

# **A Novel Mouse Model of Sulfite Oxidase Deficiency: Pathological Changes in Cysteine and H<sub>2</sub>S Metabolism**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Joshua Benedict Kohl**

aus Köln

Berichterstatter: Prof. Dr. Guenter Schwarz  
Gutachter: Prof. Dr. Marcus Krüger

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 12.08.2019

## ABSTRACT

---

Isolated sulfite oxidase deficiency (ISOD) and molybdenum cofactor deficiency (MoCD) are autosomal recessive inborn errors of metabolism characterized by progressively severe, neurodegenerative symptoms including neonatal seizures, developmental delay and often lead to death in childhood. The major underlying cause for the symptoms in both deficiencies is the loss of sulfite oxidase (SO) activity, which is responsible for oxidizing toxic sulfite to sulfate. Sulfite is a strong nucleophile and potent inhibitor of mitochondrial function. Additionally, sulfite reacts with cystine to form neurotoxic S-sulfocysteine (SSC) and cysteine. Sulfite is produced through two different catabolic pathways of cysteine: the oxidative cysteine catabolism, which results in taurine or sulfate production, and the H<sub>2</sub>S oxidation pathway; however, it is unknown to which extent these individual pathways contribute to sulfite production in ISOD/MoCD.

This study shows that SO is strongly expressed in liver and kidney, followed by heart and muscle in mice. The liver and the kidney were also identified as the major organs for enzymes of the H<sub>2</sub>S oxidation. All enzymes of H<sub>2</sub>S biogenesis and oxidation, including SO, were found to increase over the course of hepatic development in mice. Using the genome-editing tool CRISPR-Cas9, a SO-deficient mouse model was generated. The generated ISOD model displayed a severe phenotype, including decreased neuromotor skills and weight gains. ISOD mice die within the first 12 days of life, with an average survival time of 9.6 days. Biomarker assessment revealed an increase in urinary sulfite, SSC and drastically increased thiosulfate characteristic for ISOD / MoCD patients. No macroscopic brain damage was observed, but cleavage of spectrin  $\alpha$ -II and gephyrin was detected, resembling observations in other MoCD model systems.

Using the ISOD model, broad metabolic analyses and metabolite quantifications were performed. A strong decline of plasma cysteine and methionine was accompanied by a general reduction in the urinary excretion of amino acids. Accordingly, SO-deficient livers and kidneys displayed an expected decrease in glutathione (GSH) concentrations. In contrast, brains from ISOD mice maintained GSH concentrations through a specific upregulation of the cystine-antiporter system  $x_c^-$ . Interestingly, plasma H<sub>2</sub>S concentrations were increased, while protein persulfidation – the thiol-bound form of H<sub>2</sub>S - were decreased. Sulfite was found to react directly with multiple model persulfides, forming an S-sulfonate and releasing free H<sub>2</sub>S. Proteomic profiling of brains, livers and kidneys disclosed alterations in all studied cysteine catabolism pathways. In the brain, cysteine catabolism enzymes displayed only medium-to-low overall abundance and no significant alterations. Enzymes of the oxidative cysteine catabolism were strongly downregulated in liver and unlikely to contribute to overall sulfite production. Both H<sub>2</sub>S biogenesis and oxidation displayed an organ-specific deregulation, with multiple H<sub>2</sub>S-producing enzymes being downregulated in one or both organs. Sulfide:quinone oxidoreductase (SQR) and thiosulfate sulfurtransferase, two major H<sub>2</sub>S detoxifying enzymes, were reduced in kidney or liver and kidney, respectively. The latter changes were replicated in tungstate-treated mice, a pharmacological model of MoCD, as well as ISOD / MoCD patient-derived fibroblasts, indicating a conserved disease mechanism.

In conclusion, the results of this study demonstrate that in the newly generated ISOD model, the majority of sulfite is likely produced through H<sub>2</sub>S oxidation rather than oxidative cysteine catabolism. Additionally, organ-specific impairment of the initial H<sub>2</sub>S fixation step catalyzed by SQR and a direct sulfite-persulfide reaction likely contribute to increased plasma H<sub>2</sub>S concentrations. Finally, a metabolic shift towards increased SQR-catalyzed thiosulfate production and inhibition of multiple thiosulfate-utilizing reactions is proposed to accumulate thiosulfate in ISOD mice.

## KURZZUSAMMENFASSUNG

---

Isolierte Sulfitoxidase-Defizienz (ISOD) und Molybdän-Kofaktor-Defizienz (MoCD) sind autosomal-rezessive, metabolische Erbkrankheiten, die sich durch progressiv schwerere, neurodegenerative Symptome wie Spastiken und Entwicklungsverzögerungen auszeichnen und häufig zu einem frühen Tod führen. Die hauptsächliche molekulare Ursache für die Entwicklung der Symptomatik in beiden Defizienzen ist der Verlust der Sulfitoxidase (SO)-Äktivität, die für die Oxidation von toxischem Sulfit zu Sulfat verantwortlich ist. Sulfit ist stark nukleophil und ein potenter Inhibitor multipler mitochondrialer Prozesse. Sulfit reagiert außerdem direkt mit Cystin und bildet Cystein und neurotoxisches S-sulfocystein (SSC). Sulfit kann in zwei unterschiedlichen Katabolismen von Cystein produziert werden: dem oxidativen Cystein-Katabolismus, und der Schwefelwasserstoff (H<sub>2</sub>S)-Oxidation. Es ist nicht bekannt, welchen Anteil die beiden Katabolismen an der Sulfitproduktion in ISOD und MoCD haben.

