

Chalkogenhaltige Proteine

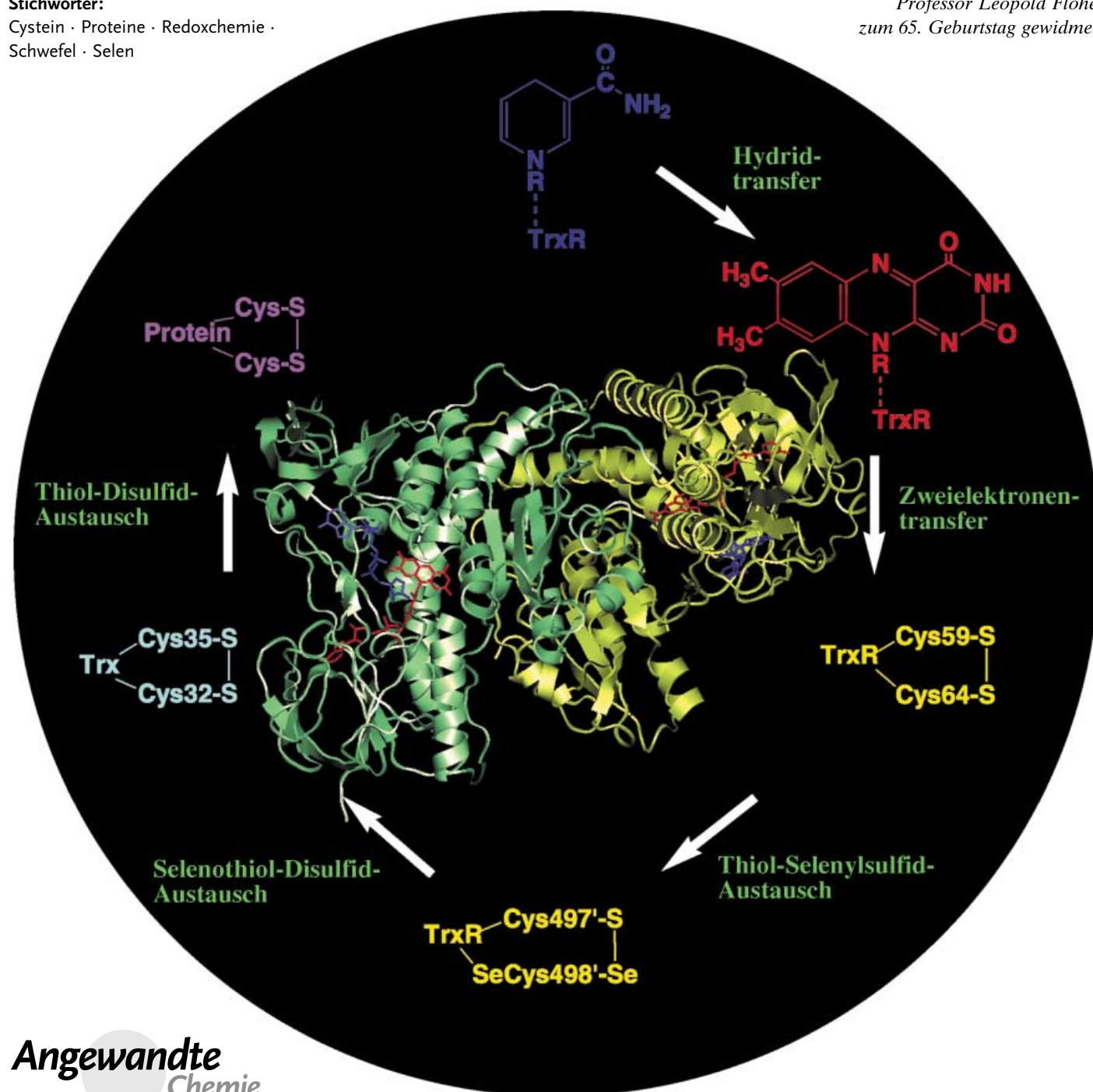
Schwefel und Selen: Bedeutung der Oxidationsstufe für Struktur und Funktion von Proteinen

Claus Jacob,* Gregory I. Giles, Niroshini M. Giles und Helmut Sies*

Stichwörter:

Cystein · Proteine · Redoxchemie · Schwefel · Selen

Professor Leopold Flohé
zum 65. Geburtstag gewidmet



Schwefel und Selen kommen in Proteinen als Bestandteile der Aminosäuren Cystein, Methionin, Selenocystein und Selenomethionin vor, deren Ausnahmestellung in neueren Arbeiten unterstrichen wird. Ihre Redoxeigenschaften unter physiologischen Bedingungen ermöglichen eine erstaunliche Vielfalt posttranslationaler Proteinmodifikationen, metallfreier Redoxreaktionen und ungewöhnlicher Chalkogenredoxzustände. Wie keine andere Aminosäure kann das „Redox-Chamäleon“ Cystein an so unterschiedlichen Redoxreaktionen wie Atom-, Elektronen- und Hydridtransfer sowie Radikal- und Austauschreaktionen beteiligt sein. Es kommt im menschlichen Körper in zahlreichen Oxidationsstufen vor, von denen jede mit charakteristischen chemischen (z. B. Redox- und Metallbindungs-) und biologischen Eigenschaften verknüpft ist. Durch die Position des Selen im Periodensystem der Elemente zwischen Metallen und Nichtmetallen werden Selenoproteine zu idealen Katalysatoren einer Vielzahl biologischer Redoxumwandlungen, sodass die chalkogenhaltigen Aminosäuren Cystein, Methionin, Selenocystein und Selenomethionin und ihre einzigartige Biochemie Gegenstand eines vielversprechenden Forschungsgebietes sind.

1. Einleitung

Die Chalkogene („Erzbildner“) Sauerstoff, Schwefel und Selen haben eine Vielzahl wichtiger biologischer Funktionen. Die drei Elemente sind Bestandteile funktioneller Gruppen von Biomolekülen, die in vivo an Redoxreaktionen beteiligt sind. Die fundamentale Bedeutung von Redoxsystemen auf Chalkogenbasis in der Biologie wird anhand des Gebietes der redoxaktiven Proteine deutlich.^[1–5] Die meisten Proteine benötigen organische oder anorganische Cofaktoren (z. B. Metallionen, NAD⁺, FAD) für ihre Redoxaktivität. Im Unterschied dazu verleihen die chalkogenhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin (Cys und Met, beide schwefelhaltig), Selenocystein und Selenomethionin (SeCys und SeMet, beide selenhaltig) sowie Tyrosin (Tyr, enthält redoxaktiven Sauerstoff) Proteinen redoxchemische Eigenschaften, die auf Aminosäureseitenketten beruhen. Darüber hinaus existieren die meisten redoxaktiven Metallionen-Cofaktoren in vivo in nur zwei oder drei Oxidationsstufen, während der Cysteinschwefel in bis zu zehn Oxidationsstufen gefunden wird (d. h. von +6 bis –2, einschließlich nicht-ganzzahliger Stufen).^[6] Eine Übersicht über die häufigsten Modifikationen von Cystein, Methionin, Selenocystein und Selenomethionin, die bislang in biologischen Systemen identifiziert wurden, findet sich in Abbildung 1. Bedenkt man, dass jede der Modifikationen eine separate posttranslationale Modifikation mit spezifischen Eigenschaften (z. B. Redoxaktivität oder Metallbindung) ist, so wird die Komplexität der Biochemie der Chalkogene deutlich.

In diesem Aufsatz behandeln wir die Biochemie der Chalkogene ausgehend von den unterschiedlichen Oxidationsstufen; dabei liegt der Schwerpunkt auf der Biochemie der Eukaryoten. Abschnitt 2 befasst sich mit der posttranslationalen Redoxmodifikation des Cysteins und seiner Eigen-

schaft, durch unterschiedliche Redoxmechanismen zu reagieren, Abschnitt 3 behandelt die biologische Redoxchemie von Disulfiden und Methionin, deren Verhalten unter oxidativem Stress zurzeit intensiv erforscht wird. Abschnitt 4 untersucht die Metall-Bindung als eine der wichtigen Eigenschaften dieser jeweiligen Modifikationen. Nicht alle Redoxenzyme tragen redoxaktive Aminosäurereste oder Metalle im aktiven Zentrum, und Abschnitt 5 diskutiert entsprechende Dehydrogenasen, die redox-inerte Cysteinreste oder Zink-Cystein-Komplexe enthalten. In Abschnitt 6 schließlich wird das charakteristische Redoxverhalten von Selenocystein und Selenomethionin angesprochen.

2. Cystein in Redoxproteinen

Ein Aufsatz zur biologischen Redoxchemie des Cysteins ist mit der Komplexität des Themas konfrontiert.^[7] Um Systematik in die Behandlung des Gebietes zu bringen, soll das Redoxverhalten des Cysteins nach zugrundeliegenden Redoxmechanismen klassifiziert werden. Schwefel hat die Elektronenkonfiguration 3s²3p⁴, wodurch Oxidationsstufen von +6 bis –2 möglich sind. Im Cystein ist der Schwefel

Aus dem Inhalt

1. Einleitung	4891
2. Cystein in Redoxproteinen	4891
3. Disulfid-S-oxide, S-Sulfate, Sulfoxide und Sulfone in Proteinen	4898
4. Metallbindungseigenschaften von Cystein, Sulfinsäuren und Sulfoxiden	4900
5. Cysteinabhängige Dehydrogenasen und Proteasen	4902
6. Vom Schwefel zum Selen – Ähnlichkeiten und Unterschiede	4903
7. Zusammenfassung und Ausblick	4905

[*] Dr. C. Jacob, Dr. G. I. Giles, Dr. N. M. Giles
School of Chemistry, University of Exeter
Stocker Road, Exeter EX44QD (Großbritannien)
Fax: (+44) 1392-263434
E-mail: C.Jacob@ex.ac.uk
Prof. Dr. H. Sies
Institut für Biochemie und Molekularbiologie I
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Postfach 101007, 40001 Düsseldorf (Deutschland)
E-mail: sies@uni-duesseldorf.de

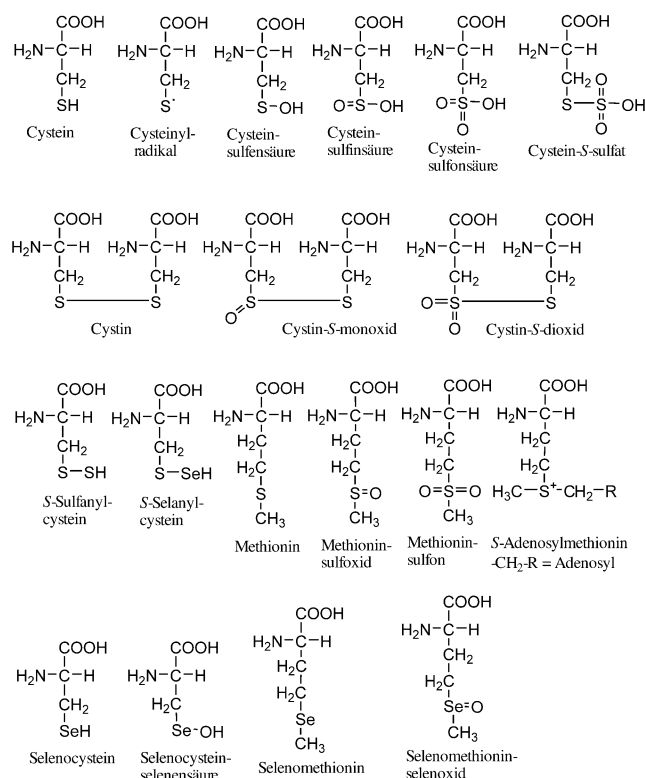
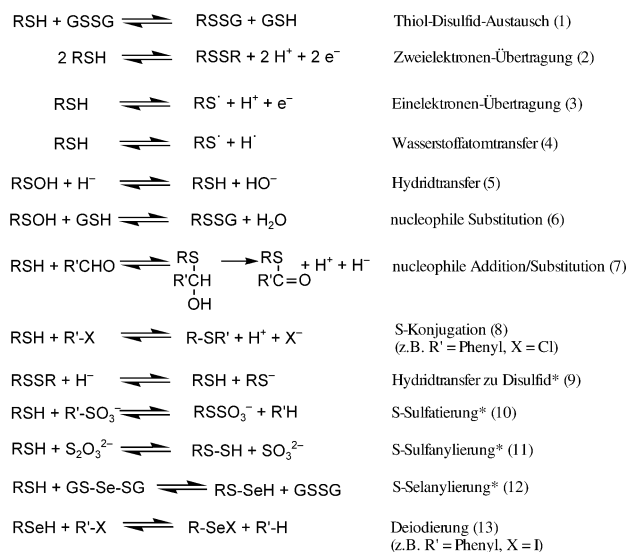


Abbildung 1. Häufige Modifikationen von Cystein, Selenocystein, Methionin und Selenomethionin in Proteinen. Diese Modifikationen sind in vivo nachgewiesen, oder ihr Vorkommen in vivo wurde postuliert.

vollständig reduziert (Oxidationsstufe -2), und die Thiolgruppe kann unter physiologischen Bedingungen eine Vielzahl von Reaktionen eingehen, von denen einige in Schema 1 dargestellt sind.



