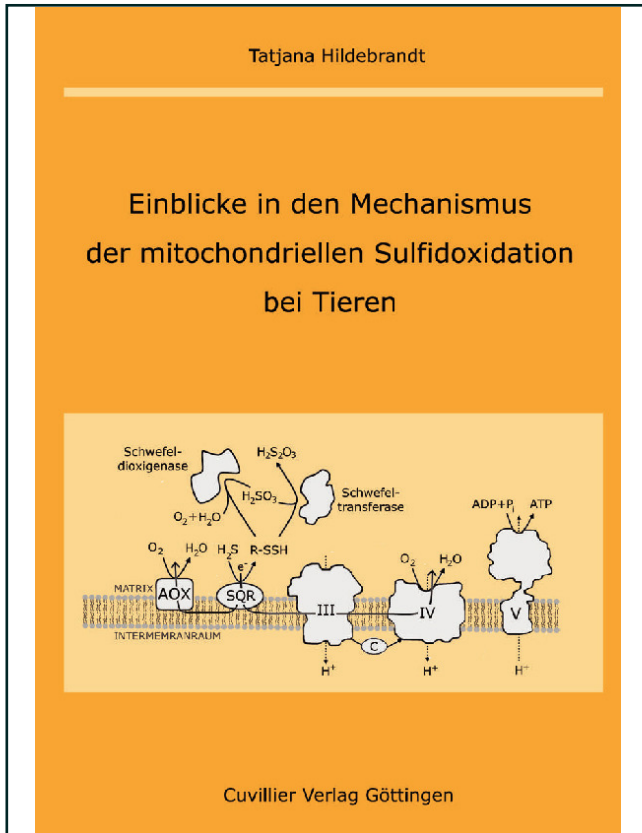




Tatjana Hildebrandt (Autor)
Einblicke in den Mechanismus der mitochondrialen Sulfidoxidation bei Tieren



<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>

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 aa_3 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 H_2S liegt beim Menschen weit unterhalb der schädlichen Konzentration, so dass der unan-

¹Die Bezeichnung Sulfid wird als Sammelbegriff für die undissoziierte Form (H_2S) sowie die Ionen HS^- und S^{2-} 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

H_2S 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 H_2S (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 NH_4^+ 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 (Szczechowski & Wood 1967, Toohey 1989).

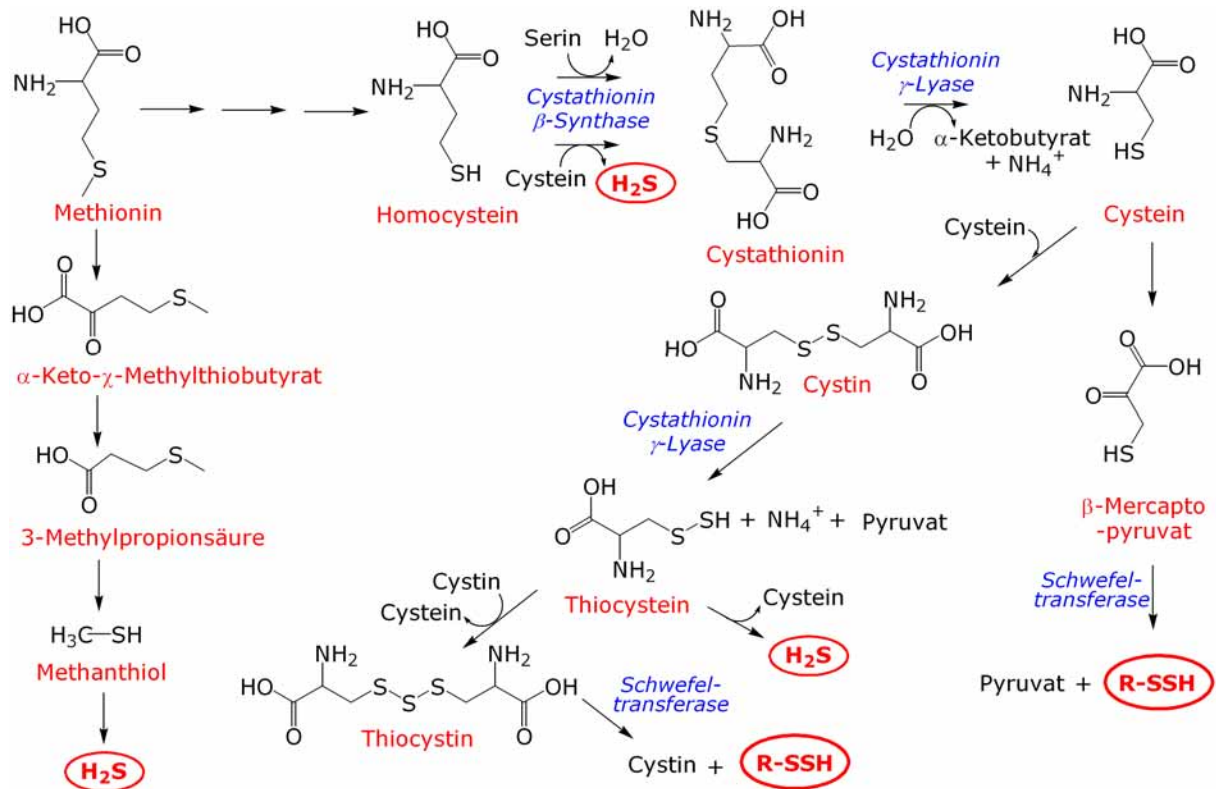


Abb. 1.1: Enzymatische Sulfidproduktion bei Säugetieren. Sulfid (H₂S) oder Persulfide (R-SSH) entstehen hauptsächlich beim Metabolismus der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein. (Erläuterungen im Text)

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 Sulfidsignal 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 μM 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 symbiotische 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-