sind die Umsatzraten von Persulfiden und Sulfit bei den Schwefeltransferasen der untersuchten Säugetiere wesentlich niedriger als die klassische Rhodanaseaktivität, aber dennoch *in vivo* völlig ausreichend um dafür zu sorgen, dass in der Rattenleber- genauso wie in der Wattwurmmatrix ausschließlich Thiosulfat produziert wird, alles gebildete Sulfit also sofort weiterreagiert. Die Katalyse der Persulfidübertragung von produzierenden Enzymen, wie z.B. der SQR, auf Sulfit kann demnach als eine weitere Möglichkeit in die Liste der physiologisch relevanten Funktionen der Rhodanase aufgenommen werden. Ein Stoffwechselweg zur enzymatischen Sulfidoxidation wird von vielen Organismen benötigt, denn nicht nur in sulfidhaltigen Lebensräumen, sondern auch durch endogene Produktion fällt diese Substanz regelmäßig an.

Ein gekoppeltes System mit Beteiligung der Rhodanase, das mit der Sulfidentgiftung in Zusammenhang gebracht werden kann, wurde schon sehr früh beschrieben, aber nicht weiter beachtet. Szczepkowski und Wood (1967) fanden heraus, dass in Anwesenheit von Rhodanase und Sulfit die Cystathionin- γ -Lyase bei der Desulfurierung von Cystein Thiosulfat produziert, anstatt Sulfid freizusetzen. Da die Aktivitäten der beiden Enzyme in vielen Geweben strikt korreliert sind, vermuteten die Autoren eine physiologische Bedeutung dieser Reaktion. Ähnlich wie es bei der in dieser Arbeit vorgestellten Reaktionssequenz der Fall ist, katalysiert die Rhodanase dabei die Übertragung eines Persulfids auf Sulfit. Allerdings wurde Sulfit selber nicht im Verlauf der Reaktion gebildet, sondern musste extern zugegeben werden. Außerdem entstand das Persulfidsubstrat der Rhodanase, Thiocystin, nichtenzymatisch aus Thiocystein, dem eigentlichen Produkt der Cystathionin- γ -Lyase-Reaktion, so dass keine direkte Interaktion der beiden Enzyme erforderlich ist. Daher demonstriert der Versuch zwar, dass die Rhodanase effektiv Persulfide vorhergehender Reaktionsschritte abfangen und auf Sulfit übertragen kann, ob diese Reaktion für den Stoffwechsel von Bedeutung ist, bleibt allerdings fraglich, da die Rhodanase vornehmlich in der Mitochondrienmatrix vorkommt, während die Cystathionin- γ -Lyase ein cytosolisches Enzym ist. Möglicherweise existieren aber auch in den Mitochondrienmembranen, ähnlich wie in den Membranen von Bakterienzellen, spezielle Transportproteine für Persulfidgruppen, die ermöglichen würden, dass im Cytosol produzierter Sulfanschwefel in den

Mitochondrien entweder für die Synthese von Eisen-Schwefel-Zentren eingesetzt werden kann oder durch die SDO und die Rhodanase zu Thiosulfat oxidiert wird.

4.1.5 Die Sulfidoxidation als Teil des Schwefelstoffwechsels

Da die Sulfidoxidation nicht von einem einzelnen Enzym katalysiert wird, sondern mehrere Reaktionsschritte umfasst, bieten sich zahlreiche Möglichkeiten zur Regulation und Interaktion mit anderen Stoffwechselwegen. Einzelne Zwischenprodukte können abgezweigt oder zusätzlich eingeschleust werden. Menschliche Zellen z.B. sind für ihr Wachstum auf eine ausreichende Versorgung mit Sulfanschwefel angewiesen. Zelllinien, deren Schwefelstoffwechsel gestört ist, müssen entweder zusammen mit Fütterzellen kultiviert werden oder eine künstliche Persulfidquelle erhalten (Toohey 1981, 1986). Im Körper transportieren Plasmaalbumine Persulfide an Cysteinreste gebunden von der Leber und den Nieren zu Organe mit geringerer Eigenproduktion, wie dem Herz oder der Milz (Iciek & Wlodek 2001). Auch die SQR könnte den Sulfanschwefel zur Verfügung stellen, der dann über Schwefeltransferasen oder andere Transportproteine verteilt wird. Da Persulfide auch regulatorische Funktionen haben, muss ihre Konzentration innerhalb eines kontrollierten Rahmens von etwa 1 nM bis 7 μ M gehalten werden (Toohey 1989). Die Schwefeldioxygenase kann überschüssigen Sulfanschwefel oxidieren. Mit dieser Funktion könnte sie auch beim Katabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren mitwirken, denn dort entstehen ebenfalls intermediär Persulfide (Abb. 1.1; Dominy & Stipanuk 2004, Kamoun 2004). Außerdem werden organische Persulfide, wie z.B. Allyldisulfide aus Knoblauch, mit der Nahrung aufgenommen (Toohey 1989).

Die Rhodanase erfüllt wahrscheinlich mehrere Funktionen, die alle mit der Aufrechterhaltung und Nutzung des Sulfanschwefelpools in Verbindung stehen. Die Übertragung von Persulfiden auf Sulfit stellt dabei einen weiteren Zwischenspeicher für reduzierten Schwefel dar. Das Reaktionsprodukt Thiosulfat ist ungiftig und stabil, und bei Bedarf kann der Sulfanschwefel durch Schwefeltransferasen wieder freigesetzt werden. In diesem Kontext kann auch die Beobachtung erklärt werden, dass Darmepithelzellen Sulfid nicht vollständig zu Sulfat oxidieren, sondern Thiosulfat in den Blutkreislauf abgeben (Furne et al. 2001). Dadurch kann anschließend in der Leber die benötigte Menge Sulfanschwefel bereitgestellt werden, bevor der restliche Schwefel vollständig zu Sulfat oxidiert wird. Da die Sulfitoxidase die Elektronen aus der Sulfitoxidation auf Cytochrom c überträgt, wird dabei sogar ATP produziert (MacLeod et al. 1961). Die Leber benötigt Sulfat, um daraus 3-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS) zu synthetisieren. PAPS dient als universaler Sulfonat-Donor, z.B. zur Entgiftung schwer wasserlöslicher Substanzen (Venkatachalam 2003).

Die Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat durch Rattenleberhomogenate wurde mit Hilfe von radioaktiv markiertem Thiosulfat untersucht (Koj et al. 1967). Nur wenn das innere Schwefelatom der Oxidationsstufe IV markiert war ($\text{H}_2\text{S}^{35}\text{SO}_3$), ließ sich die Radioaktivität nach kurzer Inkubation im produzierten Sulfat nachweisen. Wurde dagegen $\text{H}_2^{35}\text{SSO}_3$ als Substrat eingesetzt, bildete sich zunächst Thiosulfat, bei dem beide Schwefelatome radioaktiv markiert waren und nur langsam $\text{H}_2^{35}\text{SO}_4$. Die Autoren vermuteten, dass der Sulfanschwefel des Thiosulfats zunächst zu Sulfid reduziert und anschließend sofort durch eine Sulfidoxidase wieder zu Thiosulfat oxidiert wurde. Mit den Erkenntnissen dieser Arbeit ist ein etwas anderer Verlauf der Oxidation von Thiosulfat zu Sulfat wahrscheinlicher. Thiosulfat wird durch eine Schwefeltransferase in ein Persulfid und Sulfit gespalten, woraufhin Sulfit durch die Sulfitoxidase oxidiert wird. Das Persulfid muss zunächst durch die SDO zu Sulfit oxidiert werden und wird in Anwesenheit weiterer Persulfide schnell zu Thiosulfat umgesetzt. Vermutlich sind unterschiedliche Schwefeltransferasen für die Synthese und die Spaltung von Thiosulfat zuständig, die mit den Enzymen der vorhergehenden bzw. nachfolgenden Reaktionsschritte interagieren und so eine Regulation des Schwefelflusses erlauben.

Ein Vergleich der Sulfidoxidation in den Mitochondrien der Ratte und des Wattwurms zeigt, dass bei dem Säugetier und dem sulfidadaptierten Invertebraten die einzelnen enzymatischen Schritte prinzipiell identisch verlaufen. Es handelt sich bei dieser Reaktionssequenz also offenbar nicht um eine spezielle Anpassung an sulfidhaltige Lebensräume. Daher liegt die Vermutung nahe, dass auch den einzelnen Strategien zur Sulfidentgiftung, die am Beispiel ganz unterschiedlicher sulfidadaptierter Tiere untersucht wurden, ein gemeinsames Prinzip zugrunde liegt. Zumindest die Erkenntnisse, die O'Brien und Vetter (1990) zum Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation bei der Muschel *Solemya reidi* veröffentlichten, lassen sich sehr gut mit dem in dieser Arbeit vorgeschlagenen Modell vereinbaren. Mit Hilfe von radioaktiv markiertem Sulfid und nicht markiertem Sulfit konnten die Autoren zeigen, dass die Sulfidoxidation mindestens zwei Schritte umfasst und Thiosulfat dabei aus Sulfit und einem Persulfid entsteht.

Nur das Verhältnis der einzelnen Enzymaktivitäten untereinander weist darauf hin, dass bei *A. marina* die Sulfidoxidation im Vergleich zur Ratte eine übergeordnete Rolle spielt. Während Persulfide in der Mitochondrienmatrix der beiden untersuchten Tiere etwa gleich schnell oxidiert wurden, war die SQR-Aktivität in den Wattwurmmembranen mehr als viermal so hoch wie bei der Ratte. Außerdem war bei der Schwefeltransferase von *A. marina* die PT-Aktivität dominant und sogar etwa doppelt so hoch wie die Rhodanaseaktivität, während sie bei den Säugetieren nur einen Bruchteil der Rhodanaseaktivität ausmachte. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass in den Mitochondrien von Säugetieren die einzelnen Komponenten, die auch zur Sulfidoxidation genutzt werden können, in

gleichem oder ähnlichem Maße auch andere Aufgaben erfüllen. Bei Tieren, die in ihrem Lebensraum regelmäßig mit Sulfid konfrontiert werden, steht dagegen die Sulfidoxidation im Vordergrund, und die Enzyme sind in ihren katalytischen Eigenschaften optimal an diese Funktion angepasst.

In sulfidhaltigen Ökosystemen sind erhöhte Sulfidkonzentrationen häufig mit Sauerstoffmangel verbunden. Gerade in dieser Situation ist ein mehrstufiger Sulfidoxidationsprozess vorteilhaft gegenüber einer Sulfidoxidase, die in einem einzigen Reaktionsschritt Thiosulfat produziert. Unter hypoxischen Bedingungen können zunächst weniger oxidierte Zwischenprodukte wie Polysulfide oder elementarer Schwefel gebildet werden, indem die Reaktionssequenz nach dem ersten Schritt, der SQR, unterbrochen wird. Dadurch halbiert sich die Anzahl der abgegebenen Elektronen für jedes oxidierte Sulfidmolekül und folglich auch die benötigte Menge des Elektronenakzeptors. Bei Anoxie ist eine weitere Oxidation des Sulfanschwefels nicht möglich, denn die SDO benötigt für ihre Reaktion elementaren Sauerstoff nicht nur als Elektronenakzeptor, sondern baut ihn in das Oxidationsprodukt ein.

Die Strategie der partiellen Sulfidoxidation wird tatsächlich von sulfidadaptierten Tieren genutzt, wie bisher an drei Beispielen gezeigt werden konnte. Im Hautmuskelschlauchgewebe des Sipunculiden *Phascolosoma arcuatum*, der im Sediment von Mangroven lebt, akkumuliert Sulfanschwefel während der anoxischen Inkubation in sulfidhaltigem Seewasser (Ip et al. 1997). Welche Schwefelverbindungen dabei gebildet und auch als Endprodukt ausgeschieden werden ist noch nicht bekannt. Da die Tiere jedoch neben Sulfid auch Thiosulfat aus dem Wasser aufnehmen, entstehen vermutlich Polysulfide oder Polythionate. Eine Schwefeltransferase könnte an der Persulfidübertragung beteiligt sein, denn die Rhodanaseaktivität im Hautmuskelschlauchgewebe steigt signifikant, wenn *Ph. arcuatum* für 48 Stunden anoxischen und sulfidischen Bedingungen ausgesetzt ist. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit *Boleophthalmus boddarti* erzielt (Ip et al. 2004). Während der Schlamm-springer bei Normoxie Sulfid hauptsächlich zu Sulfat oxidiert, ist nach einer hypoxischen Sulfidinkubation neben Thiosulfat auch Sulfanschwefel in erhöhten Konzentrationen in der Leber und Muskulatur nachweisbar. Allerdings entspricht die Summe der bisher bestimmten Oxidationsprodukte nur einem Bruchteil des verbrauchten Sulfids, so dass vermutlich außerdem andere, noch unbekannte Schwefelverbindungen produziert werden. Der marine Nematode *Oncholaimus campylocercoides* bildet bei Hypoxie in Gegenwart von Sulfid viskose Schwefelein-schlüsse in der Epidermis. Sobald wieder Sauerstoff verfügbar ist, wird der elementare Schwefel weiter zu Thiosulfat und Sulfat oxidiert und innerhalb von 12 Stunden vollständig abgebaut (Thiermann et al 2000).

Theoretisch könnte Sulfid sogar völlig ohne Sauerstoffverbrauch entgiftet werden, wenn die SQR die Elektronen aus der Sulfidoxidation auf Rhodochinon überträgt. Hypoxietolerante Invertebraten besitzen diesen Elektronencarrier zusätzlich zu Ubichinon, denn er ermöglicht aufgrund des etwas niedrigeren Redoxpotentials eine Übertragung der Elektronen aus der Atmungskette auf den alternativen Elektronenakzeptor Fumarat durch die Fumaratreduktase (Tielens & Van Hellemond 1989, Tielens et al. 2002). Succinat wird als Endprodukt des anaeroben Energiestoffwechsels auch bei *A. marina* und der ebenfalls sulfidadaptierten Muschel *G. demissa* gebildet (Völkel & Grieshaber 1994, Doeller et al. 2001). Bei beiden Tieren konnte außerdem mit Hilfe von Sulfidelektroden nachgewiesen werden, dass die Mitochondrien Sulfid selbst unter vollständig anoxischen Bedingungen noch mit geringer Rate verbrauchen (Kraus & Doeller 2004, Przywara 2004). Es muss jedoch noch untersucht werden, ob die Mitochondrien bei der anaeroben Sulfidoxidation tatsächlich stöchiometrisch Succinat produzieren und welche schwefelhaltigen Endprodukte dabei entstehen.

4.2 Raten und Regulation der Sulfidoxidation

Die Mitochondrien der Ratte und des Wattwurms benötigen drei Enzyme, um Sulfid zu Thiosulfat zu oxidieren. Die Hälfte der abgegebenen Elektronen gelangt dabei in die Atmungskette, so dass am Gesamtvorgang der Sulfidoxidation zusätzlich weitere Enzymkomplexe beteiligt sind. Dabei zeigen sich Unterschiede zwischen dem Säugetier und dem sulfidadaptierten Invertebraten. Während *A. marina* zwei verschiedene Wege für die entgiftende Sulfidoxidation und die energiekonservierende Sulfidatmung besitzt, stehen der Ratte nur die klassischen Enzymkomplexe der Atmungskette zur Verfügung. Daraus ergeben sich unterschiedliche Oxidationsraten und Regulationsmechanismen, die dazu beitragen, die Sulfidoxidation den Bedürfnissen des Gesamtstoffwechsels der Tiere anzupassen.

4.2.1 Sulfidoxidation bei Säugetieren und Invertebraten

Für zahlreiche sulfidadaptierte Arten der Endofauna mariner Sedimente wurde gezeigt, dass sie Sulfid in ihren Mitochondrien mit vergleichsweise hohen Raten oxidieren und in niedrigen Konzentrationen zur ATP-Produktion nutzen können (Grieshaber & Völkel 1998). Auch anhand isolierter Rattenlebermitochondrien wurde in ersten Studien die Fähigkeit zur Sulfidoxidation nachgewiesen (Bartholomew et al. 1980). Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* und der Rattenleber oxidierten Sulfid ebenfalls unter Sauerstoffverbrauch und bauten dabei einen

Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran auf, der zur Produktion von ATP verwendet werden konnte.