Schema 1. Redoxmechanismen und -reaktionen des Cysteins. Details zu den Mechanismen und ihrem Auftreten in vivo sind im Text beschrieben. Ein Stern (*) markiert theoretisch mögliche Reaktionswege in der Redoxchemie des Cysteins, deren Existenz in vivo aber noch nicht bestätigt wurde. Der Protonierungszustand der schwefelhaltigen Spezies in den Reaktionen kann variieren.



Claus Jacob (geb. 1969) ist Lecturer im Fach Anorganische Chemie an der University of Exeter. Er ist BSc für Chemie (University of Leicester, 1993), hat im Fach Bioanorganische Chemie promoviert (University of Oxford, 1997) und ist Magister für Philosophie, Geschichte und Psychologie (Universität Hagen, 1998). Seine Forschungsinteressen umfassen die biologische Redoxchemie der Chalkogene, rationales Wirkstoff-Design, Bio-Elektrochemie und Philosophie der Chemie. Er ist Chairman und einer der Direktoren von Exeter Antioxidant Therapeutics Ltd.



Gregory Giles (geb. 1974) ist wissenschaftlicher Mitarbeiter an der University of Exeter. Er ist BSc für Chemie (University of Durham, 1996) und hat in Bioorganischer Chemie promoviert (University of Southampton, 2000). Seine Forschungsinteressen umfassen die Biochemie von Redoxprozessen und das Design von Verbindungen, die die Aktivität von Redoxenzymen imitieren. Dr. Giles ist einer der Direktoren von Exeter Antioxidant Therapeutics Ltd.



Helmut Sies (geb. 1942) ist Professor an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und Direktor des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I der Medizinischen Fakultät. Er promovierte zum Dr. med. an der Ludwig-Maximilians-Universität in München (1967) und habilitierte sich ebendort in Physiologischer Chemie und Physikalischer Biochemie (1972). Er war Präsident der International Society for Free Radical Research (1998–2000) und ist derzeit Präsident der Nordrhein-Westfälischen Akademie der Wissenschaften. Seine Forschungsinteressen gelten oxidativem Stress, Oxidantien und Antioxidantien sowie Mikronährstoffen und Vitaminen.



Niroshini Giles, geborene Silva (geb. 1974), ist wissenschaftliche Mitarbeiterin an der University of Exeter. Sie ist BSc für Biochemie (Imperial College, 1996) und Associate of the Royal College of Science und hat in Enzymkinetik promoviert (University of Southampton, 1999). Ihre wissenschaftlichen Arbeiten umfassen die Aufklärung struktureller und mechanistischer Prozesse in Entzündungen, Antioxidantien, redoxgesteuerte Signalübertragung und Krebs therapie.

In Proteinen ist Cystein an einer Reihe von Redoxreaktionen beteiligt, die keine direkte Elektronenübertragung einschließen, jedoch daran gekoppelt sein können. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die Redoxaktivität des Schwefels in vivo, wie am Beispiel des Tripeptids Glutathion (γ -Glu-Cys-Gly, GSH) deutlich wird. GSH ist ein wichtiges intra- und extrazellulär vorkommendes Peptid mit einer Vielzahl biologischer Funktionen,^[8–13] darunter der Aufrechterhaltung des Redox-Fließgleichgewichts. GSH [E° (GSSG/2GSH) \approx –250 mV (NHE)] kann leicht zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert werden, und das jeweilige Verhältnis GSH/GSSG justiert das intrazelluläre Thiol-Redoxpotential. In den meisten gesunden Zellen liegt ein GSH/GSSG-Verhältnis von 100:1 vor.^[10,11] Durch oxidativen Stress wird dieses Verhältnis zugunsten von GSSG verschoben (siehe Abschnitte 3 und 4). Dies kann zelluläre Proteine, DNA und Membranen beeinflussen.

Mechanistisch betrachtet kann GSH an Elektronenübertragungs-, Atomübertragungs- und Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen beteiligt sein. Infolgedessen reagiert es mit einer Vielfalt zellulärer Oxidantien, wobei seine Regeneration über Thiol-Disulfid-Austausch verläuft. GSH und damit assoziierte Redoxproteine können demnach als „Schaltzentrale“ der zellulären Redoxchemie betrachtet werden, in der die vielen unterschiedlichen Redoxwege zusammenlaufen.^[12,13] Diese Redoxmechanismen sollen nun im Detail besprochen werden.

2.1. Thiol-Disulfid-Austausch

Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen sind nucleophile Substitutionen durch ein Thiol oder Thiolat als Nucleophil (RSH oder RS[–]) an einer Disulfidbindung (RS–SR), die die formale Oxidation des Nucleophils und die Reduktion der „ausgetauschten“ Abgangsgruppe zur Folge haben (Reaktion (1) in Schema 1). Diese Reaktionen sind mit die häufigsten Redoxreaktionen von Cysteinyresten in vivo. Sie vermitteln z. B. die reversible Bildung struktureller Disulfide in Peptiden und Proteinen, die Aufrechterhaltung des zellulären Redox-Fließgleichgewichts, die Regulation von Enzymaktivitäten (S-Thiolierung oder S-Glutathionylierung, siehe Abschnitt 2.2), die Redoxregulation zellulärer Signalwege und redoxkatalytische Prozesse. In Proteinen wird das Zweielektronen-Redoxpotential des Cystein-Cystin-Redoxpaares

durch benachbarte Aminosäurereste beeinflusst; es liegt zwischen –125 mV [dsbA-Genprodukt (DsbA) in *Escherichia coli* (*E. coli*), das die Bildung von Disulfidbindungen unterstützt] und –270 mV (Thioredoxin, Trx-1) (Tabelle 1). Die Diversität der Potentiale spiegelt die vielfältigen Funktionen der Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen in vivo wider, die von der Reduktion von Proteinen bis zur Vermittlung der Disulfidbildung reichen. Es sei betont, dass die Redoxpotentiale der Thiol-Disulfid-Paare zwar formal gemessen werden können, dies jedoch nicht bedeutet, dass die Redoxzyklen zwangsläufig auch in vivo eine Elektronenübertragung einschließen.

Das Thioredoxin-Motiv Cys-Xaa1-Xaa2-Cys (Xaa = Aminosäure, siehe Tabelle 1) ist ein typisches Thiol-Disulfid-Redoxmotiv, das sich im aktiven Zentrum von Thioredoxinen (Trx), Glutaredoxinen (Grx), Tryparedoxinen (TXN) sowie DsbA und Proteindisulfidisomerasen (PDIs) findet. Obwohl diese Proteine unterschiedliche biologische Funktionen haben, gleicht der Mechanismus der jeweiligen Redoxreaktionen dem der Thioredoxine.

Thioredoxine sind ubiquitäre 12-kDa-Proteine, die als Bestandteil von Redoxketten unterschiedliche Funktionen bei der Reduktion von Proteinen haben. Menschliche Thioredoxine können z. B. die Aktivierung und DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren sowie die Aktivität von Redoxenzymen beeinflussen und spielen eine wichtige Rolle bei oxidativem Stress und der Apoptose.^[14] Sie reduzieren Disulfide in Proteinen durch Thiol-Disulfid-Austausch unter Bildung eines intramolekularen Disulfids im aktiven Zentrum. Alle Thioredoxine haben eine ähnliche Tertiärstruktur, bestehend aus einem zentralen Kern aus fünf Strängen, die ein β -Faltblatt bilden und von vier α -Helices umschlossen sind. Im aktiven Zentrum des menschlichen Trx1 findet sich die konservierte Aminosäuresequenz Cys32-Gly-Pro-Cys35. Die beiden Cysteinyreste befinden sich in direkter Nachbarschaft, was die reversible Oxidation des Thiols zum Disulfid ermöglicht. Die Thiolgruppe des N-terminalen Cys32 hat einen niedrigen pK_s-Wert (6.7) und fungiert damit als Nucleophil bei der Reduktion von Disulfiden in Zielproteinen. Diese Reaktion verläuft unter Bildung eines intermediären gemischten Disulfids (Cys32-S-SR) und anschließend dem schnellen Thiol-Disulfid-Austausch mit Cys35, was dazu führt, dass das Thioredoxin ein Disulfid bildet (Cys32-S-S-Cys35) und zugleich zwei reduzierte Cysteine im Zielprotein hinterlässt.^[15] Oxidiertes Trx benötigt sodann Thioredoxinre-

Tabelle 1: Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen. Das Redoxpotential des Cysteins ist in diesen Proteinen auf die jeweilige Aktivität abgestimmt.

Protein	Motiv im aktiven Zentrum	Redoxpotential [mV gegen NHE] ^[a]	biologische Funktion
Thioredoxin (12 kDa)	-Cys-Gly-Pro-Cys-	–270	Proteinreduktion ^[14]
Glutaredoxin (9 kDa)	-Cys-Pro-Tyr-Cys-	–233 (Grx-1) –198 (Grx-3)	katalysiert die Reduktion von Ribonucleotidreduktase durch GSH ^[132]
Tryparedoxin (16 kDa)	-Cys-Pro-Pro-Cys-	–249	verwendet Trypanothion anstelle von GSH ^[133,134]
Proteindisulfidisomerasen (57 kDa)	-Cys-Gly-His-Cys-	–127	katalysieren Reduktion und Neubildung von Disulfidbrücken ^[135]
DsbA (21 kDa)	-Cys-Pro-His-Cys-	–125	katalysiert Bildung und Umlagerung von Proteindisulfidbindungen aus Thiolen bzw. fehlgebildeten Disulfidbindungen ^[136]

[a] Reaktion: RSSR + 2 e[–] + 2 H⁺ → 2 RSH.

duktase (TrxR) zur Wiederherstellung seines reduzierten Zustandes, ein Prozess, der unter NADPH-Verbrauch verläuft (siehe Abschnitt 2.3).

Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen werden nicht nur zum Spalten (d.h. zur Reduktion) von Disulfidbindungen in Proteinen genutzt, sondern auch zu ihrem Aufbau. Disulfidbrücken sind für Proteinfaltung und Proteinstabilität von Bedeutung, und ihre Bildung wird von Enzymen wie PDI und DsbA katalysiert, die sich im endoplasmatischen Retikulum eukaryotischer Zellen bzw. im Periplasma von Prokaryoten befinden. Auch wenn das Motiv im aktiven Zentrum von DsbA und PDI dem der Thioredoxine ähnelt (Tabelle 1), können sie wegen ihrer deutlich positiveren Redoxpotentiale (-125 mV bzw. -127 mV) als Thiol-Disulfid-Oxidoreduktasen fungieren und die korrekte Bildung von Disulfiden erleichtern.

2.2. Konjugation und S-Thiolierung/S-Glutathionylierung

Die nucleophilen Eigenschaften des Cysteins in Glutathion (und in Proteinen) werden in Konjugations- und in Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen genutzt. Reversible S-Thiolierung/S-Glutathionylierung wird häufig an Proteinen beobachtet; hier kommt dieser oxidativen Modifikation – wie auch der reversiblen S-Nitrosylierung und der irreversiblen Oxidation – eine wichtige regulatorische Funktion zu.^[16–19] Mechanistisch kann S-Thiolierung über eine Reihe von physiologischen Prozessen erfolgen, darunter Thiol-Disulfid-Austausch (z. B. S-Glutathionylierung einer Thiol-Gruppe eines Cysteinyrests in einem Protein durch langsame Reaktion mit GSSG), Oxidation (z. B. Reaktion einer Proteincysteinyll-Sulfensäure mit GSH) und Reaktionen nitrosylierter Spezies (z. B. Reaktion einer Protein-Cysteinyllgruppe mit S-Nitrosoglutathion (GSNO) unter Bildung eines gemischten Disulfids). Im Ruhezustand liegt der Anteil S-thiolierter Proteine in Zellen bei nur etwa 1 %, doch oxidativer Stress (siehe Abschnitt 3) führt zu signifikanter Zunahme der S-Thiolierung. Beobachtet wurde dies unter anderem an Proteinen in neutrophilen Granulocyten und Monocyten, z. B. bei Carboanhydrase III nur Minuten nach Stimulation des oxidativen Abwehrstoffwechsels dieser Zellen, des „oxidativen Burst“. S-Thiolierung moduliert Enzymaktivitäten,^[16–18] ist reversibel und kann Proteine letztlich vor irreversibler oxidativer Schädigung bewahren.

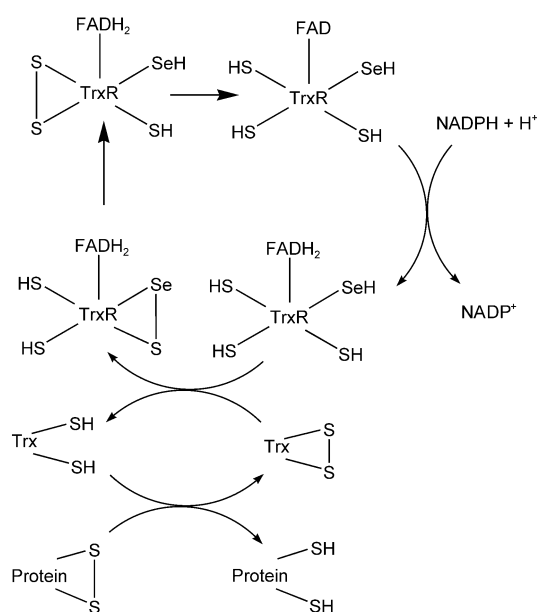
Cystein ist auch an verwandten nucleophilen Substitutionen wie Thioetherbildungen beteiligt, die nicht als Redoxreaktionen betrachtet werden. Solche Reaktionen (auch als S-Konjugationen bezeichnet), z. B. Substitution von Chlorid im Chlorbenzol durch GSH, sind irreversible Prozesse, die die Ausscheidung von toxischen hydrophoben Substanzen wie halogenierten Aromaten beschleunigen, indem sie deren Hydrophilie erhöhen.^[8,21] Die Reaktionen werden durch Glutathion-S-Transferasen (GSTs) katalysiert, die Cysteinreste im aktiven Zentrum enthalten (Reaktion (7) in Schema 1). GSTs katalysieren zwar keine Redoxreaktionen, sind aber redoxempfindlich.^[22–25]

2.3. Zweielektronen-Übertragungen

Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen sind zwar essenziell, indem sie zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts beitragen und Proteine im aktiven reduzierten Zustand halten, verringern aber die Gesamtzahl der Disulfidbindungen in der Zelle nicht. Eine Reduktion von Disulfiden ohne die anschließende Bildung neuer Disulfide wird durch die Enzyme GSSG-Reduktase (Glutathionreduktase, GR), Liponamiddehydrogenase (LipDH) und Thioredoxinreduktase (TrxR) vermittelt. Diese Proteine enthalten Cysteinreste im aktiven Zentrum, die den Thiol-Disulfid-Austausch mit der Elektronenübertragung koppeln, und gewährleisten die kontinuierliche Reduktion von Disulfiden durch NADPH (Reaktion (2) in Schema 1).^[26]

Menschliche Glutathionreduktase regeneriert GSH aus GSSG unter Oxidation von NADPH. Das Enzym ist ein Dimer von 104 kDa, das zwei Redoxsysteme pro Untereinheit enthält: ein Thiol-Disulfid-Austauschsystem in Form zweier Cysteine (Cys58 und Cys63) und ein Flavin als Cofaktor. GSSG wird über Thiol-Disulfid-Austausch zu GSH reduziert, was die Bildung des gemischten Disulfids Cys58-S-SG auslöst und schließlich zum intramolekularen Disulfid Cys58-S-S-Cys63 in GR führt.^[27] Dieses Disulfid wird dann durch direkte Übertragung zweier Elektronen von FADH_2 reduziert ($\text{Cys58-S-S-Cys63} + \text{FADH}_2 \rightarrow \text{Cys58-SH} + \text{Cys63-SH} + \text{FAD}$). FAD wird sodann durch Hydridübertragung von NADPH reduziert ($\text{FAD} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{FADH}_2 + \text{NADP}^+$). Glutathionreduktase koppelt somit den Thiol-Disulfid-Austausch mit der Elektronen- und Hydridübertragung, wobei Cys58 und Cys63 an zwei dieser unterschiedlichen Typen von Redoxreaktion beteiligt sind. Im Hefeenzym bilden Cys50 und FAD einen Charge-Transfer-Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 540 nm.^[28] Die relativ große Differenz zwischen den Redoxpotentialen von $\text{GSSG}/2\text{GSH}$ ($E^\circ = -241$ mV) und $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ($E^\circ = -327$ mV) führt zusammen mit den großen Werten des Verhältnisses $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ in gesunden Zellen zur weitgehenden Reduktion von GSSG und den oben erwähnten hohen GSH/GSSG-Verhältnissen.

Thioredoxinreduktasen sind Bestandteil der zellulären Maschinerie zur Reduktion von Proteindisulfiden, die das Disulfid im aktiven Zentrum von Trx in Gegenwart von NADPH reduzieren. Der Katalysemechanismus ähnelt bis auf einen wesentlichen Unterschied dem der GR-Katalyse: Menschliche TrxR ist ein dimeres Flavoprotein von 100–130 kDa, das pro Untereinheit eine Gly-Cys-SeCys-Gly-Sequenz enthält. Anders als GR, die sich eines (Thiol, Thiol)/Disulfid-Paares (2SH/S-S) bedient, arbeitet TrxR zunächst über ein (Thiol,Selenol)/Selenylsulfid-Redoxpaar (SH,SeH/S-Se) (Schema 2).^[29] Das Selenocystein und das benachbarte Cystein bilden das redoxaktive Zentrum des Enzyms, das das Trx-Disulfid über einen (Thiol,Selenol)-Disulfid-Austausch unter Bildung eines Selenylsulfids reduziert. Dieses wird durch (Thiol,Thiol)-Selenylsulfid-Austausch unter Beteiligung zweier Cysteine eines weiteren Redoxzentrums der anderen Untereinheit des Dimers zum Selenol und Thiol rückreduziert. Wie bei der GR-Katalyse wird das in der Austauschreaktion gebildete Disulfid dann



Schema 2. Reduktion von Proteinindisulfiden durch die Thioredoxin-Thioredoxinreduktase-Redoxkette. Eine Kette von Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen treibt die Reduktion von Disulfiden in Proteinen an. TrxR koppelt den Thiol-Disulfid-Austausch mit dem intramolekularen Elektronen- und Hydridtransfer.^[15]

durch Elektronenübertragung von FADH_2 reduziert. Die genauen Redoxpotentiale aller beteiligten Redoxpaare (z. B. die von $(\text{SH}, \text{SeH})/\text{Se-S}$) wurden bislang nicht bestimmt, allerdings scheint die Reduktion von Trx durch NADPH innerhalb eines relativ schmalen Potentialbereichs von etwa -327 mV ($\text{NADP}^+/\text{NADPH}$) über -283 mV (ungebundenes FAD/FADH_2)^[30] bis -270 mV (Trx, Cys-S-S-Cys/2 Cys-SH) abzulaufen. Der signifikante Unterschied zwischen den Redoxpotentialen des Cysteins (-233 mV) und des Selenocysteins (-488 mV) ist in Abbildung 2 dargestellt. In menschlicher TrxR scheint die Selenylsulfid-Disulfid-Redoxkette eine wichtige Rolle zu spielen; ihre exakte Aufklärung sollte durch Bestimmung der Potentiale sämtlicher Redoxpaare gelingen.

Je nach Substrat kann die Aktivität menschlicher TrxR umgekehrt werden, sodass Mediatoren von oxidativem Stress in Gegenwart von reduziertem Thioredoxin reduziert werden können. Mit Peroxynitrit reagiert TrxR als Peroxynitritreduktase, was unter Einsatz der selenoorganischen Verbindung Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoxaselenazol-3[2H]-on) als Reduktans gezeigt wurde.^[31] Ebselen wurde als „superschnelles“ Trx-Oxidans beschrieben.^[32] Wieder scheint hier Selen eine entscheidende Rolle zu spielen (siehe Abschnitt 6).

