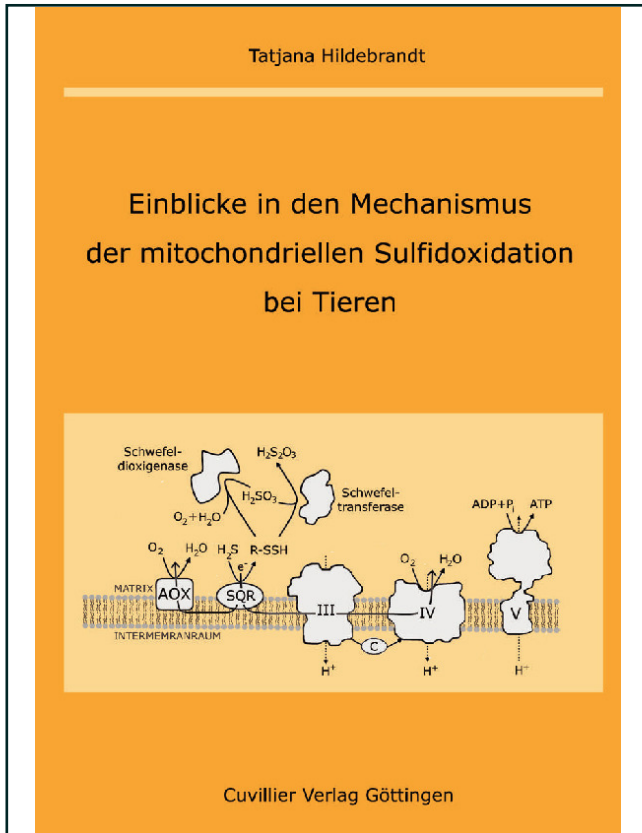




Tatjana Hildebrandt (Autor)
Einblicke in den Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation bei Tieren



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/1475>

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,
Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: <https://cuvillier.de>

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