Die isolierten Mitochondrien beider Versuchstiere produzierten etwa 1,5 Moleküle ATP bei der Oxidation eines Sulfidmoleküls. Dieses Verhältnis lässt sich mit der dreistufigen Reaktionssequenz der mitochondrialen Sulfidoxidation sehr gut vereinbaren. Die SQR überträgt bei der Oxidation jedes Sulfidmoleküls zu Sulfanschwefel zwei Elektronen in die Atmungskette, die an Komplex III und IV für den Transport von insgesamt sechs Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum sorgen (Berg et al. 2003). Da für die Phosphorylierung eines ADP-Moleküls zu ATP vier Protonen aus dem Gradienten benötigt werden, können 1,5 Moleküle ATP für jedes oxidierte Sulfidmolekül entstehen. Der zweite Schritt der Sulfidoxidation vom Persulfid zu Sulfit wird von der SDO katalysiert, die zwar Sauerstoff verbraucht, dabei aber keinen Protonengradienten aufbaut. Daher wird im Verhältnis zum Sauerstoffverbrauch mit Sulfid als Substrat weniger ATP produziert als mit Succinat. So erklärt sich auch der Befund, dass trotz identischer Atmungsraten die Wattwurmmitochondrien bei der Sulfidoxidation nur mit der halben Rate der Succinatatmung ATP produzierten. Sulfid ist also bezüglich des Sauerstoffverbrauchs ein weniger effektives Atmungssubstrat als beispielsweise Succinat, denn nur die Energie, die beim ersten Oxidationsschritt zum Persulfid frei wird, kann energiekonservierend zur ATP-Produktion eingesetzt werden.

Die Mitochondrien des Wattwurms besitzen wahrscheinlich, ähnlich wie pflanzliche Mitochondrien, eine verzweigte Atmungskette, die eine alternative Oxidase enthält und somit die Übertragung von Elektronen auf Sauerstoff unabhängig vom Aufbau eines Protonengradienten ermöglicht (Völkel & Grieshaber 1996, 1997). Auch die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine solche Konstellation hin. Der Einsatz der Inhibitoren Myxothiazol und KCN zeigte, dass die Komplexe III und IV der Atmungskette zwar für die ATP-Produktion aus Sulfid erforderlich sind, der Sauerstoffverbrauch aber zumindest teilweise auch ohne diesen Teil der Atmungskette möglich ist. Da diese Oxidaseaktivität wiederum durch den Inhibitor der pflanzlichen alternativen Oxidase, SHAM, gehemmt wird, liegt die Vermutung nahe, dass auch der Wattwurm ein ähnliches Enzym besitzt. Cyanidresistente Sulfidoxidation wurde auch bei *M. viridis*, *N. diversicolor* und *G. demissa* gefunden (Hahlbeck et al. 2000, Kraus & Doeller 2004). In Hühnerlebermitochondrien und auch in Lebermitochondrien des Fisches *F. parvipinnis* wurde eine vollständige Hemmung des Sauerstoffverbrauchs durch KCN mit Sulfid genauso wie mit Succinat als Substrat beschrieben (Bagarinao & Vetter 1990, Yong & Searcy 2001). Somit besitzen diese beiden Vertebraten offenbar keinen cyanidresistenten alternativen Oxidationsweg. In Rattenlebermitochondrien wurde ebenfalls kein Hinweis auf eine alternative Oxidase gefunden,

denn KCN und Myxothiazol hemmten die Sulfidoxidation vollständig, während SHAM fast keine Wirkung zeigte.

4.2.2 Die erweiterte Atmungskette des Wattwurms

Bisher war es nicht möglich, den energiekonservierenden und den entgiftenden Sulfidoxidationsweg in Wattwurmmitochondrien getrennt zu betrachten, so dass die jeweils beteiligten Enzyme nicht eindeutig ermittelt werden konnten. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DHA bzw. GSH und Ascorbat als Aktivatoren für die beiden Oxidationswege identifiziert. In Gegenwart dieser Substanzen oxidierten die Wattwurmmitochondrien Sulfid auch in vergleichsweise hohen Konzentrationen von bis zu 100 μM mit konstantem Sauerstoffverbrauch, der ohne die Modulatoren nur in Gegenwart deutlich niedrigerer Sulfidkonzentrationen bis etwa 10 μM erreicht wurde. Wenn ausschließlich Sulfid zu einer Mitochondriensuspension gegeben wird, kann sowohl der energiekonservierende als auch der entgiftende Sulfidoxidationsweg besprochen werden, wie die Inhibitorstudien zeigen.

Reduziertes Glutathion und Ascorbat aktivieren gezielt den entgiftenden Sulfidoxidationsweg. Selbst bei der Oxidation von sehr niedrigen Sulfidkonzentrationen produzierten die Mitochondrien fast kein ATP, so dass die Protonen pumpenden Komplexe III und IV offenbar nicht an der Reaktion beteiligt sind. Dementsprechend wurde der Sauerstoffverbrauch kaum durch die Inhibitoren dieser beiden Komplexe, Myxothiazol und Cyanid, gehemmt. Diese Ergebnisse zeigen, dass durch reduziertes Glutathion und Ascorbat ein Enzym aktiviert wird, das die Elektronen aus der Sulfidoxidation direkt von der SQR bzw. von Ubichinon übernimmt und auf Sauerstoff überträgt (Abb. 4.3, A). Demnach handelt es sich wahrscheinlich um eine alternative Oxidase vom pflanzenähnlichen Typ, die auch in Pilzen und einigen Parasiten gefunden wurde (Vanlerberghe & McIntosh 1997, Chaudhuri et al. 1998, Joseph-Horne et al. 2000, Moore et al. 2002, Fang & Beattie 2003). Dieses Enzym enthält zwei Eisenatome, jedoch keine Cytochrome und ist daher gegenüber Cyanid insensitiv. Durch die alternative Oxidase wird die Atmungskette des Wattwurms für die Sulfidoxidation kurzgeschlossen wie z.B. bei thermogenen Pflanzen (Juszczuk & Rychter 2003). Die Sulfidoxidation ist bei der Verwendung von ausschließlich dieser Oxidase als reiner Entgiftungsmechanismus anzusehen, denn die einzige Berührungsstelle mit der Atmungskette ist der Ubichinon-Pool und es kann keine Protonentranslokation stattfinden. Die alternative Oxidase des Wattwurms wird vermutlich, wie das pflanzliche Enzym und auch die ähnlich aufgebauten alternativen Oxidasen aus Parasiten, durch SHAM gehemmt (Berthold 1998, Fang & Beattie 2003, Suzuki et al. 2004), denn wenn dieser Oxidationsweg mittels GSH und Ascorbat aktiviert wurde, nahm der Sauerstoffverbrauch nach der SHAM-Zugabe um fast 90 % ab.

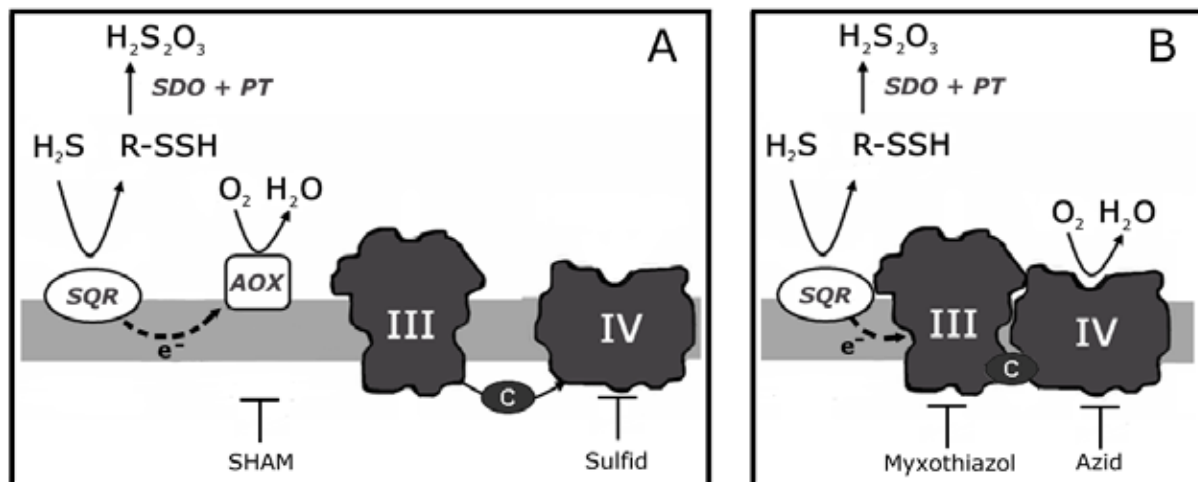


Abb. 4.3: Schema des entgiftenden (A) und des energiekonservierenden (B) Sulfidoxidationsweges in der inneren Mitochondrienmembran. A: GSH und Ascorbat aktivieren bei Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* einen entgiftenden Sulfidoxidationsweg. Die Elektronen aus der Sulfidoxidation werden ohne Protonentranslokation von der Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR) über den Ubichinon-Pool und eine alternative Oxidase (AOX) auf Sauerstoff übertragen. Die AOX und somit der entgiftende Sulfidoxidationsweg ist durch Salicylhydroxaminsäure (SHAM) hemmbar. B: Der energiekonservierende Sulfidoxidationsweg wird beim Wattwurm durch Dehydroascorbat und bei Rattenlebermitochondrien durch Glutamat oder Dehydroascorbat aktiviert. Möglicherweise durch die Bildung von Superkomplexen wird die Hemmung der Cytochrom c Oxidase durch Sulfid verhindert, so dass die Elektronen aus der Sulfidoxidation von der SQR über die Komplexe III und IV der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden können. Dabei werden Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt und zur ATP-Produktion genutzt. Die Sulfidatmung ist mittels Myxothiazol und Natriumazid hemmbar. Die an der SQR produzierten Persulfide (R-SSH) werden durch die Schwefeldioxygenase (SDO) und die Persulfidtransferase (PT) zu Thiosulfat umgesetzt.

Der energiekonservierende Anteil der Sulfidoxidation lässt sich durch Dehydroascorbat, die oxidierte Form des Vitamin C's, aktivieren. Die Wattwurmmitochondrien zeigten selbst bei der Oxidation von $50 \mu\text{M}$ Sulfid Akzeptorkontrolle und produzierten ATP in ähnlich hohen Raten, wie sie sonst nur mit sehr niedrigen Sulfidkonzentrationen ($< 10 \mu\text{M}$) zu beobachten waren. Wie zu erwarten, wurde diese Aktivität nicht durch SHAM, dagegen aber fast vollständig durch Myxothiazol und Natriumazid gehemmt. Diese Befunde zeigen, dass in Gegenwart von DHA die Elektronen aus der Sulfidoxidation über die Komplexe III und IV der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden und eine alternative Oxidase nicht an der Reaktion beteiligt ist (Abb. 4.3, B). Demnach muss DHA in der Lage sein, die Hemmung der Cytochrom c Oxidase zu verhindern, die normalerweise schon bei niedrigen mikromolaren Sulfidkonzentrationen zu beobachten ist. Die Wattwurmmitochondrien können so Sulfid auch in vergleichsweise hohen Konzentrationen zur ATP-Produktion einsetzen.

Das dargestellte Modell von der erweiterten Atmungskette des Wattwurms ist mit den Erkenntnissen aus vorhergehenden Studien zur Sulfidoxidation vereinbar und sogar dazu geeignet, Unklarheiten bezüglich der Rolle von Komplex III zu beseitigen. Völkel und

Grieshaber (1996, 1997) hatten festgestellt, dass *A. marina* eine verzweigte Atmungskette besitzt, die zwei verschiedene Möglichkeiten zur Sulfidoxidation bietet. Sie waren jedoch von einer alternativen Oxidase ausgegangen, die auf der Ebene von Cytochrom c von der Atmungskette abzweigt, wodurch die Frage entsteht, wie die Elektronen Komplex III umgehen können. Die Cytochrom c Oxidase wurde als einziger Protonen pumpender Komplex bei der Sulfidatmung vorgeschlagen, da weniger ATP produziert wurde, als bei der Aktivität von Komplex III plus Komplex IV zu erwarten wäre. Dieses Verhältnis lässt sich aber sehr leicht, wie oben beschrieben, durch die SDO erklären, und durch die Möglichkeit, beide Oxidationswege einzeln zu untersuchen, konnte auch die Position der alternativen Oxidase in der Atmungskette eindeutig bestimmt werden. Komplex III ist also durchaus am energiekonservierenden Sulfidoxidationsweg beteiligt, wohingegen der entgiftende Weg bereits vorher auf der Ebene von Ubichinon abzweigt.

4.2.3 Redoxregulation der Sulfidoxidation bei *A. marina*

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten niedermolekularen Substanzen GSH, Ascorbat und Dehydroascorbat sind dazu geeignet, bei isolierten Wattwurmmitochondrien die Raten der Sulfidoxidation signifikant zu erhöhen und aktivieren dabei zwei unterschiedliche Oxidationswege. In der Zelle bzw. im ganzen Organismus könnten andere Verbindungen diese Funktion übernehmen oder mehrere, bisher noch unbekanntes Regulationsebenen gemeinsam zum Tragen kommen. Es ist jedoch auffällig, dass beide bisher identifizierten Modulatoren zu den wichtigsten intrazellulären Antioxidantien gehören. Daher liegt die Vermutung nahe, dass die Sulfidoxidation beim Wattwurm durch den Redoxstatus der Zellen oder der Mitochondrien reguliert werden könnte.

Oxidativer Stress wurde verstärkt im Zusammenhang mit degenerativen Erkrankungen und dem Alterungsprozess untersucht, denn Radikale können Lipide, Proteine, Kohlenhydrate und Nucleinsäuren irreversibel schädigen (Ghezzi & Bonetto 2003). In niedrigen Konzentrationen haben Radikale aber auch physiologische Funktionen und dienen als Signalmoleküle. Ein bekanntes Beispiel ist die Präkonditionierung, die dazu führt, dass ein Organismus unterschiedliche Stresszustände besser übersteht, wenn er zuvor mit einer niedrigeren, unschädlichen Dosis des gleichen Stressfaktors konfrontiert wurde. Dieses Phänomen ist sowohl bei Sauerstoffmangel, als auch bei Hyperoxie zu beobachten und könnte mit der Aktivierung spezieller Transkriptionsfaktoren in Folge leichter Änderungen des Redoxgleichgewichtes zusammenhängen (Moran et al. 2001). Sauerstoffradikale entstehen überwiegend in den Mitochondrien, wenn einzelne Elektronen auf molekularen Sauerstoff übertragen werden, so dass die sehr reaktiven Superoxidationradikale entstehen. Die Radikalproduktion ist Bestandteil des mitochondrialen Stoffwechsels und führt

nicht zu pathologischen Zuständen, solange die entsprechenden Schutzsysteme funktionieren. Sie ist sogar notwendig, um das Membranpotential zu regulieren und dient als Signal für den Zellkern, die Synthese neuer Atmungskettenkomplexe zu initiieren. Wenn allerdings zu viele Mitochondrien einer Zelle so sehr geschädigt sind, dass sie unkontrolliert Radikale produzieren, wird die Apoptose eingeleitet, um die defekte Zelle zu beseitigen (Lane 2005).

Isolierte Mitochondrien produzieren Wasserstoffperoxid, wenn der Ubichinon-Pool stark reduziert ist und eine Reoxidation verhindert oder verlangsamt wird. Unter diesen Bedingungen werden die Elektronen teilweise auf Komplex I zurück übertragen, wobei an einem der Eisen-Schwefel-Zentren einzelne Elektronen mit Sauerstoff zum Superoxid anion reagieren können. Die gleiche Reaktion findet auch an der Q_o -Bindestelle von Komplex III statt, wenn das bereits teilweise oxidierte Ubisemichinon ein Elektron auf molekularen Sauerstoff überträgt (Demin et al. 1998, Votyakova et al. 2001). Die Superoxiddismutase disproportioniert die Superoxid anionradikale umgehend zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (Andreyev et al. 2005). In state 4, also in Abwesenheit von ADP, entspricht die H_2O_2 -Produktion von Rattenherzmitochondrien mit $0,4-3 \text{ nmol } H_2O_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ etwa 5-20 % des gesamten Sauerstoffverbrauchs (Hansford et al. 1997, Starkov & Fiskum 2003, Starnes et al. 2007). Die isolierten Wattwurmmitochondrien produzierten mit Succinat als Substrat $5,3 \text{ nmol } H_2O_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, also wurde etwa ein Drittel des verbrauchten Sauerstoffs unter diesen Bedingungen zu Radikalen umgesetzt. Keller et al. (2004) ermittelten ebenfalls mit Wattwurmmitochondrien deutlich niedrigere Werte für den Anteil der Radikalproduktion an der Atmungsrate von 4-12 %. Die Temperatur lag bei den Versuchen allerdings nur bei 1°C bzw. 10°C . Die Autoren stellten fest, dass die Wasserstoffperoxidproduktion mit der Temperatur anstieg und die Wattwurmmitochondrien außerdem im Sommer vermehrt Radikale freisetzten. Die Daten der vorliegenden Arbeit sind Mittelwerte aus Versuchen, die zu unterschiedlichen Jahreszeiten durchgeführt wurden. Die vergleichsweise hohe Rate der Radikalproduktion könnte also durch den unterschiedlichen Zustand der Versuchstiere und durch die höhere Versuchstemperatur zu erklären sein.

