

**Nitrite dependent NO synthesis in humans:
A novel function of Sulfite Oxidase**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Sabina Krizowski

aus Katowice, Polen

Köln, 2014

Gutachter: Prof. Dr. Günter Schwarz

Prof. Dr. Rudolf Wiesner

Tag der Disputation: 11.04.2014

IV Summary

Nitric oxide (NO) is a unique second messenger that controls fundamental biological functions such as blood pressure, vasodilation and mitochondrial respiration. Besides the classical oxygen-dependent arginine NO-synthase pathway, NO can be generated from nitrite, representing an important alternative source of NO under oxygen limited conditions.

The current study identified the mitochondrial sulfite oxidase (SO) as a new candidate for a nitrite reductase that is able to generate NO under physiological conditions. Recombinant human SO, reduced by sulfite, reduced nitrite at the molybdenum domain with a one-electron oxidation of Mo^{IV} to Mo^V. The heme domain of SO was shown to impair nitrite-reducing activity, which was based on electronic hindrance as nitrite and the heme iron compete for the Mo-derived electrons. Consequently, the idea that a restricted intra-molecular electron transfer (IET) from Mo to heme would increase the NO synthesis rate of SO, was investigated by two different approaches. The first is based on truncations of the inter-domain tether that controls conformational flexibility, which is required for fast IET. Alternatively, surface residues were identified in the interface of the Mo and heme domain binding site that were shown to be directly involved in IET between both metal centers. SO variants that were either altered in the tether or the domain binding site were generated and characterized regarding their kinetic parameters and nitrite-dependent NO synthesis. Both IET restricted approaches supported the assumption that with decreasing IET, nitrite-dependent NO synthesis is increased.

To demonstrate that SO significantly contributes to nitrite-dependent NO signaling in cells, NO-dependent cGMP levels, produced via the NO- activated soluble guanylyl cyclase pathway, were determined in fibroblasts from patients with genetic deficiencies in the molybdenum cofactor or SO. In both patient cells, nearly complete loss of nitrite-dependent cGMP formation was found and revealed that SO provides the major nitrite reductase activity in fibroblasts as compared to other molybdenum enzymes. Additionally, the expression of SO in human endothelial cells was identified by quantitative PCR and Western blot, suggesting that SO contributes to the mammalian nitrite-NO pathway in blood vessels, the regulatory side of vascular tone. The results obtained in this work provide both, new insights into the understanding of the underlying electron transfer properties in the classical SO pathway as well as a novel concept for a moonlighting function of SO in nitrite-dependent NO synthesis. Therefore, future studies should place SO into a novel focus of cardiovascular research.

V Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein einzigartiger Botenstoff, welcher grundlegende biologische Funktionen wie Blutdruck, Gefäßerweiterung sowie die mitochondriale Atmung reguliert. Neben dem klassischen Sauerstoff-abhängigen Arginin NO-Synthase Weg, kann NO aus Nitrit synthetisiert werden, welches eine alternative NO Quelle unter limitierenden Sauerstoffbedingungen darstellt.

In dieser Studie wurde die mitochondriale Sulfitoxidase (SO) als neuartige Nitritreduktase identifiziert, welche NO unter physiologischen Bedingungen synthetisieren kann. Rekombinante menschliche SO, durch Sulfit reduziert, reduzierte Nitrit an der Molybdän (Mo)-Domäne, einhergehend mit einer Oxidation von Mo^{IV} zu Mo^V. Die Häm-Domäne beeinträchtigte hingegen die Nitritreduktase Aktivität, da das Hämeisen und Nitrit um die Elektronen der Mo-Domäne konkurrieren. Folglich wurde die These untersucht, ob ein eingeschränkter intra-molekularer Elektronentransfer (IET) von Mo zu Häm die NO Syntheserate von SO steigern könnte, wobei zwei verschiedene Ansätze verfolgt wurden. Der Erste basierte auf einer Kürzung des Domänen-verbindenden Linkers, der die konformative Flexibilität kontrolliert und essentiell für den IET ist. Zusätzlich, wurden Oberflächenreste identifiziert, welche in der Binderegion der Häm und Mo Domäne liegen und direkt am IET zwischen beiden Metallzentren involviert sind. SO Varianten mit Modifizierungen im Linker oder der Domänenbindestelle wurden generiert und basierend auf ihren kinetischen Parametern sowie ihrer Nitrit-abhängigen NO Synthese Aktivität charakterisiert. Beide Ansätze unterstützen die Hypothese, dass mit verringertem IET, die Nitrit-abhängige NO Synthese ansteigt.

Um zu demonstrieren, dass SO auch in Zellen signifikant zum Nitrit-anhängigen NO Signalweg beiträgt, wurden NO-abhängig gebildete cGMP Mengen, welche über den NO-aktivierten Guanylylzyklase Weg generiert wurden, in Fibroblasten mit einem genetisch bedingten Mangel an Molybdän-Cofaktor oder SO bestimmt. In beiden Zelltypen wurde ein nahezu vollständiger Verlust der Nitrit-abhängigen cGMP Bildung festgestellt. Dies zeigte, dass SO, verglichen mit anderen Mo-abhängigen Enzymen, hauptsächlich zur Nitritreduktase Aktivität in Fibroblasten beiträgt. Darüber hinaus wurde die Expression von SO in Endothelzellen gezeigt, was zur Schlussfolgerung führte, dass SO zum Nitrit-NO Signalweg in Blutgefäßen beiträgt. Die hier erzielten Ergebnisse liefern somit neue Einblicke in das Verständnis des Elektronentransfers im klassischen SO Weg und bieten darüber hinaus ein neuartiges Konzept für die Funktion der SO in der Nitrit-abhängigen NO Synthese. Zukünftige Studien sollten SO in einen neuartigen Fokus in der Herz-Kreislauf Forschung positionieren.

Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, einschließlich Tabellen und Abbildungen, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Günter Schwarz am Institut für Biochemie der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln betreut worden.

Teilpublikationen:

Under revision: Jun Wang[#] and **Sabina Krizowski**[#] et al., "Sulfite oxidase catalyzes single electron transfer at molybdenum domain to reduce nitrite to NO." **(Antioxidants and Redox Signaling)** [#] Equal author contribution

Konferenzbeiträge:

2013: **Sabina Krizowski** et al., „Nitrite dependent NO synthesis in humans: A novel function of Sulfite Oxidase". Molybdenum and Tungsten Enzyme Conference. Sintra, Portugal.

2012: **Sabina Krizowski** et al., „Human Sulfite Oxidase, a novel nitrite reductase and NO synthase". Gordon Research Conference "Metals in Biology". Ventura, USA.

S. Krizowski

Köln, den 14.02.2014