Auch wenn die bislang bekannten Trx-Reduktasen aus Säugern den direkten Zweielektronen-Transfer zum Disulfid im aktiven Zentrum vermitteln, sind zwei sequenzielle Einelektronen-Übertragungen theoretisch möglich. Dieser Weg der Reduktion wird in Pflanzen und Bakterien für Ferredoxin-Thioredoxinreduktase (FTR) beobachtet (weitere Eisen-Schwefel-Proteine sind an anderer Stelle ausführlich diskutiert worden^[33]). FTR aus Spinat ist ein heterodimeres 30-kDa-Enzym, das ein redoxaktives Disulfid (Cys54-Cys84)

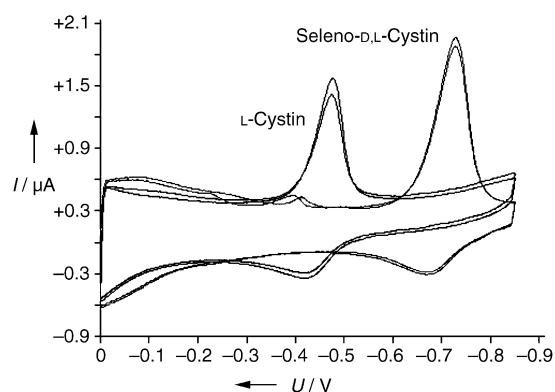


Abbildung 2. Cyclovoltammogramme von Cystin und Selenocystin. Die Voltammogramme von L-Cystin ($100 \mu\text{M}$) und D,L-Selenocystin ($50 \mu\text{M}$) wurden in 200 mM Kaliumphosphatpuffer ($\text{pH } 7.0$) bei 25°C und einer Scangeschwindigkeit von 500 mV s^{-1} mit einer Quecksilber-Arbeits-elektrode, einer Standard-Ag-Referenzelektrode (SSE) und einer Platin-Gegenelektrode aufgenommen. Die deutliche Differenz im Redoxpotential von etwa 250 mV zwischen Selenocystin/Selenocystin (-710 mV gegen SSE, d. h. -488 mV gegen NHE) und Cystin/Cystin (-455 mV gegen SSE, -233 mV gegen NHE) verleiht Selenocystin beträchtlich stärker reduzierende Eigenschaften.

und einen Eisen-Schwefel-Cluster ($[\text{4Fe-4S}]^{2+}$, $S=0$) in seiner katalytischen β -Untereinheit (13 kDa) enthält.^[34] Das Enzym ist insofern einmalig, als es das einzige bekannte Eisen-Schwefel-Protein ist, das eine Disulfidbindung in Gegenwart von reduziertem $[\text{2Fe-2S}]$ -Ferredoxin reduzieren kann (das Ferredoxin ersetzt dabei das NADPH, das Säuger-TrxR als Elektronenquelle dient). Der reduzierte $[\text{2Fe-2S}]^{2+}$ -Cluster des Ferredoxins dient dabei als Einelektronen-Donor, der Cys54-S-S-Cys84 zu Cys54-S $^-$ und einem Thiylradikal (Cys84-S $^\bullet$) reduziert.^[35] Cys54-S $^-$ bildet dann, in einem mechanistisch der Säuger-TrxR analogen Schritt, ein Heterodisulfid mit Trx. Das Thiylradikal wird durch Koordination an ein Eisenzentrum des $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ -Clusters ($S=0$) der FTR inaktiviert und stabilisiert, wodurch intermediär eine Spezies mit einem formal oxidierten $[\text{4Fe-4S}]^{3+}$ -Cluster ($S=1/2$) mit einem fünf-fach koordinierten Eisenzentrum und einem formal reduzierten Liganden Cys84-S $^-$ gebildet wird.^[36] Ein zweites Ferredoxinmolekül überträgt dann unter Bildung von Cys84-S $^-$ und $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$ im aktiven Zentrum ein weiteres Elektron an diese intermediäre Spezies. Durch anschließenden Angriff von Cys84-S $^-$ am gemischten Disulfid aus FTR und Trx wird vollständig reduziertes Trx gebildet und das Disulfid im aktiven Zentrum regeneriert.

Das Reduktionspotential der Einelektronen-Reduktion eines Disulfids ist im Allgemeinen experimentell nicht zugänglich. Anhand der verfügbaren Potentiale der Zweielektronen-Reduktion wird jedoch deutlich, dass der Elektronentransfer vom Ferredoxin ($E^\circ = -350 \text{ mV}$) zum Trx ($E^\circ = -210 \text{ mV}$) über das Disulfid des aktiven Zentrums der FTR ($E^\circ = -230 \text{ mV}$) thermodynamisch begünstigt ist.^[34] Ferredoxin ist, anders als NADH, nur ein Einelektronen-Donor, was die normale Zweielektronen-Reduktion verhindert; deshalb ist die Bildung eines hochreaktiven Thiylradikals als Intermediat erforderlich. FTR verwendet den Eisen-

Schwefel-Cluster ($E^\circ = -650$ mV für $[4\text{Fe-4S}]^{3+/2+}$) zur Stabilisierung dieser ansonsten kurzlebigen radikalischen Spezies. FTR bietet somit eine elegante Lösung für ein beträchtliches mechanistisches Problem (Ein- gegenüber Zweielektronen-Transfer), indem sie die Redox- und Metallbindungseigenschaften des Cysteins zur Ausübung ihrer einzigartigen Funktion miteinander verschmilzt.

Elektronenübertragung auf Disulfide kann, wie am Beispiel der FTR aus Spinat gezeigt wurde, in der Bildung von Thiylradikalen als Intermediaten resultieren. Das führt uns nun zur Rolle schwefelhaltiger Radikale in der Biologie, wobei das Thiylradikal direkt an Elektronen- und an Atomtransferreaktionen beteiligt ist.

2.4. Radikalreaktionen

Mit Radikalbildungs- und Radikalübertragungsmechanismen stehen Enzymen zusätzliche auf Cystein beruhende Redoxreaktionen zur Verfügung, die sich von Austausch- und Elektronenübertragungsreaktionen prinzipiell unterscheiden. Das Redoxpaar Thiol/Thiylradikal kommt in wichtigen Enzymen vor, darunter in der Superfamilie der Ribonucleotidreduktasen (RNRasen), in der Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) und der Benzylsuccinatsynthase (BSS). In diesen Enzymen wird das Thiylradikal durch zwei alternative Mechanismen gebildet: entweder durch „Long-Range“-Einklektronen-Transfer vom Thiol (mit anschließender Abgabe eines Protons, siehe Reaktion (3) in Schema 1) oder „Short-Range“-Wasserstoffatomabstraktion vom Thiol (Reaktion (4), Schema 1).

Long-Range-Einklektronen-Transfer findet sich bei der aeroben Fe-abhängigen Klasse-I-RNRase aus *E. coli*, in der das Thiylradikal durch Elektronentransfer von Cystein auf ein Tyrosylradikal gebildet wird.^[37] Im Unterschied dazu verläuft die Bildung des Thiylradikals in der anaeroben formiatabhängigen Klasse-III-RNRase (ARR) des T4-Bakteriophagen sowie in der anaeroben Pyruvat-Formiat-Lyase (PFL) aus *E. coli* über einen Short-Range-Wasserstofftransfer von Cystein auf ein Glycylradikal.^[38]

Zur Bildung des Glycylradikals in ARR werden mehrere Komponenten benötigt, darunter ein Flavodoxinreduktasesystem, NADPH, *S*-Adenosylmethionin (SAM) und Dithiothreitol (DTT).^[39] Der $[4\text{Fe-4S}]$ -Cluster der ARR reduziert SAM durch Einklektronentransfer zu Methionin und dem 5'-Desoxyadenosylradikal. Es folgt eine Wasserstoffabstraktion vom Glycin durch das Adenosylradikal unter Bildung von 5'-Desoxyadenosin und einem Glycylradikal, das anschließend das Thiylradikal bildet. Auf ähnliche Weise wird PFL durch PFL-Aktivase (die ebenfalls ein Eisen-Schwefel-Zentrum enthält) katalytisch unter Verwendung von SAM aktiviert, wobei ein Glycylradikal (Gly 734 in PFL aus *E. coli*), Methionin und 5'-Desoxyadenosin gebildet werden. Ein nucleophiles Thiylradikal an Cys418 in diesem Enzym wird dann durch eine Wasserstoffabstraktion von Cys419 durch das Glycylradikal gebildet.

Die Thiylradikale sind hochreaktiv (d. h. stark oxidierend) und werden durch Wasserstoffabstraktion in einer für Thiylradikale typischen Reaktion zu Thiolen reduziert. In RNR-

asen wird das Wasserstoffatom entweder von externen Dithiolen oder (im Falle der ARR) von Formiat abstrahiert, die nachfolgend zu Disulfiden bzw. CO_2 oxidiert werden. In PFL aus *E. coli* greift das Cys418-Radikal den Carbonylkohlenstoff des Substrats Pyruvat an und bildet ein instabiles kovalentes *S*-Acetyl-PFL-Radikal, das schnell fragmentiert und den (nichtradikalischen) Cys418-Acylthioester sowie ein Formiatradikal bildet, das dann ein Wasserstoffatom von Cys419 abstrahiert. Das Cys419-Radikal wiederum abstrahiert ein Wasserstoffatom von Gly 734 und bildet so wieder das Glycylradikal. Die *S*-Acetyl-PFL-Form reagiert mit Coenzym A unter Freisetzung von Acetyl-CoA und Rückbildung des Enzyms. Insgesamt werden in dieser Reaktion Acetyl-CoA und Formiat aus CoA und Pyruvat gebildet – allesamt nichtradikalische Spezies.^[40] Eine Glycyl-Thiyl-Radikalkette findet sich auch in Benzylsuccinatsynthase (BSS) aus *Thauera aromatica*, die den Initialschritt im Abbau von Toluol zu Benzylsuccinat katalysiert. Die BSS enthält ein Glycylradikal im aktiven Zentrum an Gly825. Wasserstoffabstraktion von der Methylgruppe des Toluols resultiert in der Bildung eines Benzylradikals, das sich an die Doppelbindung von Fumarat anlagert, um so ein intermediäres Benzylsuccinylradikal zu bilden, das sodann durch Wasserstoffabstraktion vom Cys489-Thiolat zu Benzylsuccinat reduziert wird. Cys489 wiederum abstrahiert das Wasserstoffatom von Gly825, sodass das anfängliche Glycylradikal zurückgebildet wird.^[41]

Der Wasserstoffatomtransfer ist ein Beispiel für „Atomübertragungsreaktionen“ des Cysteins in vivo. Während Wasserstoffatomtransfer eine radikalische Reaktion ist, verlaufen andere Atomübertragungen, an denen Cystein beteiligt ist (etwa Hydridtransfer), über nichtradikalische Mechanismen. Diese Transferreaktionen sind oft Teil des gleichen katalytischen Zyklus und werden deshalb gemeinsam besprochen.

2.5. Atomübertragungsreaktionen

Antioxidative Enzyme wie Glutathionreduktase und Thioredoxinreduktase werden häufig auf zusätzliche katalytische Aktivitäten hin untersucht. Die Peroxynitritreduktaseaktivität der TrxR beispielsweise ist bereits erwähnt worden. Peroxidation von Thiolen führt häufig zu einer Verbindungsklasse mit charakteristischer Oxidationsstufe des Schwefels und chemischen Eigenschaften, die sich von denen des Disulfidzustandes drastisch unterscheiden: den Sulfensäuren (Abbildung 1). Eine solche Modifikation des Cysteins ist jedoch nur in Abwesenheit weiterer Thiolgruppen stabil (diese würden mit der Sulfensäure unter Bildung des Disulfids und Wassers reagieren). In menschlicher GR resultiert die Oxidation mit H_2O_2 beispielsweise in der Bildung des Disulfids Cys58-S-S-Cys63; dieses Enzym hat nur sehr niedrige Peroxidaseaktivität.^[42]

Im Unterschied dazu greifen Redoxenzyme wie NADH-Peroxidase (Npx), NADH-Oxidase (Nox) und Peroxiredoxine (Prx)^[43] auf ein Cystein/Cysteinsulfensäure-Redoxpaar (Cys-SH/Cys-SOH) zurück, das eine effektive Katalyse der Peroxidation ermöglicht. Diese Enzyme enthalten einen

katalytischen Cysteinrest, der zu Cysteinsulfensäure oxidiert wird, einer hochreaktiven (d.h. stark oxidierenden) Cystein-spezies, deren Reduktion über zwei unterschiedliche Mechanismen verlaufen kann, die beide in vivo gefunden werden: entweder über eine Austauschreaktion unter Beteiligung von zwei Thioläquivalenten oder über Hydridtransfer (Reaktion (5) in Schema 1).

Npx aus *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* ist ein Tetramer mit 46 kDa je Untereinheit und gehört zur Familie der Pyridinnucleotiddisulfid-Oxidoreduktasen. Im Unterschied zu anderen Cystein-Oxidoreduktasen (z.B. GR) enthält Npx nur ein Cystein im aktiven Zentrum jeder Untereinheit, das die Reduktion von H_2O_2 in Gegenwart von NADH katalysiert. Das reduzierte Thiolat greift H_2O_2 als Nucleophil an und bildet Cys42-SOH und Wasser. Es folgt Hydridtransfer von NADH auf Cys42-SOH über FAD. Strukturdaten zufolge befindet sich das Flavin im Enzym zwischen reduzierendem NADH und dem Redoxzentrum Cys42-SH/Cys42-SOH, um die Hydridübertragung zu optimieren.