Sulfid wirkt in den Wattwurmmitochondrien offenbar antioxidativ. Unmittelbar nachdem $10 \mu\text{M}$ Sulfid in den Versuchsansatz pipettiert worden waren, fiel die Rate der Wasserstoffperoxidproduktion bei der state 4 Atmung mit Succinat als Substrat auf Null. Auch Herzmuskelzellen und Neuronen schützt H_2S vor Proteinoxidation und Lipidperoxidation, den typischen Folgen von oxidativem Stress (Geng et al. 2004, Whiteman et al. 2005). Sulfid reagiert dabei wahrscheinlich direkt mit Superoxid anionen oder Wasserstoffperoxid, was auch in den Wattwurmmitochondrien der Fall sein könnte. Ein weiterer Mechanismus könnte bei den Mitochondrien des sulfidadaptierten Invertebraten hinzukommen, der in

Säugetiermitochondrien nicht gegeben ist. Sulfid aktiviert eine alternative Oxidase, die unabhängig vom Protonengradienten und der ADP-Konzentration Elektronen von Ubichinon auf Sauerstoff überträgt. Dadurch werden die Mitochondrien teilweise entkoppelt, und die Radikalproduktion nimmt ab, da die Atmungskette weniger stark reduziert ist.

Malat und Malonat hemmen ebenfalls die Wasserstoffperoxidproduktion der Wattwurmmitochondrien, ebenso wie die als Radikalfänger bekannten Substanzen, GSH und Ascorbat. Malonat ist ein kompetitiver Inhibitor der Succinatdehydrogenase (Quastel & Wooldridge 1928). Die Abnahme der Radikalproduktion könnte also darauf zurückzuführen sein, dass Succinat nicht weiter oxidiert werden konnte und so keine weiteren Elektronen in den Ubichinon-Pool gelangen. Malat wird in den Mitochondrien von Invertebraten zu einem höheren Anteil als bei Säugetieren durch das Malatenzym oxidativ zu Pyruvat decarboxyliert, wobei NADPH entsteht (Skorkowski 1988). Einige Enzyme, die an der Entgiftung von Radikalen beteiligt sind, benötigen NADPH als Cofaktor. Die bei der Malatoxidation entstehenden Reduktionsäquivalente könnten also durch die Glutathionreduktase zur Bereitstellung reduzierten Glutathions verwendet werden oder die oxidative Inaktivierung der Catalase verhindern und dadurch indirekt die Wasserstoffperoxidproduktion der Mitochondrien hemmen (Kirkman et al. 1987). Möglicherweise ist aber auch ein weiterer, noch unbekannter Mechanismus beteiligt, denn Malat und Malonat beeinflussen nicht nur die Radikalproduktion aus Succinat, sondern auch die Sulfidentgiftung in ähnlicher Weise. Da bei letzterer Succinat vermutlich nicht beteiligt ist, muss Malonat noch eine andere Funktion außer der kompetitiven Hemmung der Succinatdehydrogenase haben, die nur durch weitere Studien identifiziert werden kann. Die vorliegenden Ergebnisse sind lediglich dazu geeignet, die Vermutung zu stützen, dass die Radikalproduktion, bzw. der dadurch veränderte Redoxzustand der Mitochondrien, die Sulfidoxidation beeinflusst. Der entgiftende Sulfidoxidationsweg wurde nur durch Metabolite aktiviert, die gleichzeitig in der Lage waren, die Wasserstoffperoxidproduktion der Mitochondrien zu hemmen.

Thiolgruppen sind maßgeblich an der Redoxregulation beteiligt, denn sie können unter zellulären Bedingungen reversibel oxidiert werden. Benachbarte Sulfhydrylgruppen bilden dabei Disulfidbrücken aus, die eine spezielle Konformation des Proteins stabilisieren oder intermolekulare kovalente Verbindungen zwischen zwei Untereinheiten eines Enzyms herstellen können. Weitere reversible Modifikationen von Thiolen sind die Oxidationen zum Nitrosothiol (Pr-SNO), zur Sulfensäure (Pr-SOH) und zum Thiylradikal (Pr-S[•]) (Ghezzi & Bonetto 2003). Thioredoxin fungiert als regulatorisches Enzym, denn es reaktiviert effektiv oxidierte Proteinthiole, indem es sie NADPH-abhängig reduziert. Die Protein-Disulfid-Oxidoreduktase besitzt ein für diese Enzymfamilie typisches Cys-X-X-Cys-Motiv im aktiven Zentrum, das reversibel oxidiert werden kann (Ghezzi & Bonetto 2003). Proteinphosphatasen haben ebenfalls ein regulatorisches Cystein, das für die Aktivierung

des Enzyms reduziert sein muss. Somit wird auch die Regulation von Enzymaktivitäten durch Phosphorylierung vom Redoxstatus der Zelle beeinflusst, denn Proteine bleiben länger phosphoryliert, wenn die entsprechenden Phosphatasen durch Radikale oxidiert und dadurch inaktiviert werden (Monteiro & Stern 1996).

Die pflanzliche alternative Oxidase besteht aus zwei Monomeren, die über mehrere Salzbrücken und zwei Disulfidbrücken zwischen konservierten Cysteinen kovalent verbunden sind. Damit das Enzym seine aktive Konformation annimmt, muss eine der Disulfidbrücken zum Sulfhydryl reduziert werden und reagiert anschließend mit Pyruvat oder einer anderen α -Ketosäure zum Thiohalbacetal (Rhoads et al. 1998, Vanlerberghe et al. 1998). Der Redoxstatus reguliert so die Verteilung des Elektronenflusses in der Atmungskette von Pflanzenmitochondrien zwischen der Cytochrom c Oxidase und der alternativen Oxidase (Berthold et al. 2000). Neben Pyruvat aktivieren auch einige andere Metabolite des Citratcyclus, wie z.B. Malat und Isocitrat, die alternative Oxidase, während Succinat keine Wirkung zeigt (Vanlerberghe et al. 1995). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten darauf hin, dass die alternative Oxidase der Wattwurmmitochondrien auf ähnliche Weise reguliert werden könnte. Der entgiftende Sulfidoxidationsweg war nur unter reduzierenden Bedingungen aktiv. Also könnte die alternative Oxidase von *A. marina* wie das pflanzliche Enzym eine regulatorische Disulfidbrücke enthalten, die reduziert werden muss, um das Enzym zu aktivieren. Dabei ist offenbar vor allem die Produktionsrate von Radikalen entscheidend. Nur GSH, Ascorbat, Malat und Malonat konnten die Rate der Sulfidentgiftung steigern, und genau diese Substanzen unterdrückten auch sehr effektiv die Wasserstoffperoxidproduktion der Mitochondrien. Auch Vanlerberghe et al. (1995) hatten festgestellt, dass die aktivierende Wirkung der Citratcyclus-Intermediate nicht von ihrer Metabolisierungsrate abhing, so dass ein ähnlicher Mechanismus zugrunde liegen könnte. Allerdings gibt es auch deutliche Unterschiede bei der Regulation der alternativen Oxidasen in den Mitochondrien von Pflanzen und *A. marina*. Pyruvat beeinflusst den alternativen Oxidationsweg in Wattwurmmitochondrien nicht, ein Thiohalbacetal spielt also keine Rolle bei der Aktivierung der Alternativen Oxidase (Przywara 2004). Stattdessen muss Sulfid regulatorische Funktionen haben, denn der nicht-energiekonservierende Oxidationsweg war ausschließlich in Gegenwart von Sulfid aktiv, während die pflanzliche Alternative Oxidase unabhängig von der Sulfidkonzentration überschüssige Reduktionsäquivalente bei niedrigem ATP-Bedarf entsorgt (Millenar & Lambers 2003).

Glutathion, das Tripeptid γ -Glutamylcysteinylglycin (Abb. 4.4), ist das häufigste niedermolekulare Thiol in Zellen und erreicht in Mitochondrien Konzentrationen von 0,5-10 mM (Lu 2000, Li et al. 2001). Mit seinem unter zellulären Bedingungen relativ niedrigen Redoxpotential von $E^{0'} = -340$ mM wirkt GSH reduzierend (Giles & Jacob 2002). Die Thiolgruppe des Cysteins kann direkt durch Radikale oxidiert werden und diese dabei

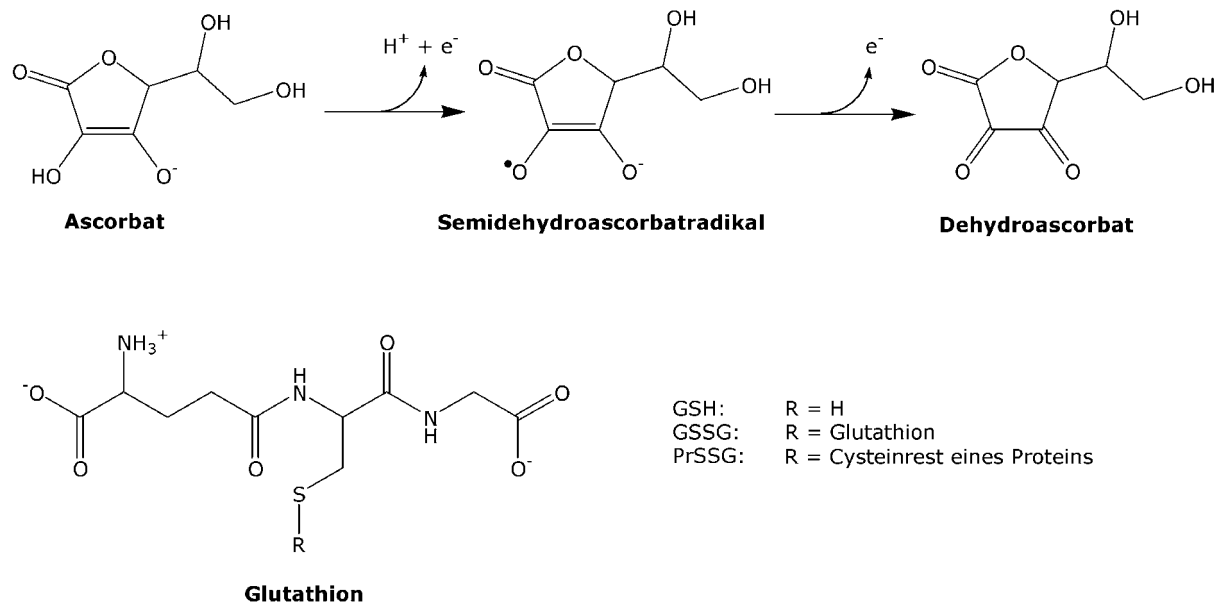


Abb. 4.4: Strukturformeln von Vitamin C und Glutathion, den Modulatoren der mitochondrialen Sulfidoxidation bei *A. marina*. Beide Substanzen wirken antioxidativ, denn Ascorbat kann in zwei Schritten über das Semidehydroascorbatradikal zu Dehydroascorbat oxidiert werden und reduziertes Glutathion (GSH) bildet bei der Oxidation das Disulfid GSSG. Cysteinreste von Proteinen können durch GSSG glutathionyliert werden (PrSSG).

entgiften, und GSH dient außerdem als Kofaktor für Enzyme, wie z.B. die Glutathionperoxidase, die vor Schäden durch oxidativen Stress schützen (Moran et al. 2001). Das Thiol GSH wird dabei zum Disulfid GSSG oxidiert (Abb. 4.4). Der intrazelluläre Redoxstatus wird durch GSH kontrolliert und spiegelt sich im GSH:GSSG-Verhältnis wider. Je nach Zelltyp und -zustand liegen etwa 10-300 μM als GSSG vor (Giles & Jacob 2002). Eine erhöhte ROS-Konzentration steigert auch den Anteil des oxidierten Glutathions, wodurch Enzymaktivitäten auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden können (Monteiro & Stern 1996). Einige Enzyme, z.B. Aldolase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Pyruvatkinase, können glutathionyliert werden (Ghezzi 2005). Dabei reagiert GSSG mit Cysteinresten von Proteinen zum gemischten Disulfid (PrSSG). Da diese Reaktion durch Glutaredoxin und GSH oder *in vitro* auch durch Reduktionsmittel wie DTT reversibel ist, könnte es sich um einen Regulationsmechanismus handeln. Bei erhöhter Radikalproduktion verlangsamt die Glutathionylierung einiger Enzyme den Kohlenhydratkatabolismus und verhindert so, dass die Atmungskette stärker reduziert wird, was wiederum zu erneuter Radikalproduktion führen würde. Andererseits könnte die Reaktion zum gemischten Disulfid Sulfhydrylgruppen bei oxidativem Stress vor der irreversiblen Oxidation zum Sulfonat schützen (Ghezzi 2005). Einige Proteine sind aber auch im Normalzustand ohne erhöhte Radikalproduktion glutathionyliert, wobei der Anteil in Mitochondrien besonders hoch ist, da diese im Gegensatz zu Zellen GSSG nicht ausschleusen (Brigelius et al. 1983, Olafsdottir & Reed 1988). Die Alternative Oxidase der Wattwurmmitochondrien-

en könnte also in glutathionyliertem Zustand vorliegen und dadurch inaktiv sein, wenn keine Sulfidentgiftung erforderlich ist. Bei insgesamt reduzierenden Bedingungen, die mit hohen GSH- und Ascorbatkonzentrationen verbunden sind, könnte das Glutathion aus dem gemischten Disulfid am regulatorischen Cysteinrest der Alternativen Oxidase entfernt werden, so dass dieser für eine weitere sulfidabhängige Aktivierung zur Verfügung steht. Alternativ könnte das GSH auch lediglich als Reduktionsmittel dienen und eine regulatorische Disulfidbrücke der Alternativen Oxidase reduzieren, wie es in Pflanzenmitochondrien der Fall ist. Über die Frage, nach welchem Mechanismus Sulfid die Alternative Oxidase des Wattwurms aktiviert, ist noch nichts bekannt, und auch die Möglichkeit einer regulatorischen Glutathionylierung muss noch eingehender untersucht werden.

Der zweite Aktivator der Sulfidentgiftung bei *A. marina*, Ascorbat, liegt intracellulär ebenfalls in millimolaren Konzentration vor (Li et al. 2001, Berger et al. 2003). Vitamin C wirkt antioxidativ, da es aufgrund des sehr niedrigen Redoxpotentials leicht zum Semidehydroascorbatradikal oxidierbar ist, das durch delokalisierte Elektronen stabilisiert wird und daher weniger reaktiv ist als andere Radikale (Linster & Van Schaftingen 2007). Durch die Abgabe eines weiteren Elektrons wird das Semidehydroascorbatradikal zu DHA oxidiert, oder es disproportioniert zu Ascorbat und DHA (Banhegyi et al. 1997, Abb. 4.4). Ascorbat ist reaktiver gegenüber Radikalen als GSH und wird daher bei oxidativem Stress als erstes oxidiert (Vatassery et al. 1995, Li et al. 2001). DHA ist relativ instabil und wird bei physiologischem pH zu 2,3-Diketo-L-Gulonat hydrolysiert, anschließend decarboxyliert und in den Pentosephosphatweg eingespeist. Daher muss DHA bzw. das Semidehydroascorbatradikal schnell mit Hilfe der NADH-abhängigen Cytochrom b_5 -Reduktase oder anderer NADPH- oder GSH-abhängiger Enzymsysteme wie der Thioredoxin-Reduktase und Glutaredoxin reduziert und dadurch regeneriert werden (Banhegyi et al. 1997, Li et al. 2001, Linster & Van Schaftingen 2007). Der Einfluss von Vitamin C auf die Rate der Sulfidentgiftung könnte ähnlich wie bei GSH darin bestehen, ein regulatorisches Cystein der Alternativen Oxidase zu reduzieren oder vor der Reoxidation zu schützen. Außerdem könnte die Alternative Oxidase des Wattwurms wie das pflanzliche Enzym zwei nicht-Häm-Eisenatome im aktiven Zentrum enthalten, die an der Aktivierung des Sauerstoffs bei der Übertragung der Elektronen von Ubichinol beteiligt sind. Dieses Dieisenzentrum produziert im Verlauf der Reaktion wahrscheinlich Radikale an benachbarten Tyrosin- oder Tryptophanresten (Affourtit et al. 2002). Ascorbat könnte also dafür benötigt werden, versehentlich oxidierte Komponenten des Systems wieder zu reduzieren, um die Aktivität des Enzyms zu erhalten.

