

Reaction mechanism and physiologic relevance of sulfite oxidase-dependent NO formation

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr. rer. nat.

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Alexander Tobias Kaczmarek
aus Frechen

Köln, 2019

Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Schwarz

Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Baumann

Tag der Disputation: 15.08.2019

ABSTRACT

Since its discovery as a vasodilator, various biological functions were attributed to nitric oxide (NO) such as modulation of neuronal plasticity and regulation of mitochondrial metabolism. Two different pathways are known for *de novo* biosynthesis of NO, the oxygen-dependent NO synthase (NOS) pathway, oxidizing arginine to form NO, or the oxygen-independent reduction of nitrite by metal cofactor-dependent proteins. Among these, the molybdenum cofactor (Moco)-dependent sulfite oxidase (SO), an enzyme confined in the intermembrane space of mitochondria, consisting of an N-terminal heme, a Moco and C-terminal dimerization domain, was identified to efficiently reduce nitrite to NO. By using electrons derived from sulfite oxidation, SO catalyzes nitrite reduction involving a one electron transfer. However, the question arose how oxidation of sulfite to sulfate and the reduction of nitrite, which both take place at the molybdenum (Mo) center within SO, affect each other.

Here, high velocity SO-catalyzed steady-state nitrite reduction was demonstrated for human full-length SO as well as for a truncated human SO, which lacks the N-terminal heme domain. For this, an enzyme assay utilizing the artificial electron donor benzyl viologen was established which showed a strict pH-dependency of nitrite reduction with increased catalytic efficiency at acidic pH. Pre-steady-state kinetics of SO-dependent sulfite oxidation identified nitrite as a competitive inhibitor of sulfite oxidation and in accordance to the steady-state kinetics, nitrite inhibition displayed a reciprocal pH dependency to sulfite oxidation, with increased affinity of nitrite for SO and switch to a profound ultrasensitive response at acidic conditions. On the other hand, time-dependent formation of Mo(V) following nitrite reduction of SO disclosed a reciprocal inhibition of nitrite reduction by sulfite.

In vivo, NO formation of SO was confirmed in human cells. Here, a SO-deficient human embryonic kidney cell line was generated, which revealed endogenous SO to be a major source of cellular NO by measuring the downstream metabolite of NO signaling cyclic GMP. Under normoxia and especially hypoxia, mitochondrial SO was able to generate NO in a nitrite responsive manner. Stable re-introduction of *SUOX* gene in the genome of SO-deficient cells enabled to prove sulfite-dependent respiration of SO-containing isolated mitochondria, which qualifies SO as a major regulator of respiratory chain function as its production of NO inhibits respiration while on the other hand the flux of sulfite-derived electrons fuels respiration. Consequently, the SO nitrite reductase function could act as an ultrasensitive sensor, which ultimately orchestrates the reprogramming of mitochondrial metabolism, decreasing toxic production of reactive oxygen species and protecting the cell from ischemia/reperfusion injury.

In addition, the pathomechanism of three patient SO variants was uncovered by *in vitro* studies of the recombinant enzyme and by utilizing a newly established human cell model system for SO expression. Here, R366H variant was identified as maturation-deficient due to impaired Moco insertion efficiency, G266S variant was identified as catalytically inactive due to mutations close to the active site and S463F variant was identified as highly instable due to impairment of the protein fold adjacent to the dimerization motif.

ZUSAMMENFASSUNG

Seit der Entdeckung als Vasodilatator wurden Stickstoffmonoxid (NO) verschiedene biologische Funktionen zugeschrieben, unter anderem die Modulation neuronaler Plastizität und Regulation der mitochondrialen Funktion. Die NO *de novo* Biosynthese geschieht entweder mittels der sauerstoffabhängigen NO Synthetasen (NOS), welche Arginine zu NO oxidieren, oder der sauerstoffunabhängigen Reduktion von Nitrit zu NO durch Metall Cofactor-abhängiger Proteine. Von diesen wurde die Molybdän-Cofaktor (Moco)-abhängige Sulfit Oxidase (SO), ein Enzym das im Intermembranraum der Mitochondrien lokalisiert ist und aus einer N-terminalen Haem, einer Moco und C-terminalen Dimerisierungs Domäne besteht, als Nitritreduktase identifiziert. Durch die Verwendung von Elektronen, die aus der Sulfitoxidation stammen, katalysiert SO die Nitritreduktion mittels eines Ein-Elektronentransfer. Es stellte sich jedoch die Frage, wie sich die Oxidation von Sulfit zu Sulfat und die Reduktion von Nitrit, welche beide am Molybdän (Mo) -Zentrum in SO stattfinden, gegenseitig beeinflussen.

Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die SO-abhängige Nitritreduktion der intakten SO sowie der isolierten Moco-Domäne mittels des artifiziellen Elektronendonors Benzylviologen bestimmt, welche für beide erhöhte katalytischer Effizienz unter sauren Bedingungen aufwies. Zudem, wurde Nitrit als kompetitiver Inhibitor beider SO-Halbreaktionen identifiziert und wie zuvor, zeigte die resultierende Nitrit-Hemmung eine pH-Abhängigkeit, mit deutlich erhöhter Affinität von Nitrit für SO unter sauren Bedingungen. Schließlich demonstrierten Elektronen-Spinresonanzspektroskopie Messungen der zeitabhängigen Mo(V)-Spezies Bildung, die wechselseitige Hemmung der SO-abhängigen Nitritreduktion durch Sulfit.

Die *in vivo* NO Synthese der SO wurde zudem in einem menschlichen Zellmodellsystem getestet. Hier wurde eine SO-defiziente humane embryonale Nierenzelllinie generiert, welche durch die Messung des NO-abhängigen Sekundärmetabolit cGMP zeigte, dass endogene SO eine wesentliche Quelle für zelluläres NO ist. Unter Normoxie und insbesondere Hypoxie war mitochondriale SO in der Lage, Nitrit zu NO zu reduzieren. Die stabile Wiedereinführung des *SUOX* Gens ermöglichte zudem den Nachweis der Sulfit-abhängigen Atmung von SO-haltigen isolierten Mitochondrien, welches SO als einen Hauptregulator der Atmungskettenfunktion qualifiziert, da zum einen die SO-abhängige NO Synthese die Atmung hemmt und zum anderen SO Elektronen in die Atmungskette einspeist. Dementsprechend ist anzunehmen, dass SO durch ihre Nitritreduktion als ein ultrasensitiver Sensor zur Neuprogrammierung des mitochondrialen Stoffwechsel fungieren, toxische Produktion reaktiver Sauerstoffspezies verringern und die Zelle vor Reperfusionsschaden schützen kann.

Zusätzlich wurde der pathologische Mechanismus dreier Patienten-SO-Varianten durch *in vitro* Studien und durch ein neu etabliertes Humanzell-Modellsystem für die Expression der SO aufgedeckt. Daraus resultierend wurde die R366H-Variante aufgrund der beeinträchtigten Moco-Insertion als Reifungs-defizient, die G266S-Variante aufgrund Mutationen in der Nähe des aktiven Zentrums als katalytisch inaktiv und die S463F-Variante aufgrund Beeinträchtigung der Proteinfaltung im Dimerisierungsmotiv als hochinstabil identifiziert.