Der Redoxmechanismus wird durch Mutageneseexperimente bestätigt, durch die getestet wurde, ob und wie viele Cysteinreste für die Peroxidaseaktivität erforderlich sind. Mutagenese von Cys42 zu Serin oder Alanin hat niedrige Umsatzraten zur Folge, was die Bedeutung dieses Redoxzentrums unterstreicht.^[44,45] Einführen eines weiteren Cysteins ins aktive Zentrum (Cys40) unterbindet jedoch fast vollständig jegliche katalytische Aktivität (k_{kat} der Mutante liegt bei etwa 0.1 % des Wertes von Wildtyp-Npx^[42]). Die Resultate illustrieren sowohl die Bedeutung des Sulfensäure-Zustandes in Peroxidasen als auch die Notwendigkeit, Disulfidbildung in diesen Enzymen zu vermeiden, da die Bildung des Cys40-S-S-Cys42-Disulfids die Aktivität herabsetzt.

Ein theoretisch möglicher Hydridtransfer auf Disulfide (z.B. von NADH oder FADH_2) scheint in Proteinen bisher nicht beobachtet worden zu sein (Reaktion (9) in Schema 1); Gleiches gilt für Elektronentransfer auf Sulfensäuren.

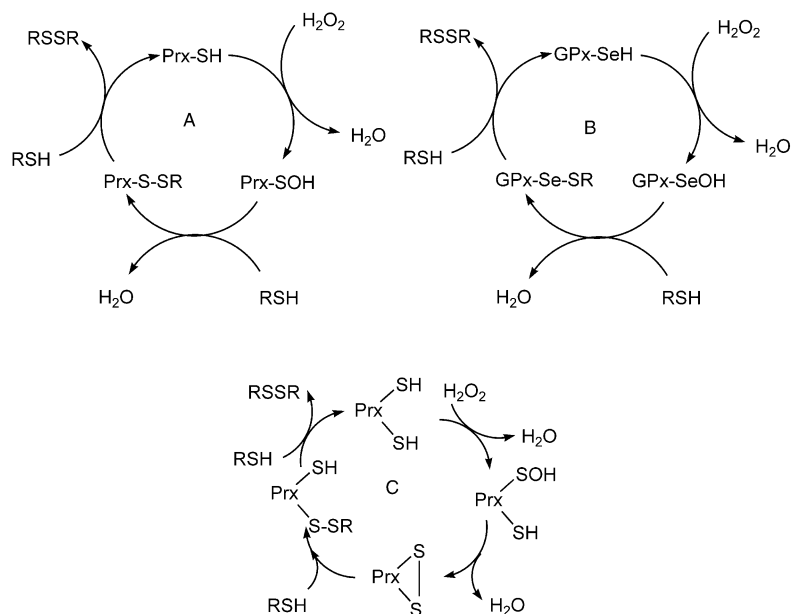
Der Redoxmechanismus von Nox aus *Streptococcus (Enterococcus) faecalis* ist dem von Npx nahe verwandt (die Aminosäuresequenzen von Nox und Npx sind zu 44 % identisch, und das Cys-SH/Cys-SOH-Redoxpaar ist in beiden Enzymen konserviert). Nox katalysiert die Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser unter Verbrauch von vier Elektronen (äquivalent zu zwei NADH). Es ist ein dimeres Enzym (50 kDa je Untereinheit), und jede Untereinheit enthält ein Cystein(Cys42)- und ein FAD-Redoxzentrum. O_2 wird zunächst durch Reaktion mit FADH_2 und Bildung des Peroxyflavins (FADH_2O_2) aktiviert. Dieses reagiert mit dem Cys42-Thiolat^[46] in einer Reaktion, die dem Peroxidationsschritt im Npx-Zyklus ähnelt, und bildet Cys42-SOH und FADHOH . FADHOH eliminiert sodann Wasser und bildet FAD, das durch ein Äquivalent NADH zu FADH_2 reduziert wird. Cys42-SOH wird schließlich durch Hydridtransfer von FADH_2 zum Thiol rückreduziert. Das in dieser Reaktion gebildete FAD wird durch ein weiteres Äquivalent NADH zu FADH_2 reduziert; auf diese Weise werden das reduzierte Thiol und FADH_2 für den nächsten Katalysezyklus regeneriert.

Wie im Falle der Npx wird dieser Redoxmechanismus durch Mutageneseexperimente gestützt. Ersetzen von Cys42 durch Serin (d.h. Entfernen eines der beiden Redoxzentren) resultiert in einem Enzym, das O_2 unter Verbrauch eines NADH-Äquivalents zu H_2O_2 reduziert. Während somit das Flavinzentrum seine Funktion behält, unterbindet das Fehlen des Schwefel-Redoxzentrums die Reduktion von H_2O_2 zu Wasser.^[46]

Der auf Schwefel basierende Redoxmechanismus der Nox wird noch interessanter, wenn die Gesamtreaktion aus anderer Perspektive betrachtet wird: Nox katalysiert die Reduktion von Sauerstoff durch NADH, eine Reaktion, die den Vorgängen in der menschlichen mitochondrialen Atmungskette nicht unähnlich ist. Während für die Sauerstoffreduktion bei der Atmung metallhaltige Redoxzentren in Proteinen, z.B. Eisen-Schwefel-Proteinen, dem Rieske-Zentrum, Cytochrom *c* und Cytochrom-*c*-Oxidase, maßgeblich sind, erfüllt Nox eine chemisch verwandte Funktion ausschließlich unter Verwendung nichtmetallischer Redoxsysteme.

Die Katalysezyklen von Npx und Nox sind zwar verwandt, jedoch sind die Sulfensäuren in menschlichen Peroxiredoxin-Enzymen an einem unterschiedlichen Redoxmechanismus beteiligt, der demjenigen im gut untersuchten Selenoenzym Glutathionperoxidase (GPx, siehe Abschnitt 6) gleicht. Wie GPx katalysieren Prx die Reduktion von H_2O_2 und Alkylhydroperoxiden zu Wasser bzw. Alkoholen und oxidieren dabei Thiole zu Disulfiden. Das Cystein (Cys47) im aktiven Zentrum des menschlichen 1-Cys-Peroxiredoxins (hORF6) reagiert mit dem Peroxid in einer Substitutionsreaktion, die der von Npx und Nox ähnelt, bei der das Thiol(at) eine S-O-Bindung eingeht und ein Hydroxid freigesetzt wird. Ganz anders als mit Npx und Nox wird jedoch Cys47-SOH nicht durch Hydridtransfer reduziert (Prx ist kein Flavoprotein), sondern reagiert mit zwei Thioläquivalenten, wobei die reduzierte Form von Cys47 regeneriert und ein Disulfid erzeugt wird (Schema 3). Die Reduktion der Sulfensäure verläuft somit über Austauschreaktionen unter Substitution einer OH- durch eine RS-Gruppe mit anschließender Bildung eines gemischten Disulfids.

Obgleich die Gegenwart zweier Cysteinreste in enger Nachbarschaft wie erwähnt die Bildung einer stabilen Sulfensäure verhindert, nutzen 2-Cys-Peroxiredoxine einen Redoxmechanismus, der die Disulfidbildung aus einer Sulfensäure und einem Thiol umfasst (Schema 3).^[47] Das gebildete Disulfid wird dann durch einen Thiol-Disulfid-Austausch reduziert. Dieses Disulfid ist in der Kristallstruktur des Häm-bindenden Proteins (HBP-23), eines 2-Cys-Peroxiredoxins, als Disulfidbindung zwischen Cys52 einer Untereinheit und Cys173 einer zweiten Untereinheit sichtbar.^[48] Die genaue Oxidationsstufe des Cysteins im aktiven Zentrum konnte bisher nicht eindeutig zugeordnet werden. Die Kristallstruktur des dekameren Peroxiredoxins TPx-B aus menschlichen Erythrocyten ist kürzlich mit einer Auflösung von 1.7 Å bestimmt worden. Interessanterweise zeigt sich hier, dass Cys51 im aktiven Zentrum als Cysteinsulfensäure (Cys-SO₂H) vorliegt, die in der Tasche des aktiven Zentrums verborgen ist.^[49] Das Vorliegen einer Sulfin- statt einer Sulfensäure in diesem Enzym und die richtige Einschätzung



Schema 3. Katalytische Zyklen von 1-Cys- und 2-Cys-Peroxiredoxinen und Glutathionperoxidase. Trotz Beteiligung unterschiedlicher Chalkogene haben 1-Cys-Prx (A) und GPx (B) vergleichbare Redoxzyklen.^[43,111] Oxidation des Thiois (Selenols) durch H_2O_2 erzeugt hochreaktive Sulfensäuren (Selenensäuren). Die Reduktion verläuft über Austauschreaktionen unter Verbrauch zweier Thioläquivalente (z. B. GSH, Dithiothreitol). Im Redoxzyklus von 2-Cys-Prx erfolgt Kondensation von Cys-SOH und Cys-SH unter Bildung eines intramolekularen Disulfids oder, wie im Falle der weiter verbreiteten oligomeren Prx, einer Disulfidbrücke zwischen verschiedenen Untereinheiten (C).^[47] In vivo sind die Thiole und Selenole im Gleichgewicht mit den jeweiligen Thiolaten und Selenolaten.

dieses Befundes werden allerdings kontrovers diskutiert. Anders als Sulfensäuren können Sulfinsäuren durch GSH oder andere Thiole nicht einfach reduziert werden, und infolgedessen könnte es sein, dass das Vorliegen eines zweiten Cysteins in direkter Nachbarschaft nicht zwangsläufig eine Disulfidbildung nach sich zieht.^[25]

Das wachsende Interesse an redoxaktivem Cystein bedeutet jedoch nicht, dass die Redoxchemie des Schwefels auf Reaktionen der Thiolgruppe beschränkt wäre. Auch seltener untersuchte oxidierte Schwefelspezies in Proteinen (z. B. Disulfid-S-oxide, Methionin-S-oxide, Persulfide) finden in jüngster Zeit Interesse. Im nächsten Abschnitt werden einige dieser biochemisch „exotischen“ und in einigen Fällen spekulativen Spezies diskutiert.

3. Disulfid-S-oxide, S-Sulfate, Sulfoxide und Sulfone in Proteinen

Die Eigenschaft des Schwefels, in vielen unterschiedlichen Oxidationsstufen vorzuliegen und Schwefel-Sauerstoff-, Schwefel-Schwefel- und Schwefel-Selen-Bindungen einzugehen, hat zur Folge, dass auch eine Reihe weniger bekannter Cysteinmodifikationen existiert. Einige dieser Spezies, z. B. das Cystein-S-sulfat (Cys-S-SO_3^-), werden durch Übertragungsreaktionen gebildet, andere entstehen bei oxidativem Stress.