Schließlich stellt sich die Frage, welche Rolle die Redoxregulation der Sulfidoxidation bei *A. marina in vivo* spielen könnte. Hohe Schwefelwasserstoffkonzentrationen treten in marinen Sedimenten häufig in Verbindung mit Sauerstoffmangel auf. In dieser Situation kann

der Wattwurm Sulfid nur langsam oxidieren. Gerade wenn der Sauerstoffpartialdruck nach einer Hypoxie wieder ansteigt, produzieren Mitochondrien vermehrt reaktive Sauerstoffspezies. So entsteht z.B. ein Großteil der Gewebeschäden (ischemia-reperfusion injury), die als Folge von Sauerstoffmangel beim Herzinfarkt und Schlaganfall oder nach Transplantationen auftreten (Li & Jackson 2002). In dieser Situation kann das akkumulierende Sulfid einerseits aufgrund seiner antioxidativen Wirkung vor oxidativen Schäden schützen (Geng et al. 2004, Whiteman et al. 2005). Andererseits würde den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit zufolge der hohe Redoxstatus der Zellen den energiekonservierenden Sulfidoxidationsweg begünstigen und die Alternative Oxidase hemmen. Dadurch kann der noch knappe Sauerstoff gleichzeitig zur ATP-Produktion und zur Sulfidentgiftung genutzt werden und wird somit so sparsam wie möglich verwendet. Steigt die Sulfidkonzentration dagegen bei guter Sauerstoffversorgung plötzlich an, wäre der Redoxstatus der Zellen niedrig, und eindringendes Sulfid würde ohne ATP-Produktion entgiftet. In diesem Fall könnten anschließend die Metabolite des Citratcyclus zur vergleichsweise effektiveren ATP-Produktion eingesetzt werden. Zu diesem Modell passen auch die ermittelten Sauerstoffaffinitäten der verschiedenen Oxidasen der Wattwurmmitochondrien. Die Cytochrom c Oxidase hat mit einem K_m -Wert von $0,9 \mu\text{M}$ die höchste Sauerstoffaffinität. Bei hypoxischen Bedingungen würde also der energiekonservierende Oxidationsweg begünstigt. Die Alternative Oxidase benötigt eine etwas höhere Sauerstoffkonzentration, um ihre volle Aktivität zu entfalten, was sich im höheren K_m -Wert von $5,4 \mu\text{M}$ niederschlägt. Die Schwefeldioxygenase hat die niedrigste Sauerstoffaffinität (K_m -Wert = $14,2 \mu\text{M}$), so dass diese letzte Oxidationsstufe bei Sauerstoffmangel als erstes wegfällt. Wie schon für den Sipunculiden *Ph. arcuatum* und den Schlammpringer *B. boddaerti* beschrieben (Ip et al. 1997, 2004), könnte auch der Wattwurm bei Hypoxie Sulfid zunächst zu Sulfanschwefel oxidieren und entweder in dieser Form als Endprodukt ausscheiden oder mit Hilfe der SDO und der Schwefeltransferase weiter zu Thiosulfat oxidieren, wenn wieder ausreichend Sauerstoff zur Verfügung steht. Die Alternativen Oxidasen von Pflanzenmitochondrien haben ebenfalls eine niedrigere Sauerstoffaffinität als die Cytochrom c Oxidase. Für verschiedene Gewebe der Sojapflanze, *Glycine max*, wurden K_m -Werte zwischen $1,6 \mu\text{M}$ und $9,9 \mu\text{M}$ O_2 für die Alternative Oxidase und von $0,05 \mu\text{M}$ bis $0,15 \mu\text{M}$ O_2 für die Cytochrom c Oxidase ermittelt (Millar et al. 1994, 1997). Der K_m -Wert der Cytochrom c Oxidase von Säugetieren liegt in einem ähnlichen Bereich von etwa $0,08$ - $0,8 \mu\text{M}$ (Gnaiger et al. 1998).

4.2.4 Energiekonservierende Sulfidoxidation

Der energiekonservierende Sulfidoxidationsweg, bei dem die Elektronen über die Komplexe III und IV der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden, wird in Watt-

wurmmitochondrien, wie oben beschrieben, nur unter bestimmten Umständen genutzt. In Säugetiermitochondrien ist dieser Weg dagegen nach bisherigen Erkenntnissen die einzige Möglichkeit, Sulfid zu oxidieren. Die Frage nach dem Energiebedarf ist also in diesem Fall nicht entscheidend, ebensowenig wie das Sauerstoffangebot, denn Säugetiere sind im Gegensatz zu Invertebraten wenig hypoxietolerant. Die Leber wird über den Blutkreislauf jederzeit ausreichend mit Sauerstoff versorgt. Die Effektivität der Sulfidentgiftung hängt ausschließlich davon ab, inwiefern eine Hemmung der Atmungskette durch Sulfid verhindert werden kann. Während der reine Entgiftungsvorgang eine möglichst schnelle Oxidation sämtlichen Sulfids erfordern würde, stellt die Signalwirkung dieses Moleküls eine zusätzliche Herausforderung dar. Der Sulfidabbau und damit das Ende des Signals sollte flexibel regulierbar sein. Daher ist ein komplizierter, mehrstufiger Prozess mit vielen Stellschrauben zu erwarten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit quantifizieren erstmals die Sulfidoxidation bei Säugetiermitochondrien anhand der Raten des Sauerstoffverbrauchs und der ATP-Produktion. Darüber hinaus werden erste Hinweise auf die Möglichkeit einer Regulation vorgestellt, denn Glutamat aktiviert signifikant die Sulfidoxidation bei Rattenlebermitochondrien. Der Weg der Elektronen aus der Sulfidoxidation in der Atmungskette wird durch die Aktivierung nicht verändert. Auch in Anwesenheit von Glutamat sind die Komplexe III und IV für die Sulfidatmung erforderlich, denn die Inhibitoren Myxothiazol und KCN hemmen den Sauerstoffverbrauch und die ATP-Produktion vollständig. Die Situation ist also mit dem durch DHA aktivierbaren Sulfidoxidationsweg der Wattwurmmitochondrien vergleichbar. Tatsächlich stimuliert DHA auch die Sulfidatmung der Rattenlebermitochondrien, allerdings ist der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt als mit Glutamat.

4.2.4.1 Sauerstoffverbrauch und ATP-Produktion

Bei allen bisher untersuchten Tieren sind die Raten der energiekonservierenden mitochondrialen Sulfidoxidation abhängig von der eingesetzten Sulfidkonzentration (Bagariano & Vetter 1990, Oeschger & Vismann 1994, Völkel & Grieshaber 1997, Hahlbeck et al. 2000, Yong & Searcy 2001). Der Sauerstoffverbrauch ist bei der Oxidation niedriger Sulfidkonzentrationen durch ADP stimulierbar, es wird also ein Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran aufgebaut, so dass ATP produziert werden kann. Sulfidkonzentrationen bis etwa 20 μM ermöglichen maximale Oxidationsraten verbunden mit ATP-Produktion. Wenn ausschließlich Sulfid als Substrat eingesetzt wurde, verliefen die Raten des Sauerstoffverbrauchs und der ATP-Produktion bei den Rattenleber- und Wattwurmmitochondrien in gleicher Weise konzentrationsabhängig. Die Sulfidatmung erreichte mit

5 bis 20 μM Sulfid ihr Maximum und wurde darüber hinaus zunehmend gehemmt, so dass 100 μM Sulfid nicht mehr als Substrat eingesetzt werden konnte. Durch die Aktivatoren Glutamat und DHA ließ sich der Konzentrationsbereich erweitern, in dem Sulfid problemlos von den Mitochondrien veratmet wurde. Die Oxidationsrate von 50 μM Sulfid und auch die Rate der ATP-Produktion übertrafen bei den Rattenlebermitochondrien in Gegenwart von Glutamat sogar die maximalen Raten, die ohne diese Aminosäure nur mit wesentlich niedrigeren Sulfidkonzentrationen erreicht wurden. Erst bei einer Sulfidkonzentration von 100 μM war eine leichte Hemmung feststellbar. Bei den Wattwurmmitochondrien ließ sich mittels DHA die maximale Rate der Sulfidatmung nicht weiter steigern, aber sie wurde auch mit vergleichsweise hohen Sulfidkonzentrationen erreicht, so dass selbst bei der höchsten eingesetzten Substratkonzentration von 100 μM Sulfid noch keine Hemmung auftrat.

Da die mitochondriellen Atmungsraten sich in unterschiedlichen Organismen und verschiedenen Geweben sehr stark unterscheiden, ist es notwendig, außer Sulfid auch ein anderes Substrat einzusetzen, um einschätzen zu können, welche Rolle die Sulfidoxidation im Gesamtstoffwechsel des jeweils betrachteten Tieres einnehmen könnte. Auch dieser Vergleich kann nur vage Tendenzen aufzeigen, denn schließlich sind die Mitochondrien *in vivo* nicht isoliert, sondern in die diversen Stoffwechselvorgänge der Zelle eingeschlossen. Die aktivierten Raten der Sulfidatmung sind vermutlich schon eine bessere Annäherung an die Situation im Gesamtorganismus, aber wahrscheinlich existieren noch zahlreiche andere Einflüsse, die bisher nicht berücksichtigt werden können. Die Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* oxidierten Sulfid in niedrigen Konzentrationen von etwa 5-10 μM bei 15 °C mit einer maximalen Rate von etwa 18 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Somit entsprach der Sauerstoffverbrauch ziemlich exakt der Rate der Succinatatmung. In Gegenwart von 1 mM DHA ließ sich diese Rate über den gesamten untersuchten Konzentrationsrahmen von 5 bis 100 μM Sulfid hervorrufen. Die Wattwurmmitochondrien können also unter den geeigneten Bedingungen Sulfid genauso effektiv wie das Atmungssubstrat Succinat oxidieren.

Die Mitochondrien aus der Rattenleber oxidierten Succinat dagegen etwa viermal so schnell wie Sulfid, wenn keine weiteren Metabolite zugesetzt wurden. Bei 25 °C wurde eine Sauerstoffverbrauchsrate von 60 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ für die Succinatatmung in state 3 ermittelt, die gut mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen übereinstimmt (Kantrow et al. 1997, Carlson et al. 2005). Ein ähnliches Verhältnis wurde für Hühnerlebermitochondrien beschrieben, die Succinat mit etwa 36 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ und Sulfid mit nur maximal 7,2 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ oxidieren (Yong & Searcy 2001). In Anwesenheit von 8 mM Glutamat wurde die Sulfidoxidationsrate der Rattenlebermitochondrien in etwa verdoppelt und erreichte dadurch die Hälfte der Succinatatmung.

Kürzlich wurde auch bei permeabilisierten Colonzellen der menschlichen Krebszelllinien HT-29 und CaCo2 sowie bei Rattencolonocyten ein sulfidbedingter Sauerstoffverbrauch nachgewiesen, der mit einer Energetisierung der Mitochondrien verbunden ist (Goubert et al. 2007). Der maximale Sauerstoffverbrauch, der durch Sulfid in niedrigen mikromolaren Konzentrationen hervorgerufen wird, entspricht ebenfalls etwa 50 % der Rate der Succinatatmung.

Die Mitochondrien anderer sulfidadaptierter Tiere zeigen mit Sulfid als einzigem Substrat ähnliche Tendenzen. Die Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauchgewebe der Polychaeten *N. diversicolor* und *M. viridis* oxidieren 15 μM Sulfid etwa halb so schnell wie Succinat mit Raten von 4-5 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ bzw. 9-10 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ (Hahlbeck et al. 2000), ähnlich wie die Lebermitochondrien der Fische *F. parvipinnis* und *C. stigmaeus* (Bagarinao & Vetter 1990). Die Möglichkeit einer Regulation der Sulfidoxidation wurde bei diesen Tieren noch nicht untersucht. Es könnte sich also bei den ermittelten Werten wie beim Wattwurm bereits um die maximalen Oxidationsraten handeln, die durch Aktivatoren möglicherweise auch mit höheren Sulfidkonzentrationen erreichbar wären. Andererseits wäre es auch möglich, dass wie bei den Rattenlebermitochondrien die Sulfidoxidation auch mit niedrigen Konzentrationen ohne Aktivatoren nicht voll funktionsfähig ist und unter optimalen Bedingungen höhere Raten erreicht werden könnten. Die Kiemenmitochondrien der Muschel *G. demissa* dagegen zeigen mit 5 μM Sulfid als Substrat die mit Abstand höchsten Sauerstoffverbrauchsraten von etwa 38 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$, die sogar die Succinatatmung (23 $\text{nmol O}_2 \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) bei Weitem übertreffen (Parrino et al. 2000). Die mitochondrielle Sulfidoxidation dieses an extrem hohe Sulfidkonzentrationen angepassten Tieres ist also entweder unabhängig von Modulatoren, oder diese sind auch nach der Mitochondrienpräparation noch in ausreichend hoher Konzentration in der Mitochondriensuspension vorhanden, um die Sulfidoxidation mit den beobachteten hohen Raten zu ermöglichen.

Besonders bei Tieren aus sulfidhaltigen Lebensräumen war in vorhergehenden Studien die Frage von Interesse, ob Sulfid nur entgiftet wird oder auch zur ATP-Gewinnung dienen kann. Daher wurde häufig der Respiratorische Kontrollfaktor der Sulfidoxidation oder die Rate der ATP-Produktion ermittelt. Völkel und Grieshaber (1997) geben für die Veratmung von 6-9 μM Sulfid durch Wattwurmmitochondrien einen RCR von 1,7 an. Auch bei anderen sulfidadaptierten Invertebraten liegen die Respiratorischen Kontrollfaktoren für die mitochondrielle Sulfidoxidation im gleichen Rahmen zwischen 1,4 und 1,8 (Powell & Somero 1986, Oeschger & Vismann 1994, Hahlbeck et al. 2000, Parrino et al. 2000). Über die Stimulierbarkeit der Sulfidoxidation in Säugetiermitochondrien durch ADP war bisher noch nichts bekannt, und auch für andere Organismen, die nicht aus sulfidhaltigen Lebensräumen stammen, fehlen die entsprechenden Informationen. Alle untersuchten Mi-

tochondrien waren bei der Sulfidoxidation weniger deutlich gekoppelt, als mit Substraten des Citratcyclus. Für die Succinatatmung liegen die Kopplungsfaktoren bei Invertebraten etwa bei 3 und mit Malat als Substrat etwas höher (O'Brien & Vetter 1990, Völkel & Grieshaber 1997, Hahlbeck et al. 2000, Parrino et al. 2000). Ähnliche Werte wurden auch für Rattenlebermitochondrien publiziert, mit Kopplungsfaktoren zwischen 3 und 6 (Devi & Chan 1997, Carlson et al. 2005, Sorensen et al. 2006). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mitochondrien aus dem Hautmuskelschlauch von *A. marina* und der Rattenleber zeigten ebenfalls vergleichbare Respiratorische Kontrollfaktoren von 1,9 - 6,9 bzw. 3,9 - 6,0 mit Substraten des Citratcyclus. Mit 5 μM Sulfid als Substrat ergab sich für die Wattwurmmitochondrien ein RCR von 2,4. In Anwesenheit von DHA waren die Mitochondrien im gesamten untersuchten Bereich, also mit bis zu 100 μM Sulfid, mit einem RCR von 2,1 sogar etwas stärker gekoppelt, als die der anderen bisher untersuchten Invertebraten mit niedrigen Sulfidkonzentrationen. Die Sulfidatmung der Rattenlebermitochondrien verhielt sich ähnlich. Wurde Sulfid (5-20 μM) als einziges Substrat eingesetzt, ergab sich ein RCR von 1,6. Mittels Glutamat ließ sich der Respiratorische Kontrollfaktor auf 2,8 steigern und erreichte somit fast die Werte der Kohlenstoffsubstrate. Außerdem war selbst die Oxidation von 100 μM Sulfid durch ADP stimulierbar und wurde somit zur ATP-Produktion genutzt. Bei den Raten der sulfidbedingten ATP-Produktion ergaben sich erwartungsgemäß die gleichen Tendenzen wie beim Sauerstoffverbrauch. Während die Wattwurmmitochondrien mit Sulfid als Substrat etwa halb so viel ATP produzierten wie mit Succinat, erreichten die Rattenlebermitochondrien nur ein Sechstel, bzw. nach Stimulation mit Glutamat etwa ein Viertel der entsprechenden Rate. Sehr ähnliche Verhältnisse wie für die Mitochondrien von *A. marina* wurden auch für *S. reidi*, *M. viridis* und *N. diversicolor* ermittelt (Powell & Somero 1986, Hahlbeck et al. 2000). Nur *G. demissa* produziert bei der Sulfidoxidation deutlich mehr, nämlich fünfmal so viel ATP wie mit Succinat als Substrat (Parrino et al. 2000). Diese Muschel kann den ATP-Bedarf für den Cilienschlag ihrer Kiemen aus der Sulfidoxidation decken und bevorzugt besonders sulfidreiche Bereiche ihres Habitats, so dass sie offenbar Sulfid in stärkerem Maße als die anderen bisher untersuchten Tiere zur Energiegewinnung nutzt (Lee et al. 1996, Doeller et al. 1999, 2001). Auch Hühnerlebermitochondrien produzieren ATP, wenn sie mit sehr niedrigen Sulfidkonzentrationen konfrontiert werden (Yong & Searcy 2001). Obwohl sie diese Fähigkeit nicht quantitativ erfassen konnten, leiteten die Autoren daraus ab, dass Mitochondrien die entsprechende Enzymausstattung schon seit ihrer Entstehung besaßen und es sich nicht um eine spezielle Anpassung sulfidadaptierter Tiere handelt. Diese Vermutung lässt sich durch die hier vorgestellten Ergebnisse zur ATP-Produktion von Rattenlebermitochondrien bestätigen.