Diese Studie zeigt eine starke Expression der SO in Lebern und Nieren von Mäusen, sowie eine mittlere Expression in Herzen und Muskeln. Leber und Niere wurden außerdem als die Haupt-Organen der H<sub>2</sub>S-Oxidation identifiziert. Alle bekannten Enzyme der H<sub>2</sub>S-Biogenese und -Oxidation werden sukzessiv stärker von der embryonalen zur adulten Leber exprimiert. Unter Einsatz der neuen CRISPR/Cas9-Methode war es möglich, ein SO-defizientes Mausmodell zu generieren. Das neue ISOD-Modell wies einen schweren Krankheitsphänotyp auf, mit abnehmenden neuromotorischen Fähigkeiten und Verlust der Gewichtszunahme. Das Modell wies eine Lebensdauer von maximal 12 Tagen auf, mit einer mittleren Überlebensdauer von 9.6 Tagen. Die Quantifikation von charakteristischen ISOD / MoCD-Biomarkern ergab eine Zunahme von Sulfit und Thiosulfat im Urin und eine Zunahme von SSC in Urin und Plasma. Makroskopischer Hirnschaden wurde nicht gefunden, allerdings wurden MoCD-charakteristische Spaltprodukte von Spektrin  $\alpha$ -II und Gephyrin in Hirnlysaten detektiert.

Das neue ISOD-Mausmodell wurde mehreren metabolischen Analysen unterzogen. Eine allgemeine Abnahme von Blutplasma- und Urin-Aminosäuren einschließlich der Schwefel-Aminosäuren Cystein und Methionin wurde detektiert. Dementsprechend zeigten Lebern und Nieren von SO-defizienten Mäusen eine Abnahme von zellulärem Glutathion (GSH). Hingegen wurde in SO-defizienten Gehirnen keine Abnahme von GSH detektiert, was mit einer spezifischen erhöhten Produktion des Cystin-Glutamat-Antiporters System x<sub>c</sub><sup>-</sup> korreliert werden konnte. Erhöhte H<sub>2</sub>S-Konzentrationen im Blutplasma wurden detektiert, was initial im Gegensatz zu einer erniedrigten Leber-Proteinpersulfidierung stand. Allerdings konnte eine direkte Reaktion von Sulfit mit mehreren Modell-Persulfiden identifiziert werden, bei der ein S-Sulfonat entsteht und H<sub>2</sub>S frei wird. Durch die Erstellung von Proteomprofilen von SO-defizienten Gehirnen, Lebern und Nieren war es möglich, die Enzyme der verschiedenen Cystein-Katabolismen zu quantifizieren. In Gehirnen sind diese lediglich mit einer mittleren bis niedrigen Abundanz vertreten, und keine signifikanten Veränderungen wurden gemessen. Die Enzyme des oxidativen Cystein-Katabolismus wurden nur teilweise in allen gemessenen Nierenproben detektiert, und es zeigte sich eine stark verringerte Abundanz in SO-defizienten Lebern. Es lässt sich schlussfolgern, dass der oxidative Cystein-Katabolismus in dem ISOD-Modell nur eine untergeordnete Rolle spielen dürfte. Sowohl für die H<sub>2</sub>S-Biogenese als auch die -Oxidation wurde eine organ-spezifische Deregulation nachgewiesen. Enzyme der H<sub>2</sub>S-Biogenese waren weniger abundant in SO-defizienten Nieren und teilweise in Lebern. Sowohl Sulfid:Chinon-Oxidoreduktase (SQR) als auch Thiosulfatsulfurtransferase (TST), zwei essentielle H<sub>2</sub>S-fixierende Enzyme, wurden als runterreguliert in Nierenproben gemessen, und TST wurde ebenfalls als mit verringerter Expression und Aktivität in Leberproben gemessen. SQR und TST wurden ebenfalls in Lebern von Wolframat-behandelten Mäusen - einem weiteren MoCD-Modell - und ISOD- / MoCD-Patienten-Fibroblasten mit geringerer Expression detektiert, was einen möglicherweise konservierten Krankheitsphänotyp darstellt.

Zusammenfassend konnte in dieser Studie ein neues ISOD-Modell-System erstellt und charakterisiert werden, in welchem der Großteil des detektierten Sulfits wahrscheinlich durch die H<sub>2</sub>S-Biogenese und -Oxidation produziert wird. Zusätzlich konnte eine organ-spezifische Beeinträchtigung der durch SQR katalysierten, initialen H<sub>2</sub>S-Fixierung sowie eine direkte Sulfit-Persulfid-Reaktion festgestellt werden, die zu den erhöhten Blutplasma-Konzentrationen von H<sub>2</sub>S beitragen. Abschließend können ein metabolischer Wechsel der SQR von GSH-Persulfid-Produktion in Richtung der alternativen, Thiosulfat-produzierenden Reaktion sowie die Inhibition mehrerer Reaktionen, bei denen Thiosulfat als Substrat verwendet wird, zur Akkumulation von Thiosulfat in SO-defizienten Mäusen beitragen.