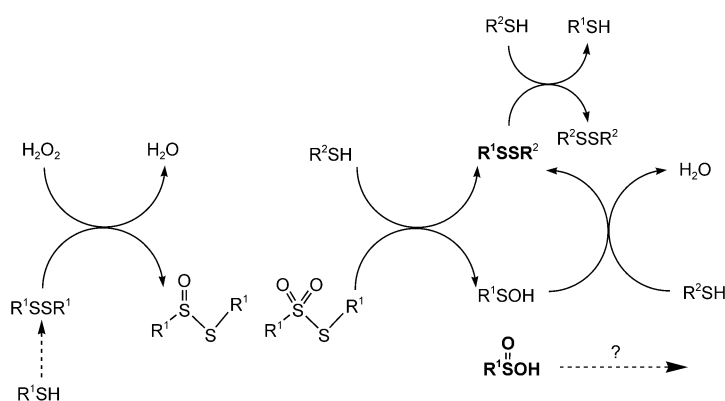
Oxidativer Stress ist definiert als ein biochemischer Zustand,^[50–52] der mit einer Vielzahl menschlicher Erkrankungen – von neurodegenerativen und inflammatorischen wie der Alzheimerschen Erkrankung und rheumatoider Arthritis bis hin zu Diabetes und Krebs – assoziiert ist. Charakteristisch für diesen Zustand ist ein Ungleichgewicht zwischen zellulären oxidierenden und reduzierenden Spezies. Unter diesen pathologischen Bedingungen herrschen in vivo ungewöhnliche oxidierende Bedingungen, die durch die Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies charakterisiert sind, die Biomoleküle oxidativ schädigen können. Mit seinen leicht zugänglichen Oxidationsstufen ist Cystein ein primäres Angriffsziel vieler dieser Oxidantien, und die oxidierenden Zustände unter den Bedingungen des oxidativen Stresses fördern die Bildung von Cystein- und Methionin-Spezies, die in gesunden Zellen in beträchtlich geringeren Mengen vorkommen (Abbildung 1). Es sei gleich zu Beginn betont, dass viele der in diesem Abschnitt diskutierten Modifikationen erst kürzlich in vivo entdeckt wurden und dass ihre Biochemie, sofern von einer solchen gesprochen werden kann, noch nicht endgültig geklärt ist.

3.1. Disulfid-S-oxide

Unter oxidativem Stress sind Disulfide nicht notwendigerweise die Endprodukte der Cysteinoxidation. Oxidation der Disulfide kann zur Bildung hochreaktiver Disulfid-S-monoxide (Thiosulfinate, RS(O)SR) und Disulfid-S-dioxide (Thiosulfonate, $\text{RS(O)}_2\text{SR}$) führen. Disulfide wie Cystamin und GSSG sind leicht zu Disulfid-S-oxiden oxidierbar.^[53,54] Diese „aktivierten“ Disulfide reagieren schnell mit Thiolen in Proteinen und Enzymen und inaktivieren diese. Mit Disulfid-S-oxiden steht ein auf Cystein beruhender Weg zur Verfügung, der auf Redoxkaskaden hinausläuft, an denen Sulfen- und Sulfinsäuren sowie eine Glutathionylierung von Proteinen beteiligt sind. Eine solche über Disulfid-S-oxide verlaufende Redoxkaskade ist in Schema 4 dargestellt. Diese Spezies wurden bisher primär im Zusammenhang mit niedermolekularen „reaktiven Schwefelspezies“ und oxidativem Stress diskutiert, neue Erkenntnisse deuten aber auch auf das Vorkommen von Disulfid-S-oxiden in Proteinen hin.^[53–58] Da diese Cysteinmodifikationen hochreaktiv sind und praktisch keine spezifischen spektroskopischen oder chemischen Eigenschaften haben, gestaltet sich ihr Nachweis in Proteinen schwierig. Künftige Entwicklungen in der Röntgenkristallographie von Proteinen, in der Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie könnten jedoch Einblicke in oxidative Cysteinmodifikationen ermöglichen.

3.2. S-Sulfocystein, Persulfide und Selenopersulfide

Auch S-sulfatierte Cysteine, die S-Sulfocysteine (Cys-S-SO_3^- , Abbildung 1), werden in vivo gefunden und können als Disulfidmodifikation betrachtet werden. Verbindungen wie



Schema 4. Eine Redoxkaskade oxidierter Cysteinspezies. Die Oxidation von Disulfiden (RSSR) zu Disulfid-S-Oxiden mit anschließender schrittweiser Reduktion unter Beteiligung von Proteinthiolen (RSH) unter Bedingungen des oxidativen Stresses in vivo ist postuliert worden.^[55, 83] Fett gedruckte Spezies sind wahrscheinliche Endprodukte dieser Kaskaden. Die Redoxaktivität von Sulfinsäuren in vivo ist Gegenstand laufender Untersuchungen.^[55]

S-Sulfocystein und S-Sulfogluthation (GSSO₃H) entstehen bei der enzymkatalysierten Entgiftung von Sulfid im Menschen. GSSG reagiert dabei zunächst mit Sulfid und bildet GSSO₃H und GSH. Das GSSO₃H wird dann enzymatisch zu Sulfocysteinylglycin und schließlich zu S-Sulfocystein hydrolysiert.^[59] Diese S-sulfatierten Metabolite reagieren leicht mit Proteinen. Das GSSO₃H ist beispielsweise ein kompetitiver Inhibitor von Glutathion-S-Transferase (GST), die an der Detoxifikation von Karzinogenen beteiligt ist; hier könnte somit ein Grund für die karzinogenen Eigenschaften von SO₂ liegen.^[60] Die S-Sulfatierung ganzer Proteine im Menschen im Sinne einer posttranslationalen Modifikation wurde noch nicht beschrieben, während die O-Sulfatierung (d.h. Sulfatübertragung von 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat auf freie Hydroxygruppen wie die von Tyrosylresten in Proteinen) kürzlich als eine mögliche biochemische Alternative zur O-Phosphorylierung in Signal- und regulatorischen Kaskaden für Aufsehen sorgte.^[61, 62]

Während S-Sulfocystein ein einziges hoch oxidiertes Schwefelatom enthält, liegt im S-Sulfanylcystein (Cys-S-SH) ein Persulfid vor. Eine solche Verkettung wird beispielsweise im aktiven Zentrum von Schwefeltransferasen wie der Rhodanese aus Rinderleber gefunden.^[63] Dieses Enzym wurde kürzlich zur In-vitro-Erzeugung eines S-Selanyl-cysteins (Cys-S-SeH) im aktiven Zentrum unter Einsatz von Selenit und GSH genutzt.^[64] Der Beweis für die Relevanz einer solchen Modifikation in vivo steht noch aus. Eine chemisch verwandte Spezies zumindest, das Glutathion-Selenopersulfid (GSSeH), ist integraler Bestandteil des Selenocystein-Metabolismus. Die Existenz eines S-Selanyl-cystein-Restes war auch für die CO-Dehydrogenase des aeroben Bakteriums *Oligotropha carboxidovorans* postuliert worden,^[65] allerdings wurde dieser Vorschlag mittlerweile zurückgezogen.^[66] Die S-Selanylierung und der zugrundeliegende Mechanismus (Reaktion (12) in Schema 1) sind noch strittig; sie böte jedoch eine elegante Methode zum Einbau von Selen in Proteine, die nicht auf die komplizierte Expressionsmaschinerie angewiesen wäre, die zum Einbau von Selenocystein benötigt wird (siehe Abschnitt 6).

3.3. Sulfoxide und Sulfone – biologische Redoxchemie des Methionins

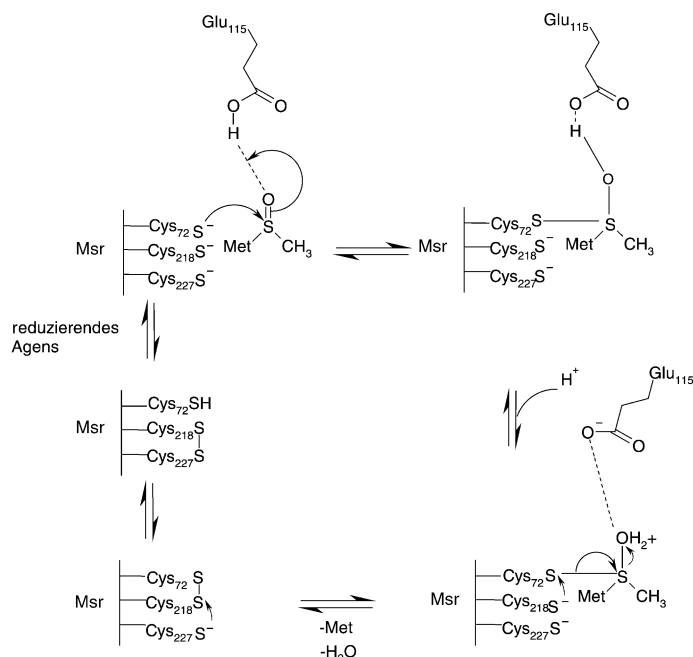
Methionin wird vom Startcodon AUG codiert, das den Leseraster der Proteinbiosynthese festsetzt und deshalb in den meisten Proteinen vorhanden ist. Ähnlich den Disulfiden ist die Dialkylsulfid(Thioether)-Gruppierung (Abbildung 1) von Methionin leicht unter Bildung von Sulfoxiden und Sulfonen oxidierbar. Die Oxidation von Methionin in Proteinen zu Methioninsulfoxid hat biochemische und physiologische Bedeutung.^[67, 68] Methionin hat antioxidative Eigenschaften,^[69, 70] deren Bedeutung in vivo derzeit untersucht wird.

Durch Methioninreste an Proteinoberflächen wird eine hohe Konzentration antioxidativer Reste erzeugt, die andere für die Aktivität des Proteins essenzielle Reste gegen Oxidation schützt. Für ein sphärisches Protein mit nur acht modifizierbaren Methioninresten und einem Durchmesser von 60 Å hieße dies, dass die Methioninkonzentration innerhalb des gegebenen Volumens ungefähr 100 mM betragen würde, entsprechend einer etwa zehnfach höheren Konzentration als der von GSH im Cytosol.^[69] Eine solche protektive Rolle des Methionins wird durch neuere Erkenntnisse gestützt. So können beispielsweise acht der sechzehn Methioninreste der Glutaminsynthetase zum Sulfoxid oxidiert werden, ohne dass die Enzymaktivität signifikant beeinflusst wird,^[71] und Methioninreste im oder nahe dem aktiven Zentrum dieser Enzyme können „Autoxidation“ durch Substrat, Produkte oder Cofaktoren verhindern.

Die Entdeckung des menschlichen Enzyms Methioninsulfoxidreduktase (Msr) hat die Vorstellung von redoxaktivem Methionin in Proteinen und Enzymen untermauert. Während die meisten Sulfoxide nicht spontan mit GSH reagieren, gewährleistet Msr, dass die Sulfoxidbildung in Gegenwart von NADPH reversibel wird.

