## Inhaltsverzeichnis

1	Einl	eitung		1		
	1.1	Sulfid als Gift				
	1.2	Sulfids	stoffwechsel 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	Sulfids	stoffwechsel bei sulfidadaptierten Tieren	6		
		1.3.1	Forschungsschwerpunkt Sulfidoxidation	7		
		1.3.2	Der Sulfidstoffwechsel des Wattwurms, $A.\ marina$	9		
	1.4	Ziele d	der vorliegenden Arbeit	11		
2	Mat	erial u	nd Methoden	13		
	2.1	Chem	ikalien	13		
	2.2	Enzyn	ne	13		
	2.3	3 Versuchstiere				
	2.4	Reinig	gungsprotokolle	14		
		2.4.1	Präparation von Mitochondrien aus Rattenleber	14		
		2.4.2	Präparation von Mitochondrien aus A. marina	15		
		2.4.3	Präparation von Mitochondrienmembranen und -matrix	15		
		2.4.4	Reinigung der Schwefeldioxigenasen und -transferasen	15		
			2.4.4.1 Größenausschlusschromatographie	16		
			2.4.4.2 Anionenaustauschchromatographie	16		
			2.4.4.3 Kationenaustauschchromatographie	17		
	2.5	Protei	nanalyse	17		
		2.5.1	Proteinbestimmung	17		
		2.5.2	SDS-Gelelektrophorese	17		
		2.5.3	Peptidsequenzierung mittels Massenspektrometrie	18		
	2.6	Chara	kterisierung isolierter Mitochondrien	19		
		2.6.1	Bestimmung des $O_2$ -Verbrauchs isolierter Mitochondrien	19		

II Inhaltsverzeichnis

		2.6.2	Bestimmung der ATP-Produktion isolierter Mitochondrien 2	21
		2.6.3	Bestimmung der $H_2O_2$ -Produktion isolierter Mitochondrien	22
	2.7	Enzyn	natische Tests	22
		2.7.1	Aktivitätsbestimmung der Cytochrom c Oxidase	22
		2.7.2	Aktivitätsbestimmung der Sulfid-Chinon-Oxidoreduktase 2	23
		2.7.3	Aktivitätsbestimmung der Schwefeldioxigenase	23
		2.7.4	Bestimmung der Enzymaktivitäten von Schwefeltransferasen 2	24
			2.7.4.1 Bestimmung der $K_m$ -Werte der Schwefeltransferasen 2	25
			2.7.4.2 Oxidationsempfindlichkeit der Schwefeltransferasen 2	25
	2.8	Schwe	felverbindungen	26
		2.8.1	Herstellung der Substratlösungen	26
			2.8.1.1 Herstellung von Sulfid- und Sulfit-Stammlösungen 2	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	Statist	ik	30
3	Erge	ebnisse	3	31
	3.1	Mitocl	nondrielle Sulfidoxidation	31
		3.1.1	Regulation der Sulfidoxidation bei A. marina	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 3	37
			3.1.1.4 Hemmung der Cytochrom c Oxidase	39
		3.1.2	Sulfid als Atmungssubstrat bei Rattenlebermitochondrien	40
				12
	3.2	Mecha	nismus der mitochondriellen Sulfidoxidation	46
		3.2.1	Stöchiometrie der mitochondriellen Sulfidoxidation	46
		3.2.2		17
		3.2.3	•	50
				54
				57
				33

Inhaltsverzeichnis

4	Disk	kussion		71	
	4.1	Reakt	onssequenz der Sulfidoxidation	71	
		4.1.1	Thiosulfat als Produkt der mitochondriellen 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	Redox regulation der Sulfidoxidation bei A. marina $\ \ldots \ \ldots \ \ldots$	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	5 Zusammenfassung				
6	Abs	tract	1	117	
7	Lite	ratur	1	119	