

Molecular mechanism of sulfite oxidation and nitrite reduction in vertebrate sulfite oxidase

Köln, 2017

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln
vorgelegt von

Daniel Bender
aus Zweibrücken

Gutachter: Prof. Dr. Günter Schwarz
Prof. Dr. Ulrich Baumann

Tag der Disputation: 10.10.17

1.A. Zusammenfassung:

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein effektiver Botenstoff in vielen zellulären und systemischen Prozessen. Neben der oxidativen NO Synthese aus Arginine und molekularem Sauerstoff durch NO-Synthasen existiert ein reduktiver Syntheseweg welcher sauerstoffunabhängig durch Nitritreduktion zur NO-Homöostase beiträgt. Obwohl *in vitro* alle vier menschlichen Moco-abhängigen Enzyme in der Lage sind diese Reduktion zu katalysieren, zeigten zellbasierte Untersuchungen eine deutliche Abhängigkeit dieser Reaktion von der Funktion der mitochondrialen Sulfitoxidase (SO). Das katalytisch aktive Molybdän (Mo) der SO wird bei der Oxidation von Sulfit zu Sulfat von Mo^{VI} zu Mo^{IV} reduziert. Zwei unabhängige intramolekulare Elektronentransferreaktionen zu der SO-Hämdomäne und von da zum finalen Elektronenakzeptor Zytochrom c (Cyt c) schließen den katalytischen Zyklus. Es war zum Beginn der Arbeit bekannt, dass im katalytischen Zyklus der SO nur das voll reduzierte Mo^{IV} Enzymintermediat in der Lage ist Nitrit zu NO zu reduzieren. Hier wird gezeigt, dass trotz Anwesenheit der Hämdomäne und dessen Konkurrenz um dieses Elektron das Enzym in der Lage ist jedes Mo^{IV} Elektron zu nutzen um Nitrit zu reduzieren. Da das Enzym dadurch im Mo^{V} Status verbleibt ist nur ein stöchiometrischer Umsatz möglich. Durch Zugabe des physiologischen Elektronenakzeptors Cyt c wurde der katalytische Zyklus des Enzyms geschlossen und eine NO Synthese im Fließgleichgewicht ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Reduktion des Anions im aktiven Zentrum durch direkte Konkurrenz mit H_2O und dessen kovalente Koordination an das Molybdänatom ermöglicht wird. Durch Inhibitionsstudien mit Sulfit, Nitrit und der Hämdomäne war es möglich Enzymvarianten zu erzeugen, die eine gesteigerte Affinität gegenüber Nitrit aufwiesen. Die Nutzung der NO Messung als enzymatische Analyseverfahren erlaubte die Identifikation einer Kooperativität des Enzymes und seiner Untereinheiten. Durch Reduktion der Dimerisierung der SO wurde die katalytische Aktivität reduziert.

Weiterhin wurde eine Sulfitoxidasevariante untersucht die in einem Patienten zu Sulfitoxidasedefizienz führte. Es konnte festgestellt werden, dass der Aminosäureaustausch G362S den Einbau des Moco-Cofaktors um das 90fache vermindert. Durch Expressionsstudien in eukaryotischen und bakteriellen Zellen Expressionssystem wurde gezeigt, dass die Zugabe von Molybdän den Einbau des Moco *in vitro* und *in vivo* steigert.

1.B. Abstract:

Nitric oxide (NO) was uncovered as potent gaso-transmitter with tremendous systemic and cellular implications. Besides the oxidative NOS-dependent NO release converting L-arginine and molecular oxygen to NO (Kwon et al. 1990), a non-canonical nitrite-dependent reductive pathway allows an oxygen-independent NO supply. Although, all four members of the mammalian molybdenum cofactor-dependent enzyme family are able to reduce nitrite to NO *in vitro* (Maia & Moura 2015) previous studies demonstrated human SO as the most promising candidate among this enzyme family catalyzing the one-electron reduction *in vivo* (Wang et al. 2015). Although, EPR spectroscopy revealed Mo^{IV} to be the only catalytically active enzyme intermediate being able to reduce nitrite, a detailed mechanistic understanding of the reaction remained elusive. Here, it is shown that full-length SO is able to utilize each sulfite-derived Mo^{IV} electron for nitrite reduction resulting in a stoichiometric NO-to-enzyme ratio. The presence of the physiologic electron acceptor cytochrome c (Cyt c) in combination with nitrite allowed a steady-state NO release by shuttling the second sulfite-derived Mo^V-electron to Cyt c thereby closing the catalytic cycle. Furthermore, we provide evidence for an active site nitrite-molybdenum complex as transition state intermediate during nitrite reduction while a sulfite-reduced H₂O-molybdenum complex was less active. Competition studies of nitrite and sulfite enabled the identification of a reversed intramolecular electron transfer (IET) from the heme iron center to molybdenum. This allowed the design of enzyme variants with increased nitrite affinities and thus improved catalytic efficiency in NO release. Furthermore, introducing the sulfite-dependent nitrite reduction as third biochemical method to investigate SOs' kinetic behavior allowed the identification of subunit cooperativity in the homodimer and a trans-reactivity of the subunits between each other. This cooperativity is communicated via the dimerization domain as interfering with dimerization resulted in a loss of catalytic activity.

In addition, a patient-derived enzyme variant was investigated to uncover the underlying cause of disease. We could identify that the absence of specific SO activity in patient cells was due to a deficiency of Moco insertion induced by the G362S substitution. Since molybdate is a critical factor in Moco biosynthesis, patient fibroblasts were treated with the anion resulting in higher viability during sulfite treatment due to a partial rescue of SO activity.