Auch aus mechanistischer Sicht ist die Reduktion des Sulfoxids interessant (Schema 5). Zwei mögliche Mechanismen der Msr-Aktivität wurden vorgeschlagen, die entweder eine Kette aus Thiol-Disulfid-Austauschschritten oder das intermediäre Auftreten einer Sulfensäure einschließen. Ein katalytischer Mechanismus wurde für die Aktivität von Msr aus Rind (bMsrA) beschrieben, die 88 % Sequenzähnlichkeit zur menschlichen MsrA aufweist.^[72] Cys72 im aktiven Zentrum der bMsrA bildet ein Thiolat-Ion, dessen nucleophiler Angriff am Sulfoxidschwefel von Met(O) zur Bildung eines intermediären tetraedrischen Disulfid-S-Oxids führt. Angriff von Cys218 an Cys72 und nachfolgender Protonentransfer zum Sauerstoffatom des Sulfoxids führt dann zur Abspaltung von Wasser, zu Methionin und zur Bildung einer Disulfidbrücke zwischen Cys72 und Cys218. Der reduzierte Zustand wird sodann durch Thiol-Disulfid-Austausch zwischen Cys227 und Cys218 und anschließende Reduktion durch ein externes Thiol als Substrat wiederhergestellt.^[72]

Ein alternativer Mechanismus wurde für MsrA aus *E. coli* vorgeschlagen. Hier greift Cys51 das Schwefelatom des Sulfoxid-Substrats unter Bildung eines tetraedrischen Intermediats an, das sich unter Bildung von Cys51-Sulfensäure und



Schema 5. Mechanismus der Methioninsulfoxidreduktase. Nucleophiler Angriff von Cystein am oxidierten Schwefel führt zur Bildung eines tetravalenten Intermediats. Protonentransfer und Angriff von Cys 218 an Cys 72 erleichtert die Abspaltung von Wasser und die Umlagerung des Intermediats unter Freisetzung von Methionin. Das aktive Zentrum wird durch Thiol-Disulfid-Austausch mit Trx regeneriert.^[72]

Freisetzung von Methionin umlagert (d.h., formal wird ein Sauerstoffatom von Methioninsulfoxid auf Cystein übertragen). Cys198 greift dann das Schwefelatom der Sulfensäure an Cys51 an, wobei sich eine Disulfidbindung und Wasser bilden. Das aktive Zentrum wird durch Thiol-Disulfid-Austausch vollkommen zurückreduziert, zunächst über einen benachbarten Cysteinrest (Cys206) und dann ein externes Thiol.^[73]

Die biologische Bedeutung des Methioninsulfons (Abbildung 1) ist weniger offensichtlich. Die modifizierte Aminosäure selbst hat Untersuchungen zufolge antiinflammatorische Eigenschaften. Interessanterweise ist diese hoch oxidierte Form des Methionins aktiver als das Sulfoxid, jedoch weniger aktiv als Methionin, sodass keine Korrelation zwischen der Oxidationsstufe des Schwefels und diesem Typ antioxidativer Aktivität besteht.^[70] Ein ähnliches Ergebnis wurde mit Disulfid-S-oxiden erhalten: Auch dort wurde kein direkter Zusammenhang zwischen der Oxidationsstufe des Schwefels und der In-vitro-Reaktivität festgestellt.^[53,55] Wie diese Disulfid-S-oxide könnten auch Methioninsulfoxid und -sulfon eine bedeutende Rolle beim oxidativen Stress spielen, entweder als Antioxidantien oder als „reaktive Schwefel-spezies“.^[53–55]

Außer den Sulfoxid- und Sulfonformen kann Methionin auch eine trivalente Sulfoniumgruppierung bilden (Abbildung 1), die im biologischen „Methylierungs-Agens“ S-Adenosylmethionin (SAM) vorliegt. Das gebildete Sulfonium ist eine weitere Methioninmodifikation, die häufig in vivo vorkommt und eine spezifische Reaktivität hat (die Methylgruppe am Schwefel ist stark elektrophil).

Die Oxidation von Cystein, Cystin und Methionin in Proteinen hat Konsequenzen, die über die der Redoxkatalyse und des antioxidativen Schutzes hinausgehen. So wurde kürzlich vorgeschlagen, dass posttranslationale Cysteinmodifikationen mit Enzymregulation und Signalprozessen verknüpft sein könnten,^[74] und Sulfensäurebildung wurde mit der Redoxregulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie OxyR und AP-1 in Zusammenhang gebracht. Eine Diskussion all dieser redoxkontrollierten Prozesse würde den Rahmen dieses Aufsatzes sprengen.

4. Metallbindungseigenschaften von Cystein, Sulfinsäuren und Sulfoxiden

Die Thiolatgruppe im Cystein ist nicht nur redoxaktiv, sondern bildet auch koordinative Bindungen mit einer Vielzahl von Metallionen wie Eisen, Zink, Cadmium, Quecksilber, Cobalt und Kupfer, nicht aber mit Metallionen der Gruppen 1 oder 2. Zahlreiche Proteine enthalten schwefelkoordiniertes Zink mit strukturbildenden (z.B. Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren), katalytischen (z.B. Alkoholdehydrogenase und Metallolactamasen) und regulatorischen/inhibitorischen Eigenschaften (z.B. Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase).

Eine gemeinsame Betrachtung der beiden Haupteigenschaften der Thiolgruppe (Metallbindung und Redoxaktivität) macht unmittelbar deutlich, wie Reaktionen unter Beteiligung von Cystein zum einen eine Redoxsteuerung der Metallkoordination und zum anderen eine Metallsteuerung der Redoxaktivität des Schwefels in biologischen Systemen ermöglichen.

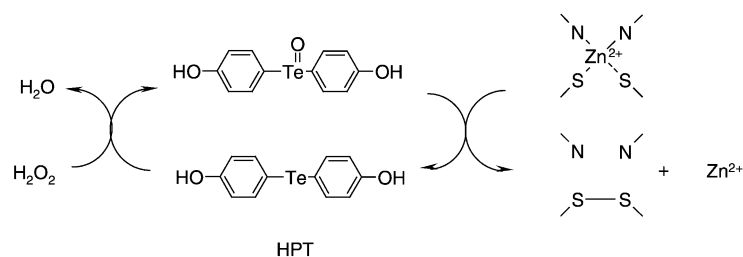
4.1. Redoxsteuerung des Cysteinliganden

Die wechselseitige Abhängigkeit von Metall-Bindung und Redoxaktivität des Cysteins ist am Zink-Schwefel-Protein Metallothionein (MT) intensiv untersucht worden.^[75–78] MT ist ein wichtiges intrazelluläres Zink-bindendes Protein mit Bedeutung für die Regulation von Aufnahme, Verteilung, Speicherung und Freisetzung von Zink. MT von Säugern besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette aus etwa 60 Aminosäuren, darunter 20 Cysteinen. Trotz des Fehlens einer Sekundärstruktur binden diese Cysteinreste insgesamt sieben Zinkionen mit einer ausgesprochen hohen Metallbindungskonstante [$K(\text{Zn}^{2+}) = 3.2 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$ bei pH 7.4]^[79] in zwei Zink-Schwefel-Clustern ($\text{Zn}_4\text{Cys}_{11}$ und Zn_3Cys_9).^[79] MT ist an intermolekularen Metallaustausch- und Metallübertragungsreaktionen beteiligt.^[75,77] Die Metallübertragung von MT auf Proteine wird durch andere metallbindende Agentien wie GSH oder Citrat unterstützt,^[77] aber auch durch Oxidantien, die Zink aus MT freisetzen.^[77,78,80] Oxidation des Thiol(at)-Liganden führt zum Lösen der Metallbindung, was in vivo ein wichtiger Auslöser für Metallfreisetzung und Transfer zu anderen Proteinen sein könnte.^[81]

Ein ähnlicher Mechanismus der Redoxsteuerung existiert für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren mit Zinkfinger-motiv (Motiven aus etwa 30 Aminosäuren, die ein Zinkion

enthalten). Transkriptionsfaktoren binden an DNA und lösen dadurch die ersten Schritte der Genexpression aus. Die DNA-Bindedomänen dieser Transkriptionsfaktoren bestehen häufig aus Zinkfingern. Das Zink wird entweder von zwei Histidinen und einem Cysteinpaar (CCHH), drei Cysteinen und einem Histidin (CCCH) oder vier Cysteinen (CCCC) koordiniert. Das Hauptmerkmal dieser Struktur ist, dass das Cystein in seiner reduzierten Form vorliegen muss, damit Zink koordinieren kann.^[82] Bei Verschieben des Redoxgleichgewichtes unter Oxidation des Cysteinliganden verliert das Zink seine koordinativen Eigenschaften, sodass das Fingermotiv kollabiert und der Transkriptionsfaktor DNA nicht länger binden kann, was zur Modulation der mRNA-Synthese und der Genexpression beiträgt.

Wenngleich die In-vivo-Zusammenhänge dieser Befunde gegenwärtig noch diskutiert werden, stößt die Redoxkontrolle von Transkriptionsfaktoren in Krebszellen auf ein starkes Interesse der Biochemie und könnte sogar als Angriffspunkt für katalytische Redoxwirkstoffe dienen.^[83] Während Zinkfinger motive und MT nur langsam mit oxidativen Stressfaktoren wie Wasserstoffperoxid reagieren, zerstören bereits geringe Mengen schwefelspezifischer Peroxidationskatalysatoren mit GPx-Aktivität (Schema 6) diese



Schema 6. Redoxkontrolle der Metall-Bindung durch Organotellurverbindungen in einem katalytischen Zyklus, der GPx-Aktivität imitiert. Das Tellur in 4,4'-Dihydroxydiphenyltellurid (HPT) wird zunächst durch Wasserstoffperoxid zum Telluroxid oxidiert, das dann durch ein Zinkfingermotiv zum Tellurid rückreduziert wird. Oxidation des Zinkfingers führt zur Freisetzung von Zink durch Disulfidbildung.^[83]

Proteine effektiv und steigern signifikant das Ausmaß der Stressfaktor-induzierten Zellschädigung in neuronaler Zellkultur. Die Redoxkontrolle von Cysteinliganden könnte daher in naher Zukunft die Grundlage zur Entwicklung katalytischer Redoxwirkstoffe bilden.

Der umgekehrte Effekt, d. h. die Kontrolle der Redoxaktivität des Schwefels durch Metallionen, hat ähnlich wichtige biochemische Konsequenzen. Thionein, die metallfreie (Apo-)Form von MT, reagiert weitaus leichter mit oxidierenden Spezies als MT selbst – eine bekannte Tatsache, die kürzlich bekräftigt wurde.^[76] Ein ähnlicher Kontrollmechanismus findet sich in mit Metallen „vergifteten“ Cystein-Enzymen mit inhibitorischen oder regulatorischen Zink-Schwefel-Zentren. Hemmung durch Zink wird bei vielen Enzymen beobachtet, z. B. bei der Fructose-1,6-bisphosphatase aus Säugerleber, der GAPDH und der Enolase aus Muskel, menschlicher Caspase-3, menschlicher T-Zell-Protein-Tyrosinphosphatase und der Aldehyddehydrogenase (ALDH) aus Hefe.^[84] In einigen Fällen tritt die Hemmung

schon bei nanomolaren Zinkkonzentrationen in vitro auf, was die Bedeutung metallregulierter Cysteinreste unterstreicht. Dabei ist erwähnenswert, dass Thionein in der Lage ist, Zink aus inhibitorischen (nicht aber katalytischen) Proteinzentren zu entfernen, was auf die Existenz eines komplexen Feedback-Mechanismus zwischen der Redoxaktivität und der Metall-Bindung des Cysteins hinweist.^[84]

Eine im Folgenden diskutierte überraschende Variante der Redoxkontrolle der Metall-Bindung hängt mit der kürzlichen Entdeckung von Sulfinsäuren als Liganden von Metallionen in Enzymen zusammen.^[43,85,86]

