

## Zusammenfassung

Enzyme des Schwefelmetabolismus werden zunehmend als mögliche Ziele für die Diagnose und Therapie von inflammatorischen und neurodegenerativen Erkrankungen erkannt. Insbesondere die Untersuchung angeborener Stoffwechselstörungen hat wesentlich zum gegenwärtigen Verständnis des Schwefelstoffwechsels beigetragen. Die aktuelle Studie konzentriert sich auf zwei verschiedene Aspekte des oxidativen Cysteinkatabolismus im Menschen. Zunächst wurden zwei Enzyme des Cysteinabbaus, die zur Bildung von Sulfit führen, charakterisiert. In einer ersten Reaktion des zytosolischen Enzyms Cystein Dioxygenase (CDO) kommt es nach Addition von molekularem Sauerstoff an Cystein zur irreversiblen Bildung von Cysteinsulfinsäure (CSA). *Steady-State*-Kinetiken der menschlichen CDO ergaben eine wichtige Rolle des charakteristischen Cys-Tyr-Crosslinks bei der Erhöhung der katalytischen Aktivität. Darüber hinaus ergaben Eisen-Titrationsexperimente eine Abnahme des  $K_d$  von Eisen nach Bildung des Crosslinks in der CDO. Diese Ergebnisse deuten auf eine strukturelle Rolle des Crosslinks in der Koordination des Eisens im aktiven Zentrum der CDO hin, welche im Einklang mit einem zuvor postulierten Reaktionsmechanismus der CDO sind.

In einer zweiten enzymatischen Reaktion wurde die Desaminierung von CSA durch Aspartat-Aminotransferase (AAT) postuliert, welche zur Bildung von Pyruvat und im weiteren Verlauf zu Sulfit führt. Die Existenz von zwei AAT-Isoformen im Zytosol (cAAT) und in den Mitochondrien (mAAT) wirft die Frage nach der subzellulären Lokalisation der Sulfit-Bildung auf. *Steady-State*-Kinetiken der CSA-Desaminierung und zellulären Experimente in HEK293-Zellen zeigten eine höhere Aktivität für mAAT im Vergleich zu cAAT, was auf eine bevorzugte mitochondriale Lokalisation der Sulfit-Bildung hindeutet. Weitere Experimente erlauben die Hypothese, dass CSA eine mögliche Funktion im Gehirn spielt. Exzitotoxizität und zelluläre Aufnahme in kultivierten primären Neuronen identifizierten CSA als potenzieller Neurotransmitter. Als Reaktionsprodukt der CSA Desaminierung durch AAT wurde  $\beta$ -Sulfinylpyruvat als putatives Intermediat postuliert, welches nicht enzymatisch zu Sulfit und Pyruvat zersetzt werden soll. Zur Untersuchung dieses Prozesses wurde ein gekoppelter Enzymassay entwickelt, welcher die CSA-Desaminierung und Sulfit-Oxidation unter Verwendung von AAT und Sulfitoxidase (SO) kombiniert wurde. Hierbei weist eine direkte Messung der Sulfit-Oxidation nach CSA Desaminierung darauf hin, dass  $\beta$ -Sulfinylpyruvat nicht akkumuliert. Des Weiteren zeigte das gekoppelte Enzymassay eine erhöhte Affinität für die Sulfit-Bildung aus CSA der mitochondrialen über der cytosolische AAT-Isoform, welches in Übereinstimmung mit der mitochondrialen Lokalisation der SO ist, dem terminalen Enzym des oxidativen Cysteinkatabolismus zu Sulfit.

Ein weiterer Aspekt dieser Studie befasste sich mit der Möglichkeit der Inhibierung der Sulfit-Bildung als potenzielle Therapie für zwei angeborene Stoffwechselstörungen: Molybdän-Cofaktor-Defizienz (MoCD) und isolierte SO Defizienz (SOD), welche durch eine Störung der Sulfit-Oxidation charakterisiert sind und zu schweren neurodegenerativen Symptome und Tod im frühen Kindesalter führen. Zu diesem Zweck wurde ein Hochdurchsatz-basierter CDO-Aktivitätstest zur Inhibitoridentifikation etabliert. Hierdurch konnte eine CDO Hemmung durch  $\alpha$ -Ketoglutarat und Glutarat identifiziert und mittels HPLC-basierter Kinetik charakterisiert werden. Der verwendete Assay kann für Identifizierung weiterer Inhibitoren eingesetzt werden. Mittels *in-vivo*-Studien kann das Potential der CDO-Hemmung als therapeutischer Ansatz für die mit Sulfittoxizität im Zusammenhang stehende Erkrankungen bewertet werden und entscheidend zum Verständnis der funktionellen Bedeutung von CDO und ihre Beziehung zu neurodegenerativen Erkrankungen beitragen.