4.2.4.2 Aktivierung der energiekonservierenden Sulfidoxidation

Die Aminosäure Glutamat aktiviert die Sulfidatmung isolierter Rattenlebermitochondrien. Die Succinatoxidation wird dagegen durch Sulfid in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen gehemmt, was auch schon bei anderen Tieren, z.B. dem Huhn, festgestellt wurde (Yong & Searcy 2001). Glutamat hat also offenbar eine spezifische Wirkung, die nicht alleine auf der Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten beruhen kann. Es wäre interessant zu testen, ob die Sulfidatmung der Hühnerlebermitochondrien sich ebenfalls durch Glutamat aktivieren lässt. Glutamat spielt eine zentrale Rolle im Aminosäurestoffwechsel und verbindet den Ammoniaktransport, die Stickstoffausscheidung, die Aminosäuresynthese und den Abbau des Kohlenstoffgerüsts von Aminosäuren im Citratcyclus (Kelly & Stanley 2001). Aminotransferasen katalysieren die reversible Übertragung von Aminogruppen zwischen Glutamat und verschiedenen anderen Aminosäuren. Dadurch wird der Stickstoff für die Aminosäuresynthese gespeichert. Außerdem verläuft auch der Aminosäureabbau über die Zwischenstufe Glutamat, das durch die Glutamatdehydrogenase oxidativ zu α -Ketoglutarat und Ammoniak desaminiert werden kann (Brusilow & Horwich 1995). In der Leber wird der freigesetzte Ammoniak im Harnstoffcyclus weiter für die Stickstoffausscheidung umgesetzt, so dass die intrahepatische Glutamatkonzentration, die zwischen 2 und 4 mM liegt, die Rate der Harnstoffsynthese reguliert (Griffith 1999, Kelly & Stanley 2001). Die Leber enthält somit einige zusätzliche Enzyme des Aminosäurestoffwechsels, die in anderen Geweben nicht zu finden sind. Möglicherweise sind diese an der regulatorischen Funktion des Glutamats in Lebermitochondrien beteiligt. So ließe sich die Beobachtung erklären, dass Glutamat in den Mitochondrien des Hautmuskelschauchs von *A. marina* keinen Einfluss auf die Sulfidoxidation hatte. DHA aktivierte dagegen die energiekonservierende Sulfidoxidation bei den Mitochondrien beider Versuchstiere. Dieser Reaktion liegt also offenbar ein weiter verbreiteter Mechanismus zugrunde. Grundsätzlich müssen beide als Aktivatoren identifizierten Substanzen, Glutamat und DHA, in der Lage sein, die Substrathemmung der mitochondrialen Sulfidoxidation zu verhindern.

Die Cytochrom c Oxidase aller bisher untersuchten Organismen wird durch nanomolare oder niedrige mikromolare Sulfidkonzentrationen gehemmt. Völkel und Grieshaber (1997) ermittelten eine halbmaximale Hemmung mit $1,5 \mu\text{M}$ Sulfid anhand isolierter Wattwurmmitochondrien. Für die Cytochrom c Oxidase-Aktivität in den Mitochondrien des Polychaeten *Halicryptus spinulosus* wurde ein IC_{50} von $0,37 \mu\text{M}$ Sulfid publiziert (Oeschger & Vismann 1994). Auch bei Lebermitochondrien der Fische *F. parvipinnis* und *C. stigmatheus* liegt der IC_{50} der Cytochrom c Oxidase für Sulfid zwischen $0,03$ und $0,21 \mu\text{M}$ (Bagariano & Vetter 1989). Die Oxidationsrate von Ferricytochrom c durch isolierte Mitochondrien aus der Rattenlunge wird durch $1,2 \mu\text{M}$ Sulfid halbmaximal gehemmt (Khan

et al. 1990). Dabei handelt es sich um eine nicht-kompetitive Hemmung, die auch anhand isolierter Cytochrom c Oxidase aus Rinder- und Pferdeherz nachgewiesen wurde (Petersen 1977, Wilms et al. 1980). Es war also zu erwarten, dass im Enzymtest die Cytochrom c Oxidase der Wattwurm- und Rattenmitochondrien durch die eingesetzten $10 \mu\text{M}$ Sulfid weitgehend gehemmt werden würde, was auch tatsächlich zu beobachten war.

Glutamat und DHA ermöglichen es den Mitochondrien, Sulfid auch in Gegenwart vergleichsweise hoher Konzentrationen energiekonservierend zu oxidieren. Laut der Inhibitorstudien ist die Cytochrom c Oxidase an dieser Reaktion beteiligt. Also lag die Vermutung nahe, dass Glutamat und DHA eine Hemmung der Cytochrom c Oxidase durch Sulfid verhindern könnten. Zumindest im Aktivitätstest für die Cytochrom c Oxidase ließ sich ein solcher Effekt allerdings nicht nachweisen. Unabhängig davon, ob zusätzlich Glutamat oder DHA im Ansatz vorhanden war, wurde die Oxidation extern zugegebenen Cytochrom c's durch $10 \mu\text{M}$ Sulfid gestoppt. Diese Diskrepanz könnte durch die unterschiedlichen Versuchsbedingungen im Vergleich zu den Messungen des Sauerstoffverbrauchs und der ATP-Produktion zu erklären sein. Möglicherweise reißen die Mitochondrienmembranen durch das hypoosmotische Reaktionsmedium im Aktivitätstest für Komplex IV, so dass die Hemmung durch Sulfid nur unter den spezifischen Versuchsbedingungen nicht verhindert wird.

Eine andere, sehr spekulative Erklärungsmöglichkeit basiert auf der Feststellung, dass sich einige Atmungskettenkomplexe der Mitochondrien von Eukaryoten flexibel aber recht stabil zusammenlagern können. Solche als Respirasome bezeichneten Superkomplexe wurden in Mitochondrien von Tieren, Pflanzen und Pilzen nachgewiesen (Schägger & Pfeiffer 2001, Eubel et al. 2003, Bianchi et al. 2004, Krause et al. 2004). Sie bestehen meistens aus den Komplexen I und III und sind häufig zusätzlich mit der Cytochrom c Oxidase verbunden, so dass die Elektronen durch einen einzigen Enzymkomplex (z.B. $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_4$) von NADH auf Sauerstoff übertragen werden können (Bianchi et al. 2004). Eine Hauptfunktion der Superkomplexe wird im Substratchanneling als Kontrollmechanismus gesehen, denn sowohl Ubichinon als auch Cytochrom c werden in den Superkomplexen eingeschlossen und müssen so nicht mehr durch den Pool zu den einzelnen Enzymen diffundieren (Schägger & Pfeiffer 2001, Eubel et al. 2003, Bianchi et al. 2004, Krause et al. 2004). Die Superkomplexe werden einerseits durch die relativ starre Organisation der Matrix, in der sich die Enzyme des Citratcyclus zu einem Metabolon zusammenlagern, andererseits aber auch durch den engen Kontakt zwischen der äußeren und der inneren Mitochondrienmembran fixiert. Die Komplexe III und IV interagieren zusätzlich über Transmembranhelices von Cytochrom b und c_1 sowie Kernkomponenten von Komplex IV (Lenaz & Genova 2007). Mit der Bildung solcher Respirasome ließe sich die Beobachtung erklären, dass weder Glutamat noch DHA die Hemmung der Cytochrom c Oxidase im Aktivitätstest verhindern konnte.

Durch Sulfid und andere Modulatoren lagern sich möglicherweise Superkomplexe aus Komplex III und IV und vermutlich noch weiteren Mitochondrienproteinen zusammen. Die angelagerten Proteine schützen das aktive Zentrum der Cytochrom c Oxidase vor der Hemmung durch Sulfid. Allerdings wird in den Respirasomen auch Cytochrom c eingeschlossen und kann nicht mehr aus dem Pool an Komplex IV herandiffundieren. Im Enzymtest wird ausschließlich die Oxidationsrate extern zugegebenen Cytochrom c's bestimmt. Da dieses nicht in die Superkomplexe eindringen kann, wird durch den Enzymtest nur die Aktivität der frei vorliegenden Moleküle der Cytochrom c Oxidase gemessen und nicht die derjenigen Enzyme, die Teil eines Superkomplexes sind. Zu dieser Vorstellung passt der ausbleibende Effekt von Glutamat und DHA, denn diese beiden Substanzen würden die Cytochrom c Oxidase nur in Form von Respirasomen vor der Hemmung durch Sulfid schützen, die wiederum im Enzymtest nicht erfasst werden können.

Bei den schützenden Proteinen, die sich mit der Cytochrom c Oxidase verbinden, könnte es sich um Matrixenzyme handeln. Für Komplex I wurde bereits mehrfach gezeigt, dass einige Enzyme, wie z.B. die Pyruvatdehydrogenase, die Malatdehydrogenase und die α -Ketoglutarat-Dehydrogenase sich reversibel anlagern können (Sumegi & Srere 1984, Ovadi et al. 1994). Vermutlich dient diese Verbindung dem Substratchanneling, denn die Dehydrogenasen produzieren NADH, das von Komplex I reoxidiert wird. Glutamat könnte z.B. die Anlagerung der Glutamatdehydrogenase an Superkomplexe aus den Atmungskettenkomplexen I, III und IV bewirken. Dadurch könnte das produzierte NADH direkt in die Atmungskette eingespeist werden, und durch die räumliche Nähe wäre als Nebeneffekt der Schutz der Cytochrom c Oxidase für die Sulfidoxidation denkbar. Weitere Versuche sind jedoch notwendig, um zu überprüfen, ob die Zahl der Superkomplexe mit der Effektivität der Sulfidoxidation korreliert.

In pflanzlichen Mitochondrien dient die Respirasombildung wahrscheinlich auch dazu, den Elektronenfluß zwischen dem energiekonservierenden Oxidationsweg über die Komplexe III und IV sowie der Alternativen Oxidase aufzuteilen (Eubel et al. 2003). Die Alternative Oxidase wurde bisher nicht als Bestandteil eines Superkomplexes gefunden. Diese Vorstellung ist gut mit dem Modell der verzweigten Atmungskette von *A. marina* vereinbar. Der in Gegenwart von GSH und Ascorbat aktivierte entgiftende Sulfidoxidationsweg benötigt nur die SQR und die Alternative Oxidase, die unabhängig von Respirasomen über den Ubichinon-Pool in Verbindung stehen (Abb. 4.3, A). DHA könnte dagegen die Assemblierung von Superkomplexen begünstigen, so dass die Elektronen aus der Sulfidoxidation von der SQR über ein solches Respirasom auf Sauerstoff übertragen würden (Abb. 4.3, B). Da die Mitochondrien von Säugetieren wahrscheinlich keine Alternative Oxidase enthalten, steht in den Rattenlebermitochondrien ausschließlich der energiekonservierende

Sulfidoxidationsweg zur Verfügung, der durch DHA oder Glutamat aktiviert werden kann (Abb. 4.3, B).

Die Cytochrom c Oxidase kann reversibel phosphoryliert werden, was als Kontrollmechanismus der mitochondrialen Atmung und der Produktion radikaler Sauerstoffspezies dient (Lee et al. 2002). Nur in phosphorylierter Form ist Komplex IV allosterisch inhibierbar durch ATP. Ca^{2+} aktiviert eine Proteinphosphatase, die daraufhin die Cytochrom c Oxidase dephosphoryliert und so die allosterische Hemmbarkeit ausschaltet. In ähnlicher Weise könnte auch die Konzentration von Glutamat oder anderen, noch nicht untersuchten Metaboliten Teil der Regulation der Atmungskette durch Sulfid sein. In seiner Funktion als Signalmolekül würde Sulfid außerdem bei niedrigen Glutamatkonzentrationen länger erhalten bleiben, da die Oxidationsrate geringer wäre. Umgekehrt würden hohe Glutamatkonzentrationen das Signal aufgrund der effektiveren Sulfidoxidation verkürzen, so dass auch die Hemmbarkeit der Cytochrom c Oxidase Teil und Stellschraube des Regulationsweges sein könnte.

Die hier beschriebenen Regulationsmechanismen der mitochondrialen Sulfidoxidation könnten auch *in vivo* von Bedeutung sein, denn alle eingesetzten Aktivatoren sind intrazellulär in ähnlichen Konzentrationen vorhanden. Höchstwahrscheinlich existieren aber zusätzlich noch zahlreiche andere Regulationsmöglichkeiten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen deutlich, dass die einzelne Zelle und darüber hinaus der ganze Organismus wesentlich mehr Möglichkeiten hat, mit Sulfid umzugehen, als isolierte Mitochondrien oder Enzyme. Daher kann aus den Hemmkonstanten der Cytochrom c Oxidase oder den niedrigen Oxidationsraten isolierter Mitochondrien noch keine umfassende Aussage über die Giftigkeit von Sulfid für die betrachteten Organismen getroffen werden. Die Sulfidtoleranz eines Tieres hängt neben einem effektiven Entgiftungsweg außerdem von anderen Faktoren ab, wie z.B. der Ausprägung anaerober Stoffwechselwege und dem Aufbau des Nervensystems. Dennoch deuten auch die Ergebnisse einiger vorhergehender Studien darauf hin, dass es im Gewebe aktivierende Faktoren für die Sulfidoxidation geben muss. Die Muschel *G. demissa* beispielsweise toleriert in ihrem Lebensraum millimolare Sulfidkonzentrationen (Lee et al. 1996). Einzelne Kiemenstücke oxidieren bis zu 200 μM Sulfid mit maximaler Rate, wohingegen isolierte Mitochondrien bereits ab 8 μM Sulfid gehemmt werden (Lee et al. 1996, Parrino et al. 2000). Die Cytochrom c Oxidase der Mitochondrien aus *A. marina* ist laut Aktivitätstest durch Sulfid in niedrigen mikromolaren Konzentrationen inhibierbar. Trotzdem ist eine ATP-Synthese mit wesentlich höheren Sulfidkonzentrationen möglich und sogar maximal, welche die Cytochrom c Oxidase eigentlich schon vollständig hemmen sollten (Völkel & Grieshaber 1997). Auch isolierte Mitochondrien der Fische *F. parvipinnis* und *C. stigmaeus* sowie des Polychaeten *H. spinulosus* zeigen maximale Oxidationsraten und produzieren ATP in Anwesenheit von Sulfidkonzentrationen, die ei-

nem Vielfachen der im nanomolaren Bereich liegenden IC_{50} -Werte entsprechen, die für die Cytochrom c Oxidasen dieser Tiere ermittelt wurden (Bagariano & Vetter 1998, 1990, Oeschger & Vismann 1994). Schließlich wurde auch in Geweben von Säugetieren Sulfid in unerwartet hohen Konzentrationen gefunden (Wang 2002). Das Rattengehirn enthält z.B. bei gesunden Tieren etwa $50 \mu\text{M}$ Sulfid und wird dadurch offensichtlich nicht vergiftet (Warenycia et al. 1989). Also muss auch das Gehirngewebe Schutzmechanismen besitzen, die eine Beeinträchtigung durch Sulfid in physiologischen Konzentrationen verhindern. Im Verlauf der letzten Jahre hat sich das Bild von Sulfid als Gift aufgrund zahlreicher neuer Erkenntnisse grundlegend verändert. Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Reaktionssequenz und einiger Regulationsmöglichkeiten der mitochondrialen Sulfidoxidation tragen dazu bei, den Sulfidstoffwechsel bei Säugetieren und Invertebraten besser zu verstehen. Dennoch wird deutlich, dass Sulfid eine noch weitgehend unbekanntere Rolle im Stoffwechsel von Tieren spielt.

5 Zusammenfassung

Sulfid war zunächst als Gift bekannt, bevor seine Rolle als Energielieferant mariner Invertebraten entdeckt wurde und sich schließlich vor einigen Jahren herausstellte, dass H_2S auch als Signalmolekül dienen kann. Die genauen Mechanismen dieser Wirkungsweisen des Sulfids wurden bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Der Stoffwechselweg der enzymatischen Oxidation von Sulfid ist bei allen drei Aspekten von Bedeutung, denn er kann sowohl der Entgiftung dienen als auch das Signal beenden und ist außerdem unter bestimmten Umständen mit einer ATP-Produktion verbunden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit dem Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation bei dem sulfidadaptierten Invertebraten *Arenicola marina* und der Ratte als Beispiel eines Säugetieres. Eine Reaktionssequenz aus drei enzymatischen Schritten wurde identifiziert, die in den Mitochondrien des Wattwurms genauso wie in Rattenlebermitochondrien Sulfid zu Thiosulfat umsetzt. Die an die innere Mitochondrienmembran gebundene Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase (SQR), die bei *A. marina* bereits bekannt war, oxidiert auch in Säugetiermitochondrien Sulfid zu Persulfiden, also Schwefel der Oxidationsstufe Null, und überträgt die Elektronen dabei auf Ubichinon. Eine Schwefeldioxygenase in der mitochondrialen Matrix oxidiert im zweiten Schritt den Sulfanschwefel unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff und Wasser zu Sulfit. Anschließend überträgt eine Schwefeltransferase ein weiteres Persulfid von der SQR auf Sulfit, und als Endprodukt der mitochondrialen Sulfidoxidation entsteht Thiosulfat. Die an dieser Reaktion beteiligte Schwefeltransferase aus den Rattenlebermitochondrien wurde bis zur Homogenität gereinigt und als Rhodanase identifiziert. Die Persulfidübertragung auf Sulfit bei der Sulfidoxidation ist also offenbar eine weitere physiologische Funktion dieses in allen Reichen des Lebens vorhandenen Enzyms, dessen Bedeutung für den Stoffwechsel noch umstritten ist.

Während die Enzyme zur Thiosulfatproduktion aus Sulfid offenbar Bestandteil des allgemeinen mitochondrialen Schwefelstoffwechsels sind, erfolgt eine spezifische Anpassung an sulfidhaltige Lebensräume den vorliegenden Ergebnissen zufolge auf der Ebene der Atmungskette. Diese ermöglicht außerdem eine Regulation der Sulfidoxidation. Die Säu-

getiermitochondrien aus der Rattenleber übertragen die Elektronen aus dem ersten Oxidationsschritt von der SQR über die Komplexe III und IV der Atmungskette auf Sauerstoff und produzieren dabei ATP. Glutamat verhindert durch einen noch unbekanntem Mechanismus die Hemmung der Cytochrom c Oxidase durch Sulfid und ermöglicht dadurch, dass Sulfid auch in vergleichsweise hohen Konzentrationen von bis zu 100 μM von den Lebermitochondrien umgesetzt werden kann. Ohne Glutamat wird die ATP-Produktion dagegen, wie bei allen bisher untersuchten Tieren, bereits ab etwa 20 μM Sulfid gehemmt. Als Anpassung an die erhöhten Sulfidkonzentrationen und die hypoxischen Bedingungen in seinem Lebensraum besitzt der Wattwurm darüber hinaus eine verzweigte Atmungskette, die zusätzliche Regulationsmöglichkeiten für die Sulfidoxidation bietet. Glutathion und Ascorbat bzw. Dehydroascorbat wurden als spezifische Aktivatoren für den entgiftenden und den energiekonservierenden Sulfidoxidationsweg bei *A. marina* identifiziert. In Abhängigkeit vom Redoxzustand werden die Elektronen entweder ohne Protonentranslokation durch eine Alternative Oxidase direkt vom Ubichinon-Pool auf Sauerstoff übertragen oder nehmen wie bei den Säugetiermitochondrien den mit ATP-Produktion verbundenen Weg über die Komplexe III und IV der Atmungskette.

6 Abstract

Hydrogen sulfide has been known as a toxic pollutant long before its physiological functions became apparent. Nevertheless, the exact mechanisms of sulfide toxicity and signaling as well as its exploitation in sulfide-adapted invertebrates remain to be elucidated. A pathway for sulfide oxidation might contribute to all of these aspects, as it potentially takes part in sulfide detoxification as well as in ATP-production and furthermore eliminates the signal molecule H₂S.

Three enzymes have been identified, which are required for thiosulfate production from hydrogen sulfide in the mitochondria of the sulfide adapted invertebrate lugworm *Arenicola marina* and in the vertebrate rat liver mitochondria. The first step is catalyzed by a membrane-bound sulfide:quinone oxidoreductase (SQR), which has already been described for the lugworm. The SQR converts sulfide to sulfane sulfur and transfers the electrons to ubiquinone. Subsequently, a sulfur dioxygenase in the mitochondrial matrix oxidizes the persulfide to sulfite using molecular oxygen and water. The final reaction is catalyzed by a sulfurtransferase, which transfers a second persulfide from the SQR to sulfite, resulting in the final product thiosulfate. The sulfurtransferase was purified to homogeneity from rat liver and identified as rhodanese. Therefore, the transfer of sulfane sulfur to sulfite in the process of sulfide oxidation can be added to the list of physiological functions of an enzyme, that still remains a mystery. As rhodanese is widely distributed in animals, plants and bacteria, it is expected to have further important functions other than cyanide detoxification, which are presently a matter of debate.

Whereas the pathway for sulfide oxidation to thiosulfate seems to be identical in mammals and sulfide adapted invertebrates, adaptations as well as regulatory mechanisms can be found at the level of the respiratory chain. Rat liver mitochondria use the respiratory chain complexes III and IV to transfer the electrons from the first step of sulfide oxidation to oxygen. Therefore, they are able to gain ATP from the process. In the presence of glutamate, cytochrome c oxidase is not completely inhibited by sulfide concentrations as high as 100 μ M. As in all animals studied so far, sulfide supported ATP-production in rat liver mitochondria is inhibited by 20 μ M sulfide without glutamate as an activator.

A branched respiratory chain enables the lugworm to switch to a pathway of rapid sulfide detoxification, which is independent of the ATP-demand. Selective activators of the energy conserving and the detoxifying sulfide oxidation pathway have been identified. In the presence of the ROS scavengers glutathione (GSH) and ascorbate, isolated lugworm mitochondria transfer the electrons from sulfide oxidation to oxygen via an alternative oxidase, which branches off the electron transport chain at the level of ubiquinone. With no proton translocation taking place, this reaction can be regarded as a mere detoxification process. In contrast, dehydroascorbate activates an energy conserving pathway, which requires complex III and IV of the respiratory chain. The present data indicate, that a redox mechanism might contribute to the regulation of sulfide oxidation in lugworm mitochondria *in vivo*.

7 Literatur

- Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuro-modulator. *J Neurosci* 16: 1066-1071
- Affourtit C, Albury MS, Crichton PG, Moore AL (2002) Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett* 510: 121-126
- Aita N, Ishii K, Akamatsu Y, Ogasawara Y, Tanabe S (1997) Cloning and expression of human liver rhodanese cDNA. *Biochem Biophys Res Com* 231: 56-60
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 215: 403-410
- Andreyev AY, Kushnareva YE, Starkov AA (2005) Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Biochemistry (Mosc.)* 70: 200-214
- Appel PWU, Rollinson HR, Touret JLR (2001) Remnants of an early archaean (> 3.75 Ga) sea-floor, hydrothermal system in the Isua Greenstone Belt. *Precambrian Res* 112: 27-49
- Arnold IMF, Dufresne RM, Alleyne BC, Stuart PJW (1985) Health implication of occupational exposures to hydrogen sulfide. *J Occup Environ Med* 27: 373-376
- Bagarinao T (1992) Sulfide as an environmental factor and toxicant - Tolerance and adaptations in aquatic organisms. *Aquat Toxicol* 24: 21-62
- Bagarinao T, Vetter RD (1989) Sulfide tolerance and detoxification in shallow-water marine fishes. *Mar Biol* 103: 291-302
- Bagarinao T, Vetter RD (1990) Oxidative detoxification of sulfide by mitochondria of the California killifish *Fundulus parvipinnis* and the speckled sanddab *Citharichthys stigmæus*. *J Comp Physiol B* 160: 519-527
- Banhegyi G, Braun L, Csala M, Puskas F, Mandl J (1997) Ascorbate metabolism and its regulation in animals. *Free Rad Biol Med* 23: 793-803
- Bartholomew TC, Powell GM, Dodgson KS, Curtis CG (1980) Oxidation of sodium sulfide by rat liver, lungs and kidney. *Biochem Pharmacol* 29: 2431-2437
- Bauer M, Papenbrock J (2002) Identification and characterization of single-domain thio-sulfate sulfurtransferases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 532: 427-431

- Beauchamp RO, Bus JS, Popp JA, Boreiko CJ, Andjelkovich DA (1984) A critical review of the literature on hydrogen sulfide toxicity. *CRC Crit Rev Toxicol* 13: 25-97
- Berg JM, Tymozko JL, Stryer L (2003) *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag
- Berger UV, Lu XCM, Liu WL, Tang ZC, Slusher BS, Hediger MA (2003) Effect of middle cerebral artery occlusion on mRNA expression for the sodium-coupled vitamin C transporter SVCT2 in rat brain. *J Neurochem* 86: 896-906
- Berni R, Musci G, Pallini R, Cannella C (1991) Chemical modification of rhodanese with sulfite. *Free Radic Res Commun* 15: 203-209
- Berthold DA (1998) Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol : oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1364: 73-83
- Berthold DA, Andersson ME, Nordlund P (2000) New insight into the structure and function of the alternative oxidase. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1460: 241-254
- Bian JS, Yong QC, Pan TT, Feng ZN, Ali MY, Zhou SF, Moore PK (2006) Role of hydrogen sulfide in the cardioprotection caused by ischemic preconditioning in the rat heart and cardiac myocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 316: 670-678
- Bianchi C, Genova ML, Castelli GP, Lenaz G (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly - Kinetic evidence using flux control analysis. *J Biol Chem* 279: 36562-36569
- Birkenkamp-Demtroder K, Christensen LL, Olesen SH, Frederiksen CM, Laiho P, Aaltonen LA, Laurberg S, Sorensen FB, Hagemann R, Orntoft TF (2002) Gene expression in colorectal cancer. *Cancer Res* 62: 4352-4363
- Blumenthal KM, Heinrikson RL (1971) Structural studies of bovine liver rhodanese. 1. Isolation and characterization of two active forms of the enzyme. *J Biol Chem* 246: 2430-2437
- Bonomi F, Pagani S, Cerletti P, Cannella C (1977) Rhodanese mediated sulfur transfer to succinate dehydrogenase. *Eur J Biochem* 72: 17-24
- Boulegue J (1978) Solubility of elemental sulfur in water at 298 K. *Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements* 5: 127-128
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brigelius R, Muckel C, Akerboom TPM, Sies H (1983) Identification and quantitation of glutathione in hepatic protein mixed disulfides and its relationship to glutathione disulfide. *Biochem Pharmacol* 32: 2529-2534
- Bronstein M, Schutz M, Hauska G, Padan E, Shahak Y (2000) Cyanobacterial sulfide-quinone reductase: Cloning and heterologous expression. *J Bacteriol* 182: 3336-3344

-
- Brusilow SW, Horowich AL (1995) Urea cycle enzymes. In: Scriver CS, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. (eds.) The metabolic and molecular bases of inherited disease. New York, 1187-1232
- Burnett WW, King EG, Grace M, Hall WF (1977) Hydrogen sulfide poisoning: review of 5 years' experience. *Can Med Assoc J* 117: 1277-1280
- Cannella C, Costa M, Pensa B, Ricci G, Pecci L, Cavallini D (1981) Multiple forms of bovine liver rhodanese. *Eur J Biochem* 119: 491-495
- Carlson DE, Pumplin DW, Ghavam S, Fiedler SM, Chiu WC, Scalea TM (2005) ATP accelerates respiration of mitochondria from rat lung and suppresses their release of hydrogen peroxide. *J Bioenerg Biomembr* 37: 327-338
- Cerletti P (1986) Seeking a better job for an under-employed enzyme: rhodanese. *Trends Biochem Sci* 11: 369-372
- Chai SC, Bruyere JR, Maroney MJ (2006) Probes of the catalytic site of cysteine dioxygenase. *J Biol Chem* 281: 15774-15779
- Chai SC, Jerkins AA, Banik JJ, Shalev I, Pinkham JL, Uden PC, Maroney MJ (2005) Heterologous expression, purification, and characterization of recombinant rat cysteine dioxygenase. *J Biol Chem* 280: 9865-9869
- Chance B (1959) Regulation of cell metabolism. Ciba Found Symp Little, Brown, Boston, Massachusetts: 91-91
- Chaudhuri M, Ajayi W, Hill GC (1998) Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol Biochem Parasitol* 95: 53-68
- Chen X, Jhee KH, Kruger WD (2004) Production of the neuromodulator H₂S by cystathionine β -synthase via the condensation of cysteine and homocysteine. *J Biol Chem* 279: 52082-52086
- Chow SF, Horowitz PM, Westley J, Jarabak R (1985) Evidence for dynamically determined conformational states in rhodanese catalysis. *J Biol Chem* 260: 2763-2770
- Cipollone R, Ascenzi P, Visca P (2007) Common themes and variations in the rhodanese superfamily. *Iubmb Life* 59: 51-59
- Collin M, Thiemermann C (2005) Hydrogen sulfide and sulfite: Novel mediators in the pathophysiology of shock and inflammation. *Shock* 24: 595-596
- Corliss JB, Dymond J, Gordon LI, Edmond JM, Herzen RPV, Ballard RD, Green K, Williams D, Bainbridge A, Crane K, Vanandel TH (1979) Submarine thermal springs on the Galapagos rift. *Science* 203: 1073-1083
- Costa M, Pecci L, Pensa B, Cannella C (1977) Hydrogen peroxide involvement in rhodanese inactivation by dithiothreitol. *Biochem Biophys Res Com* 78: 596-603
- Curtis CG, Bartholomew TC, Rose FA, Dodgson KS (1972) Detoxication of sodium ³⁵S-sulfide in the rat. *Biochem Pharmacol* 21: 2313-2321

- Davis BJ (1964) Disc Electrophoresis - 2: Method and application to human serum proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* 121: 404-427
- de Jong GAH, Tang JA, Bos P, de Vries S, Kuenen JG (2000) Purification and characterization of a sulfite : cytochrome c oxidoreductase from *Thiobacillus acidophilus*. *J Mol Catal B* 8: 61-67
- Demin OV, Kholodenko BN, Skulachev VP (1998) A model of O_2^- generation in the complex III of the electron transport chain. *Mol Cell Biochem* 184: 21-33
- Devi BG, Chan AWK (1997) Impairment of mitochondrial respiration and electron transport chain enzymes during cocaine-induced hepatic injury. *Life Sci* 60: 849-855
- Doeller JE, Grieshaber MK, Kraus DW (2001) Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: thiosulfate production matches ATP demand in ciliated mussel gills. *J Exp Biol* 204: 3755-3764
- Doeller JE, Gaschen BK, Parrino V, Kraus DW (1999) Chemolithoheterotrophy in a metazoan tissue: Sulfide supports cellular work in ciliated mussel gills. *J Exp Biol* 202: 1953-1961
- Doeller JE, Isbell TS, Benavides G, Koenitzer J, Patel H, Patel RP, Lancaster JR, Darley-Usmar VM, Kraus DW (2005) Polarographic measurement of hydrogen sulfide production and consumption by mammalian tissues. *Anal Biochem* 341: 40-51
- Dominy JE, Stipanuk MH (2004) New roles for cysteine and transsulfuration enzymes: production of H_2S , a neuromodulator and smooth muscle relaxant. *Nutr Rev* 62: 348-353
- Edmond JM (1982) The chemistry of ridge crest hot springs. *Mar Tech Soc J* 16: 23-25
- Eghbal MA, Pennefather PS, O'Brien PJ (2004) H_2S cytotoxicity mechanism involves reactive oxygen species formation and mitochondrial depolarisation. *Toxicology* 203: 69-76
- Ehrhart J, Zeevalk GD (2003) Cooperative interaction between ascorbate and glutathione during mitochondrial impairment in mesencephalic cultures. *J Neurochem* 86: 1487-1497
- Eto K, Asada T, Arima K, Makifuchi T, Kimura H (2002) Brain hydrogen sulfide is severely decreased in Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 1485-1488
- Eubel H, Jansch L, Braun HP (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol* 133: 274-286
- Fahey RC, Newton GL, Dorian R, Kosower EM (1980) Analysis of biological thiols - Derivatization with monobromotrimethylammoniumbimane and characterization by electrophoresis and chromatography. *Anal Biochem* 107: 1-10
- Fang J, Beattie DS (2003) Alternative oxidase present in procyclic *Trypanosoma brucei* may act to lower the mitochondrial production of superoxide. *Arch Biochem Biophys* 414: 294-302

-
- Fiorucci S, Distrutti E, Cirino G, Wallace JL (2006) The emerging roles of hydrogen sulfide in the gastrointestinal tract and liver. *Gastroenterology* 131: 259-271
- Furne J, Springfield J, Koenig T, DeMaster E, Levitt MD (2001) Oxidation of hydrogen sulfide and methanethiol to thiosulfate by rat tissues: a specialized function of the colonic mucosa. *Biochem Pharmacol* 62: 255-259
- Gagneur M (2006) Charakterisierung des Enzyms Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase in verschiedenen Tierarten. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Gainey LF, Greenberg MJ (2005) Hydrogen sulfide is synthesized in the gills of the clam *Mercenaria mercenaria* and acts seasonally to modulate branchial muscle contraction. *Biol Bull* 209: 11-20
- Gardner MN, Rawlings DE (2000) Production of rhodanese by bacteria present in bio-oxidation plants used to recover gold from arsenopyrite concentrates. *J Appl Microbiol* 89: 185-190
- Geng B, Yang JH, Qi YF, Zhao J, Pang YZ, Du JB, Tang CS (2004) H₂S generated by heart in rat and its effects on cardiac function. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 362-368
- Ghezzi P (2005) Oxidoreduction of protein thiols in redox regulation. *Biochem Soc Trans* 33: 1378-1381
- Ghezzi P, Bonetto V (2003) Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins. *Proteomics* 3: 1145-1153
- Giles GI, Jacob C (2002) Reactive sulfur species: An emerging concept in oxidative stress. *Biol Chem* 383: 375-388
- Gnaiger E, Steinlechner MR, Mendez G, Eberl T, Margreiter R (1995) Control of mitochondrial and cellular respiration by oxygen. *J Bioenerg Biomembr* 27: 583-596
- Gnaiger E, Lassnig B, Kuznetsov A, Rieger G, Margreiter R (1998) Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201: 1129-1139
- Goubern M, Andraimihaja M, Nübel T, Blachier F, Bouillaud F (2007) Sulfide, the first inorganic substrate for human cells. *FASEB J* 21: 1699-1706
- Green PS, Mendez AJ, Jacob JS, Crowley JR, Growdon W, Hyman BT, Heinecke JW (2004) Neuronal expression of myeloperoxidase is increased in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 90: 724-733
- Griesbeck C, Hauska G, Schütz M (2000) Biological sulfide oxidation: Sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction. *Rec Res Dev Microbiol* 4: 179-203
- Griesbeck C, Schütz M, Schodl T, Bathe S, Nausch L, Mederer N, Vielreicher M, Hauska G (2002) Mechanism of sulfide-quinone reductase investigated using site-directed mutagenesis and sulfur analysis. *Biochemistry* 41: 11552-11565

- Grieshaber MK, Völkel S (1998) Animal adaptations for tolerance and exploitation of poisonous sulfide. *Annu Rev Physiol* 60: 33-53
- Grieshaber MK, Hardewig I, Kreutzer U, Pörtner HO (1994) Physiological and metabolic responses to hypoxia in invertebrates. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 125: 43-147
- Griffith OW (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Rad Biol Med* 27: 922-935
- Griffiths HR, Lunec J (2001) Ascorbic acid in the 21st century - more than a simple antioxidant. *Environ Toxicol Pharmacol* 10: 173-182
- Gunnison AF (1981) Sulfite toxicity - A critical review of *in vitro* and *in vivo* data. *Food Cosmet Toxicol* 19: 667-682
- Hahlbeck E, Arndt C, Schiedek D (2000) Sulphide detoxification in *Hediste diversicolor* and *Marenzelleria viridis*, two dominant polychaete worms within the shallow coastal waters of the southern Baltic Sea. *Comp Biochem Physiol B* 125: 457-471
- Hand SC, Somero GN (1983) Energy metabolism pathways of hydrothermal vent animals - Adaptations to a food-rich and sulfide-rich deep-sea environment. *Biol Bull* 165: 167-181
- Hansford RG, Hogue BA, Mildaziene V (1997) Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J Bioenerg Biomembr* 29: 89-95
- Hauschild K, Weber WM, Clauss W, Grieshaber MK (1999) Excretion of thiosulphate, the main detoxification product of sulphide, by the lugworm *Arenicola marina* L. *J Exp Biol* 202: 855-866
- Horowitz P, Bowman S (1987) Reversible thermal denaturation of immobilized rhodanese. *J Biol Chem* 262: 5587-5591
- Horowitz PM, Criscimagna NL (1985) Differential binding of the fluorescent-probe 8-anilino-naphthalene-2-sulfonic acid to rhodanese catalytic intermediates. *Biochemistry* 24: 2587-2593
- Hosoki R, Matsuki N, Kimura H (1997) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous smooth muscle relaxant in synergy with nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 527-531
- Huang J, Khan S, O'Brien PJ (1998) The glutathione dependence of inorganic sulfate formation from L- or D-cysteine in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 110: 189-202
- Huxtable RJ (1986) Biochemistry of sulfur. In: Frieden E (ed.) *Biochemistry of elements*. Plenum Press, New York.
- Iciek M, Wlodek L (2001) Biosynthesis and biological properties of compounds containing highly reactive, reduced sulfane sulfur. *Pol J Pharmacol* 53: 215-225

-
- Ip YK, Kuah SSL, Chew SF (2004) Strategies adopted by the mudskipper *Boleophthalmus boddarti* to survive sulfide exposure in normoxia or hypoxia. *Physiol Biochem Zool* 77: 824-837
- Ip YK, Tan GQ, Kuah SSL, Chew SF (1997) Detoxification of environmental sulfide to sulfane sulfur in the intertidal sipunculid *Phascolosoma arcuatum*. *J Comp Physiol B* 167: 213-220
- Joseph-Horne T, Babij J, Wood PM, Hollomon D, Sessions RB (2000) New sequence data enable modelling of the fungal alternative oxidase and explain an absence of regulation by pyruvate. *FEBS Lett* 481: 141-146
- Julian D, Statile JL, Wohlgemuth SE, Arp AJ (2002) Enzymatic hydrogen sulfide production in marine invertebrate tissues. *Comp Biochem Physiol A* 133: 105-115
- Julian D, Statile J, Roepke TA, Arp AJ (2005) Sodium nitroprusside potentiates hydrogen-sulfide-induced contractions in body wall muscle from a marine worm. *Biol Bull* 209: 6-10
- Juszczuk IM, Rychter AM (2003) Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* 50: 1257-1271
- Kajiyama H, Nojima Y, Mitsuhashi H, Ueki K, Tamura S, Sekihara T, Wakamatsu R, Yano S, Naruse T (2000) Elevated levels of serum sulfite in patients with chronic renal failure. *J Am Soc Nephrol* 11: 923-927
- Kamoun P (2001) Mental retardation in Down syndrome: a hydrogen sulfide hypothesis. *Med Hypotheses* 57: 389-392
- Kamoun P (2004) Endogenous production of hydrogen sulfide in mammals. *Amino Acids* 26: 243-254
- Kamoun P, Belardinelli MC, Chabli A, Lallouchi K, Chadefaux-Vekemans B (2003) Endogenous hydrogen sulfide overproduction in Down syndrome. *Am J Med Genet A* 116: 310-311
- Kang D, Gho JS, Suh M, Kang C (2002) Highly sensitive and fast protein detection with Coomassie Brilliant Blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bull Korean Chem Soc* 23: 1511-1512
- Kantrow SP, Taylor DE, Carraway MS, Piantadosi CA (1997) Oxidative metabolism in rat hepatocytes and mitochondria during sepsis. *Arch Biochem Biophys* 345: 278-288
- Keller M, Sommer AM, Portner HO, Abele D (2004) Seasonality of energetic functioning and production of reactive oxygen species by lugworm (*Arenicola marina*) mitochondria exposed to acute temperature changes. *J Exp Biol* 207: 2529-2538
- Kelley DS (1996) Methane-rich fluids in the oceanic crust. *J Geophys Res* 101: 2943-2962
- Kelly A, Stanley CA (2001) Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 7: 287-295

- Khan AA, Schuler MM, Prior MG, Yong S, Coppock RW, Florence LZ, Lillie LE (1990) Effects of hydrogen-sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 103: 482-490
- Kimura H (2000) Hydrogen sulfide induces cyclic AMP and modulates the NMDA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 129-133
- Kimura Y, Kimura H (2004) Hydrogen sulfide protects neurons from oxidative stress. *Faseb Journal* 18: 1165-1167
- Kirkman HN, Galiano S, Gaetani GF (1987) The function of catalase-bound NADPH. *J Biol Chem* 262: 660-666
- Koj A, Frendo J, Janik Z (1967) [³⁵S]Thiosulphate oxidation by rat liver mitochondria in the presence of glutathione. *Biochem J* 103: 791-795
- Koj A, Frendo J, Wojtczak L (1975) Subcellular distribution and intramitochondrial localization of three sulfurtransferases in rat liver. *FEBS Lett* 57: 42-46
- Kombian SB, Warenycia MW, Mele FG, Reiffenstein RJ (1988) Effects of acute intoxication with hydrogen sulfide on central amino acid transmitter systems. *Neurotoxicology* 9: 587-595
- Kraus DW, Doeller JE (2004) Sulfide consumption by mussel gill mitochondria is not strictly tied to oxygen reduction: measurements using a novel polarographic sulfide sensor. *J Exp Biol* 207: 3667-3679
- Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA, Osiewicz HD (2004) Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J Biol Chem* 279: 26453-26461
- Kudin AP, Bimpong-Buta NYB, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *J Biol Chem* 279: 4127-4135
- Lane N (2005) Power, sex and suicide: Mitochondria and the meaning of life. Oxford University Press, New York.
- Lang K (1933) Die Rhodanbildung im Tierkörper. *Biochem Z* 259: 243-256
- Lee CY, Hwang JH, Lee YS, Cho KS (1995) Purification and characterization of mouse liver rhodanese. *J Biochem Mol Biol* 28: 170-176
- Lee I, Bender E, Kadenbach B (2002) Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Mol Cell Biochem* 234: 63-70
- Lee RW, Thuesen EV, Childress JJ (1992) Ammonium and free amino acids as nitrogen sources for the chemoautotrophic symbiosis *Solemya reidi* Bernard (Bivalvia, Protobranchia). *J Exp Mar Bio Ecol* 158: 75-91

-
- Lee RW, Kraus DW, Doeller JE (1996) Sulfide-stimulation of oxygen consumption rate and cytochrome reduction in gills of the estuarine mussel *Geukensia demissa*. *Biol Bull* 191: 421-430
- Lenaz G, Genova ML (2007) Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1221-C1239
- Levitt MD, Furne J, Springfield J, Suarez F, DeMaster E (1999) Detoxification of hydrogen sulfide and methanethiol in the cecal mucosa. *J Clin Invest* 104: 1107-1114
- Li CY, Jackson RM (2002) Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 282: C227-C241
- Li NY, Ragheb K, Lawler G, Sturgist J, Rajwa B, Melendez JA, Robinson JP (2003) Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 278: 8516-8525
- Li X, Cobb CE, Hill KE, Burk RF, May JM (2001) Mitochondrial uptake and recycling of ascorbic acid. *Arch Biochem Biophys* 387: 143-153
- Linster CL, Van Schaftingen E (2007) Vitamin C - Biosynthesis, recycling and degradation in mammals. *FEBS J* 274: 1-22
- Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY (1998) Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6803-6808
- Lu SC (2000) Regulation of glutathione synthesis. *Curr Top Cell Regul* 36: 95-116
- Luo GX, Horowitz PM (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
- MacLeod RM, Handler P, Fridovich I, Farkas W (1961) Purification and properties of hepatic sulfite oxidase. *J Biol Chem* 236: 1841-1846
- Martin W, Russell MJ (2003) On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells. *Phil Trans Roy Soc* 358: 59-83
- McCord JM, Fridovich I (1969) The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. 1. Radicals generated by the interaction of sulfite, dimethyl sulfoxide, and oxygen. *J Biol Chem* 244: 6056-6063
- McDonald AE, Vanlerberghe GC (2004) Branched mitochondrial electron transport in the animalia: Presence of alternative oxidase in several animal phyla. *Iubmb Life* 56: 333-341
- Millar AH, Bergersen FJ, Day DA (1994) Oxygen-affinity of terminal oxidases in soybean mitochondria. *Plant Physiol Biochem* 32: 847-852

- Millar AH, Finnegan PM, Whelan J, Drevon JJ, Day DA (1997) Expression and kinetics of the mitochondrial alternative oxidase in nitrogen-fixing nodules of soybean roots. *Plant Cell and Environment* 20: 1273-1282
- Millenaar FF, Lambers H (2003) The alternative oxidase: *in vivo* regulation and function. *Plant Biol* 5: 2-15
- Miller DM, Kurzban GP, Mendoza JA, Chirgwin JM, Hardies SC, Horowitz PM (1992) Recombinant bovine rhodanese - Purification and comparison with bovine liver rhodanese. *Biochim Biophys Acta* 1121: 286-292
- Millero FJ (1986) The thermodynamics and kinetics of the hydrogen sulfide system in natural waters. *Mar Chem* 18: 121-147
- Minic Z, Herve G (2004) Biochemical and enzymological aspects of the symbiosis between the deep-sea tubeworm *Riftia pachyptila* and its bacterial endosymbiont. *Eur J Biochem* 271: 3093-3102
- Monteiro HP, Stern A (1996) Redox modulation of tyrosine phosphorylation-dependent signal transduction pathways. *Free Rad Biol Med* 21: 323-333
- Moore AL, Albury MS, Crichton PG, Affourtit C (2002) Function of the alternative oxidase: is it still a scavenger? *Trends Plant Sci* 7: 478-481
- Moore PK, Bhatia M, Moochhala S (2003) Hydrogen sulfide: from the smell of the past to the mediator of the future? *Trends Pharmacol Sci* 24: 609-611
- Moran LK, Gutteridge JM, Quinlan GJ (2001) Thiols in cellular redox signalling and control. *Curr Med Chem* 8: 763-772
- Morton RA (1965) Spectroscopy of quinones and related substances. In: Morton RA (ed.) *Biochemistry of quinones*. Academic Press, London. 23-65
- Nandi DL, Horowitz PM, Westley J (2000) Rhodanese as a thioredoxin oxidase. *Int J Biochem Cell Biol* 32: 465-473
- Nelson MT, Quayle JM (1995) Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 37: C799-C822
- Newton GL, Dorian R, Fahey RC (1981) Analysis of biological thiols: Derivatization with monobromobimane and separation by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Anal Biochem* 114: 383-387
- Nicholls P (1975) The effect of sulphide on cytochrome aa₃ isosteric and allosteric shifts of the reduced alpha peak. *Biochim Biophys Acta* 396: 24-35
- O'Brien J, Vetter RD (1990) Production of thiosulfate during sulfide oxidation by mitochondria of the symbiont-containing bivalve *Solemya reidi*. *J Exp Biol* 149: 133-148
- Oeschger R, Vismann B (1994) Sulfide tolerance in *Heteromastus filiformis* (Polychaeta) - Mitochondrial adaptations. *Ophelia* 40: 147-158

-
- Ogasawara Y, Lacourciere G, Stadtman TC (2001) Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: Possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9494-9498
- Ogata K, Volini M (1990) Mitochondrial rhodanese: Membrane-bound and complexed activity. *J Biol Chem* 265: 8087-8093
- Ogata K, Dai X, Volini M (1989) Bovine mitochondrial rhodanese is a phosphoprotein. *J Biol Chem* 264: 2718-2725
- Oi S (1975) Inhibition of rat liver rhodanese by di-, tricarboxylic, and α -keto acids. *J Biochem* 78: 825-834
- Olafsdottir K, Reed DJ (1988) Retention of oxidized glutathione by isolated rat liver mitochondria during hydroperoxide treatment. *Biochim Biophys Acta* 964: 377-382
- Ornstein L (1964) Disc electrophoresis. I. Background and theory. *Ann NY Acad Sci* 121: 321-349
- Ovadi J, Huang Y, Spivey HO (1994) Binding of malate dehydrogenase and NADH channelling to complex I. *J Mol Recognit* 7: 265-272
- Pachmayr F (1961) Vorkommen und Bestimmung von Schwefelverbindungen im Mineralwasser. Dissertation, Universität München.
- Pagani S, Galante YM (1983) Interaction of rhodanese with mitochondrial NADH dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 742: 278-284
- Pagani S, Sessa G, Sessa F, Colnaghi R (1993) Properties of *Azotobacter vinelandii* rhodanese. *Biochem Mol Biol Int* 29: 595-604
- Palenchar PM, Buck CJ, Cheng H, Larson TJ, Mueller EG (2000) Evidence that ThiI, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. *J Biol Chem* 275: 8283-8286
- Parrino V, Kraus DW, Doeller JE (2000) ATP production from the oxidation of sulfide in gill mitochondria of the ribbed mussel *Geukensia demissa*. *J Exp Biol* 203: 2209-2218
- Petersen LC (1977) The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome c oxidase. *Biochim Biophys Acta* 460: 299-307
- Picton R, Eggo MC, Merrill GA, Langman MJS, Singh S (2002) Mucosal protection against sulphide: importance of the enzyme rhodanese. *Gut* 50: 201-205
- Pitcher MCL, Beatty ER, Cummings JH (2000) The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* 46: 64-72
- Ploegman JH, Drent G, Kalk KH, Hol WGJ, Henrikson RL, Keim P, Weng L, Russell J (1978) The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* 273: 124-129
- Poethke W. (1973) *Praktikum der Maßanalyse*. Steinkopff Verlag, Dresden.

- Powell MA, Somero GN (1986) Hydrogen sulfide oxidation is coupled to oxidative phosphorylation in mitochondria of *Solemya reidi*. *Science* 233: 563-566
- Prescott AG, John P (1996) Dioxygenases: Molecular structure and role in plant metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 245-271
- Pronk JT, Meulenber R, Hazeu W, Bos P, Kuenen JG (1990) Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol Rev* 75: 293-306
- Przywara T (2004) Die erweiterte Atmungskette des Wattwurms *Arenicola marina* L. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Quastel JH, Wooldridge WR (1928) Some properties of the dehydrogenating enzymes of bacteria. *Biochem J* 22: 689-702
- Ramasamy S, Singh S, Taniere P, Langman MJS, Eggo MC (2006) Sulfide detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G288-G296
- Ramirez P, Toledo H, Guiliani N, Jerez CA (2002) An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl Environ Microbiol* 68: 1837-1845
- Rawlings DE (2002) Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* 56: 65-91
- Ray WK, Zeng G, Potters MB, Mansuri AM, Larson TJ (2000) Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J Bacteriol* 182: 2277-2284
- Reinartz M, Tschape J, Bruser T, Truper HG, Dahl C (1998) Sulfide oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Chromatium vinosum*. *Arch Microbiol* 170: 59-68
- Reynafarje B, Costa LE, Lehninger AL (1985) O₂ solubility in aqueous media determined by a kinetic method. *Anal Biochem* 145: 406-418
- Rhoads DM, Umbach AL, Sweet CR, Lennon AM, Rauch GS, Siedow JN (1998) Regulation of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria - Identification of the cysteine residue involved in α -keto acid stimulation and intersubunit disulfide bond formation. *J Biol Chem* 273: 30750-30756
- Robinson J, Cooper JM (1970) Method of determining oxygen concentrations in biological media, suitable for calibration of the oxygen electrode. *Anal Biochem* 33: 390-399
- Roediger WE, Moore J, Babidge W (1997) Colonic sulfide in pathogenesis and treatment of ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 42: 1571-1579
- Rohwerder T, Sand W (2003) The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology* 149: 1699-1709
- Rohwerder T, Sand W (2007) Oxidation of inorganic sulfur compounds in acidophilic prokaryotes. *Eng Life Sci* 7: 301-309

- Schägger H, Pfeiffer K (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J Biol Chem* 276: 37861-37867
- Schlesinger P, Westley J (1974) An expanded mechanism for rhodanese catalysis. *J Biol Chem* 249: 780-788
- Schroff G, Schöttler U (1977) Anaerobic reduction of fumarate in the body wall musculature of *Arenicola marina* (Polychaeta). *J Comp Physiol* 116: 325-336
- Schulte M, Shock E (1995) Thermodynamics of strecker synthesis in hydrothermal systems. *Orig Life Evol Biosph* 25: 161-173
- Schütz M, Klughammer C, Griesbeck C, Quentmeier A, Friedrich CG, Hauska G (1998) Sulfide-quinone reductase activity in membranes of the chemotrophic bacterium *Paracoccus denitrificans* GB17. *Arch Microbiol* 170: 353-360
- Shahak Y, Klughammer C, Schreiber U, Padan E, Herrman I, Hauska G (1994) Sulfide-quinone and sulfide-cytochrome reduction in *Rhodobacter capsulatus*. *Photosynth Res* 39: 175-181
- Silver M, Lundgren DG (1968) Sulfur-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). *Can J Biochem* 46: 457-461
- Simmons CR, Liu Q, Huang QQ, Hao Q, Begley TP, Karplus PA, Stipanuk MH (2006) Crystal structure of mammalian cysteine dioxygenase - A novel mononuclear iron center for cysteine thiol oxidation. *J Biol Chem* 281: 18723-18733
- Skorkowski EF (1988) Mitochondrial malic enzyme from crustacean and fish muscle. *Comp Biochem Physiol B* 90: 19-24
- Sorensen M, Sanz A, Gomez J, Pamplona R, Portero-Otin M, Gredilla R, Barja G (2006) Effects of fasting on oxidative stress in rat liver mitochondria. *Free Radic Res* 40: 339-347
- Sörbo BH (1951) On the properties of rhodanese - Partial purification, inhibitors and intracellular distribution. *Acta Chem Scand* 5: 724-734
- Sörbo BH (1953) Crystalline rhodanese. 2. The enzyme catalyzed reaction. *Acta Chem Scand* 7: 1137-1145
- Sörbo BH (1955) Rhodanese. *Methods Enzymol* 2: 334-337
- Sörbo BH (1957) Sulfite and complex-bound cyanide as sulfur acceptors for rhodanese. *Acta Chem Scand* 11: 628-633
- Sörbo BH (1962) On the mechanism of rhodanese inhibition by sulfite and cyanide. *Acta Chem Scand* 16: 2455-2456
- Sörbo BH (1963) Amino acid composition and sulfur distribution of crystalline rhodanese. *Acta Chem Scand* 17: 2205-2208
- Spallarossa A, Donahue JL, Larson TJ, Bolognesi M, Bordo D (2001) *Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. *Structure* 9: 1117-1125

- Starkov AA, Fiskum G (2003) Regulation of brain mitochondrial H₂O₂ production by membrane potential and NAD(P)H redox state. *J Neurochem* 86: 1101-1107
- Starnes JW, Barnes BD, Olsen ME (2007) Exercise training decreases rat heart mitochondria free radical generation but does not prevent Ca²⁺-induced dysfunction. *J Appl Physiol* 102: 1793-1798
- Suarez F, Furne J, Springfield J, Levitt M (1998) Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 37: G727-G733
- Sumegi B, Srere PA (1984) Complex I binds several mitochondrial NAD-coupled dehydrogenases. *J Biol Chem* 259: 5040-5045
- Suzuki I (1965a) Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim Biophys Acta* 104: 359-371
- Suzuki I (1965b) Incorporation of atmospheric oxygen-18 into thiosulfate by the sulfur-oxidizing enzyme of *Thiobacillus thiooxidans*. *Biochim Biophys Acta* 110: 97-101
- Suzuki I (1994) Sulfur-oxidizing enzymes. *Inorganic Microbial Sulfur Metabolism* 243: 455-462
- Suzuki I, Werkman CH (1959) Glutathione and sulfur oxidation by *Thiobacillus thiooxidans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 45: 239-244
- Suzuki I, Silver M (1966) The initial product and properties of the sulfur-oxidizing enzyme of thiobacilli. *Biochim Biophys Acta* 122: 22-33
- Suzuki T, Hashimoto T, Yabu Y, Kido Y, Sakamoto K, Nihei C, Hato M, Suzuki S, Amano Y, Nagai K, Hosokawa T, Minagawa N, Ohta N, Kita K (2004) Direct evidence for cyanide-insensitive quinol oxidase (alternative oxidase) in apicomplexan parasite *Cryptosporidium parvum*: phylogenetic and therapeutic implications. *Biochem Biophys Res Commun* 313: 1044-1052
- Szczepkowski TW, Wood JL (1967) The cystathionase-rhodanese system. *Biochim Biophys Acta* 139: 469-478
- Theißen U (2006) Die Sulfid:Chinon Oxidoreduktase (SQR) des Wattwurms, *Arenicola marina*: Funktion, Mechanismus und Evolution. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Theißen U, Hoffmeister M, Grieshaber M, Martin W (2003) Single eubacterial origin of eukaryotic sulfide:quinone oxidoreductase, a mitochondrial enzyme conserved from the early evolution of eukaryotes during anoxic and sulfidic times. *Mol Biol Evol* 20: 1564-1574
- Thiermann F, Vismann B, Giere O (2000) Sulphide tolerance of the marine nematode *Oncholaimus campyloceroides* - a result of internal sulphur formation. *Mar Ecol Prog Ser* 193: 251-259
- Tielens AGM, Van Hellemond JJ (1998) The electron transport chain in anaerobically functioning eukaryotes. *Biochim Biophys Acta - Bioenergetics* 1365: 71-78

Tielens AGM, Rotte C, Van Hellemond JJ, Martin W (2002) Mitochondria as we don't know them. *Trends Biochem Sci* 27: 564-572

Toohey JI (1981) Macrophages and methylthio groups in lymphocyte proliferation. *J Supramol Struct Cell Biochem* 17: 11-25

Toohey JI (1986) Persulfide sulfur is a growth-factor for cells defective in sulfur metabolism. *Biochem Cell Biol* 64: 758-765

Toohey JI (1989) Sulfane sulfur in biological systems - A possible regulatory role. *Biochem J* 264: 625-632

Trevino RJ, Tsalkova T, Kramer G, Hardesty B, Chirgwin JM, Horowitz PM (1998) Truncations at the NH₂ terminus of rhodanese destabilize the enzyme and decrease its heterologous expression. *J Biol Chem* 273: 27841-27847

Trüper HG (1984) Microorganisms and the sulfur cycle. In: Müller A, Krebs B (eds.) *Sulfur: Its significance for chemistry, for the geo-, bio- and cosmosphere and technology*. Elsevier, Amsterdam. 351-365

Tsuge K, Kataoka M, Seto Y (2000) Cyanide and thiocyanate levels in blood and saliva of healthy adult volunteers. *J Health Sci* 46: 343-350

Valentine WN, Toohey JI, Paglia DE, Nakatani M, Brockway RA (1987) Modification of erythrocyte enzyme activities by persulfides and methanethiol - Possible regulatory role. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1394-1398

Vande Weghe JG, Ow DW (1999) A fission yeast gene for mitochondrial sulfide oxidation. *J Biol Chem* 274: 13250-13257

Van Dover CL (2000) *The ecology of deep-sea hydrothermal vents*. Princeton University Press, Princeton

Vanlerberghe GC, McIntosh L (1997) Alternative oxidase: From gene to function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 48: 703-734

Vanlerberghe GC, McIntosh L, Yip JYH (1998) Molecular localization of a redox-modulated process regulating plant mitochondrial electron transport. *Plant Cell* 10: 1551-1560

Vanlerberghe GC, Day DA, Wiskich JT, Vanlerberghe AE, McIntosh L (1995) Alternative oxidase activity in tobacco leaf mitochondria: Dependence on tricarboxylic acid cycle-mediated redox regulation and pyruvate activation. *Plant Physiol* 109: 353-361

Vatassery GT, Smith WE, Quach HT, Lai JCK (1995) *In vitro* oxidation of vitamin E, vitamin C, thiols and cholesterol in rat brain mitochondria incubated with free radicals. *Neurochem Int* 26: 527-535

Venkatachalam KV (2003) Human 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate (PAPS) synthase: Biochemistry, molecular biology and genetic deficiency. *Iubmb Life* 55: 1-11

- Vetter RD, Matrai PA, Javor B, O'Brien J (1989) Reduced sulfur-compounds in the marine environment - Analysis by high-performance liquid-chromatography. *ACS Symposium Series* 393: 243-261
- Vincent AS, Lim BG, Tan J, Whiteman M, Cheung NS, Halliwell B, Wong KP (2004) Sulfite-mediated oxidative stress in kidney cells. *Kidney Int* 65: 393-402
- Votyakova TV, Reynolds IJ (2001) Delta psi(m)-dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J Neurochem* 79: 266-277
- Völkel S, Grieshaber MK (1992) Mechanisms of sulfide tolerance in the peanut worm, *Sipunculus nudus* (Sipunculidae) and in the lugworm, *Arenicola marina* (Polychaeta). *J Comp Physiol B* 162: 469-477
- Völkel S, Grieshaber MK (1994) Oxygen dependent sulfide detoxification in the lugworm *Arenicola marina*. *Mar Biol* 118: 137-147
- Völkel S, Grieshaber MK (1996) Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*. Evidence for alternative electron pathways. *Eur J Biochem* 235: 231-237
- Völkel S, Grieshaber MK (1997) Sulphide oxidation and oxidative phosphorylation in the mitochondria of the lugworm *Arenicola marina*. *J Exp Biol* 200: 83-92
- Völkel S, Hauschild K, Grieshaber MK (1995) Sulfide stress and tolerance in the lugworm *Arenicola marina* during low tide. *Mar Ecol Prog Ser* 122: 205-215
- Wang R (2002) Two's company, three's a crowd: can H₂S be the third gaseous transmitter? *FASEB J* 16: 1792-1798
- Wang SF, Volini M (1973) The interdependence of substrate and protein transformations in rhodanese catalysis. 1. Enzyme interactions with substrate, product, and inhibitor anions. *J Biol Chem* 248: 7376-7385
- Warencya MW, Smith KA, Blashko CS, Kombian SB, Reiffenstein RJ (1989) Monoamine oxidase inhibition as a sequel of hydrogen sulfide intoxication - Increases in brain catecholamine and 5-hydroxytryptamine levels. *Arch Toxicol* 63: 131-136
- Weiland KL, Dooley TP (1991) Molecular-cloning, sequencing and characterization of cDNA to rat liver rhodanese, a thiosulfate sulphurtransferase. *Biochemical Journal* 275: 227-231
- Westley J (1973) Rhodanese. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 39: 327-368
- Westley J (1981) Thiosulfate:cyanide sulfurtransferase (rhodanese). *Methods Enzymol* 77: 285-291
- Westley J, Adler H, Westley L, Nishida C (1983) The sulfurtransferases. *Fund Appl Toxicol* 3: 377-382
- Whiteman M, Cheung NS, Zhu YZ, Chu SH, Siau JL, Wong BS, Armstrong JS, Moore PK (2005) Hydrogen sulphide: a novel inhibitor of hypochlorous acid-mediated oxidative damage in the brain? *Biochem Biophys Res Commun* 326: 794-798

- Wilms J, Lub J, Wever R (1980) Reactions of mercaptans with cytochrome c oxidase and cytochrome c. *Biochim Biophys Acta* 589: 324-335
- Wohlgemuth SE, Taylor AC, Grieshaber MK (2000) Ventilatory and metabolic responses to hypoxia and sulphide in the lugworm *Arenicola marina* (L.). *J Exp Biol* 203: 3177-3188
- Woo WH, Yang HY, Wong KP, Halliwell B (2003) Sulphite oxidase gene expression in human brain and in other human and rat tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 305: 619-623
- Wood JL (1987) Sulfane sulfur. *Methods Enzymol* 143: 25-29
- Wrobel M, Czubak J (2000) Rhodanese (thiosulfate : cyanide sulfurtransferase) from frog *Rana temporaria*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 746: 315-318
- Yang SF (1970) Sulfoxide formation from methionine or its sulfide analogs during aerobic oxidation of sulfite. *Biochemistry* 9: 5008-5014
- Yong R, Searcy DG (2001) Sulfide oxidation coupled to ATP synthesis in chicken liver mitochondria. *Comp Biochem Physiol B* 129: 129-137
- Yoshikawa S, Caughey WS (1990) Infrared evidence of cyanide binding to iron and copper sites in bovine heart cytochrome c oxidase - Implications regarding oxygen reduction. *J Biol Chem* 265: 7945-7958

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. Manfred K. Grieshaber für sein Interesse an meiner Arbeit, seine Diskussionsbereitschaft und seine großzügige Unterstützung bei den Experimenten.

Herrn Professor Dr. Georg Groth danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Professor Dr. Helmut Wieczorek danke ich ebenfalls herzlich für die kurzfristige Anfertigung des Drittgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt Barbara Bartosinska und Silke Jakob für ihre tatkräftige Unterstützung im Labor. Dankeschön für die vielen Präparationen, Reinigungen, Aktivitätsbestimmungen und Gele.

Den Mitarbeitern des Instituts für Zoophysiology danke ich für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und schöne gemeinsame Aktivitäten außerhalb des Labors. Besonders bei Andre, Nadine, Gereon, Ariane, Ulrike und Astrid möchte ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken und für die wertvollen Tipps zum adäquaten Umgang mit zickigen Geräten.

Meiner Sulfid-Kollegin Ursula Theißen danke ich für nette und produktive Diskussionen sowie die gute Zusammenarbeit bei gemeinsamen Experimenten.

Ich danke auch den Fahrern der Heinrich-Heine-Universität, besonders Herrn Mittler, und Frau Winkelmann vom Zeeaaashandel Arenicola für den Transport bzw. die Bereitstellung meiner Versuchstiere.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie. Ich möchte mich bei meinen Eltern, Nicola, Andreas und Arndt für ihre Unterstützung und ihr Verständnis bedanken.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