4.2. Sulfinsäuren und Sulfoxide als Liganden

Cysteinsulfinsäure wurde kürzlich in Metalloenzymen wie der bakteriellen Nitrilhydratase (NHase) gefunden; sie ist dort an Metalle, z. B. Eisen, über den Sauerstoff gebunden. Die NHasen katalysieren die Wasseranlagerung an Nitrile unter Bildung der entsprechenden Amide und können entweder ein Low-Spin-nicht-Häm-Fe^{III} oder nicht-corrinoi-des Co^{III} binden. Neuere Daten aus Röntgenkristallstrukturanalysen zeigen, dass eisenhaltige NHase aus *Rhodococcus sp. N-771* eine ungewöhnliche Cys109-Ser-Leu-Cys112-Ser-Cys114-Sequenz in der Metallbindungsdomäne aufweist.^[85] Einem Vorschlag zufolge liegen in der aktiven Form des Enzyms Cys 112 und Cys 114 in Form der entsprechenden Sulfin- (Cys-SO₂H) und Sulfensäuren (Cys-SOH) vor und tragen zur Eisenkoordination bei. Andere Studien bekräftigen, dass die Sulfinsäure sowohl in der aktiven als auch in der inaktiven Form des Enzyms vorliegt, während die Existenz des Sulfensäurerestes an Cys114 in der aktiven NHase noch strittig ist.^[86] Ferner konnte gezeigt werden, dass die Modifikation von Cys114 und Cys112 gemeinsam während der posttranslationalen Modifikation des Enzyms stattfindet.^[87] Oxydierte Cysteinsäuren, die als Liganden dienen können, wurden auch an manchen Transkriptionsfaktoren, z. B. BPV-1-E2-Protein und Aktivatorprotein-1,^[43] und an Cobalt-haltiger NHase aus *Pseudonocardia thermophila JCM 3095* untersucht. Die Kristallstruktur dieser NHase wurde auf 1.8 Å gelöst; Cys111 und Cys113 sind zu Sulfin- bzw. Sulfensäure oxidiert und binden Co^{III}.^[88]

Die Metall-Bindung durch oxidierte Cysteinspezies unterscheidet sich somit stark von der Metall-Bindung durch reduziertes Cystein. Derzeit sind bakterielle NHasen die einzigen Beispiele für Sulfinsäureliganden in Metalloenzymen. Da die Bildung von Sulfen- und Sulfinsäure durchaus auch während der Isolierung und Charakterisierung des jeweiligen Enzyms stattfinden könnte, sind diese Ergebnisse noch strittig. Sollte sich die posttranslationale Modifikation von Cystein zu Sulfen- und Sulfinsäuren in NHase und anderen Proteinen bestätigen, könnte dies ein Mechanismus zur Erzeugung von Metallbindungszentren in Proteinen sein, die bisher meist nicht als solche erkannt wurden. Ein „Redox-Schalter“ für das Umschalten der Metallpräferenz von Zink (Thiol) zu Eisen (Sulfensäure/Sulfinsäure) könnte auch bei oxidativem Stress von Bedeutung sein. In diesem Fall

bestünde die antioxidative Antwort eines Proteins auf Oxidation darin, dass das „antioxidative“ Metall Zink freigesetzt und anschließend „prooxidatives“ Eisen gebunden würde.

Auch für eine redoxabhängige Metall-Bindung an Methionin existieren Hinweise. Reduziertes Methionin ist ein Ligand für toxische Metalle wie Blei, Cadmium und Quecksilber und unterstützt so deren Ausscheidung aus dem Körper.^[89–91] Es findet sich in vielen Proteinen als Metall-Ligand, darunter in Ascorbatoxidase (Kupfer)^[92] und verschiedenen Cytochromen (Eisen).^[93] Als Beispiel für ein oxidiertes Methionin sei die bakterielle Katalase aus *Proteus mirabilis* PR (einem peroxidresistenten 56-kDa-Enzym) erwähnt. Diese enthält eine Häm-Gruppierung, die mit einem Methioninsulfon wechselwirkt, was großen Substraten oder Inhibitoren den Zugang zum eisenhaltigen aktiven Zentrum verwehren könnte.^[94]

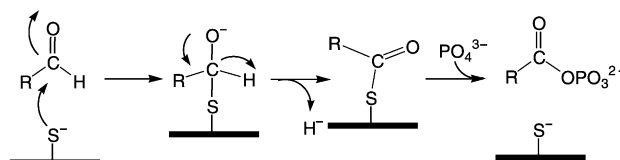
Die Metall-Bindung an Cystein bringt uns zu einer weiteren Gruppe von Redoxenzymen, die nun redox-inaktive Cysteinreste im aktiven Zentrum aufweisen. Der folgende Abschnitt vervollständigt unsere Diskussion cysteinabhängiger Redoxkatalyse mit einer Betrachtung von Dehydrogenasen.

5. Cysteinabhängige Dehydrogenasen und Proteasen

Tabelle 2 fasst die Vielfalt der Mechanismen zusammen, die dem Cystein zur Katalyse der Oxidation und Reduktion von NADPH zur Verfügung stehen. Während GR zwei redoxaktive Cysteine enthält, die NADPH durch Hydridtransfer auf FAD mit anschließender Übertragung zweier Elektronen auf das Disulfid oxidieren, oxidiert Npx NADH durch Hydridtransfer auf eine Sulfensäure über FAD. Im Unterschied dazu enthält die Cystein-Dehydrogenase Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) ein Cystein, das die Hydridübertragung von Aldehyd auf NAD⁺ erleichtert. Die Alkoholdehydrogenase (ADH) aus menschlicher Leber weist ein Zink-Cystein-Zentrum auf, das den reversiblen Hydridtransfer von Ethanol auf NAD⁺ vermittelt, ohne dass Cystein oder Zink ihre Oxidationsstufen ändern.

5.1. Thioetherbildung und Spaltung von C-H- und C-N-Bindungen

GAPDH aus Säugermuskel katalysiert die Oxidation und anschließende Phosphorylierung von Aldehyden zu Acylphosphaten unter Reduktion von NAD⁺ zu NADH. Ihr katalytischer Zyklus umfasst einen essenziellen Hydridübertragungsschritt, der einen aktivierten Aldehyd als Substrat benötigt. Im aktiven Zentrum des Enzyms befindet sich ein Cystein (Cys149), das den Aldehyd angreift und dabei einen „aktivierten“, hochreaktiven intermediären tetavalenten Thioether bildet (Schema 7). Ein Hydrid-Ion wird dann auf



Schema 7. Cystein-katalysierte Dehydrierung. Dehydrogenasen verwenden Cystein zur Bildung eines tetavalenten Thioethers, der einen Hydridtransfer ermöglicht. Ein ähnlicher Mechanismus findet sich in Cysteinproteasen.^[84]

NAD⁺ übertragen, sodass im aktiven Zentrum ein Thioester entsteht. Dieser wird durch nucleophilen Angriff des Phosphats unter Bildung eines Phosphorsäureesters und Regeneration des Cysteins im aktiven Zentrum gespalten. Bemerkenswerterweise agiert Cystein in diesem Redoxzyklus als Nucleophil und nimmt nicht direkt am Redoxmechanismus teil. Es erleichtert lediglich die Hydridabstraktion vom Aldehyd durch Bildung des tetavalenten Thioether-Intermediats. Verwandte Enzyme wie ALDH folgen einem ähnlichen Redoxmechanismus. Diese Enzyme werden durch oxidierende Agentien wie reaktive Schwefelspezies^[55] und Peroxynitrit^[95] sowie durch Zinkionen gehemmt, was die Bedeutung des reduzierten und „metallfreien“ Zustandes des Cysteins im aktiven Zentrum unterstreicht.^[84]

Interessanterweise ist der intermediäre Thioether nicht nur für Dehydrogenasen charakteristisch, sondern findet sich auch in einer weiteren Klasse von funktionell gänzlich unterschiedlichen Enzymen, nämlich den Cysteinproteasen wie Papain, Cathepsin B und menschlichen Caspasen (eine umfassende Übersicht über diese Proteasen findet sich bei

Tabelle 2: Mechanismen der Hydridübertragung unter Beteiligung von Cystein im aktiven Zentrum.

Enzym	aktives Zentrum	Redoxmechanismus	Oxidationsstufen
Glutathiondisulfidreduktase (GR)	Cystein	Zweielektronentransfer von FADH ₂ auf Disulfid, dann Hydridtransfer von NADPH auf FAD ^[27]	–2 (Thiol), –1 (Disulfid)
Thioredoxinreduktase (TrxR)	Cystein, Selenocystein	Selenylsulfid-Thiol-Austausch unter Disulfidbildung, dann weiter wie bei GR ^[29,131]	–2 (Thiol, Selenol), –1 (Disulfid, Selenylsulfid)
NADH-Peroxidase (Npx)	Cystein	Hydridtransfer von NADH auf Cysteinsulfensäure über FAD ^[43]	–2 (Thiol), 0 (Sulfensäure)
Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	Cystein	nucleophiler Angriff des Thiolats an Carbonylfunktion des Aldehyds erleichtert Hydridtransfer von Aldehyd auf NADP ⁺ ^[84]	–2 (Thiolat, Thioether, Thioester)
Alkoholdehydrogenase (ADH)	Zink-Cystein-Komplex	Koordination des Ethanol an Zink erleichtert (reversiblen) Hydridtransfer auf NAD(P) ⁺ ^[99]	–2 (Thiol), +2 (Zink)

Brocklehurst et al.^[96]). Anstelle der Carbonylfunktion eines Aldehyds greift das nucleophile Thiolat des Cysteins der Protease das Carbonyl des Amids im Substrat an. Der tetraedrische Thioether, der dabei gebildet wird, eliminiert dann ein Amin, RNH^- (im Unterschied zu H^- im Falle von GAPDH), was zur Bildung eines intermediären Acyl-Enzym-Thioesters führt, der anschließend unter Freisetzung der Carbonsäure und Regeneration des freien Enzyms hydrolysiert wird.

In Cysteinproteasen ist das Cystein nicht direkt an einem Redoxprozess beteiligt, und Zinkionen sind starke Inhibitoren dieser Enzyme.^[84] Im Unterschied dazu sind zahlreiche andere Proteasen und Dehydrogenasen nur dann aktiv, wenn Zink fest an Cysteine im aktiven Zentrum gebunden ist.

5.2. Zur Rolle der Zink-Schwefel-Koordination bei der Spaltung von C-H- und C-N-Bindungen

ADH aus Säugern ist ein wichtiges dimeres 80-kDa-Enzym, das unter alkalischen Bedingungen die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd katalysiert und dabei NAD^+ zu NADH reduziert (bei niedrigerem pH-Wert katalysiert das Enzym die Oxidation von NADH in Gegenwart von Aldehyd^[97]). Es ist essenziell für die menschliche Alkoholtoleranz, und Hemmer des Enzyms wurden zur Behandlung von Alkoholismus eingesetzt. Jede der beiden Untereinheiten des Enzyms hat eine Bindestelle für NAD^+ und zwei Bindestellen für Zn^{2+} . Nur eines der Zinkionen ist direkt an der Katalyse beteiligt; es wird von Cys46, His67, Cys174 und einem austauschbaren Wassermolekül koordiniert, das über eine Wasserstoffbrücke mit Ser48 verbunden ist. Das andere Zinkion hat als Teil eines ZnCys_4 -Zentrums eine strukturbildende Funktion. Aus der Kristallstruktur der ADH aus menschlicher Leber^[98] wurde deutlich, dass im aktiven ternären Komplex aus Enzym, NAD^+ und Alkohol die Hydroxygruppe des Ethanol durch eine Inner-Sphere-Koordination an Zink bindet, wobei die Seitenketten von Ser48 und Phe93 den Alkohol effektiv in eine Position bringen, die die Hydridübertragung vom Alkohol auf NAD^+ erleichtert.^[99] Während der Hydridübertragung (die zur Oxidation des Ethanol und zur Reduktion von NAD^+ führt) ändern weder die Cysteinliganden noch die Zinkionen im aktiven Zentrum ihre Oxidationsstufen. ADH ist jedoch empfindlich gegen Cysteinoxidation, die zur Freisetzung der Zinkionen und zum Verlust der Enzymaktivität führt.^[53–55,80]

Proteasen können – ebenso wie die Dehydrogenasen – Cystein entweder direkt als katalytischen Rest oder indirekt als Liganden für ein katalytisch aktives Zinkion einsetzen. Matrixmetalloproteasen (MMPs) sind Beispiele für zinkabhängige Endopeptidasen, die sowohl in Pflanzen als auch Invertebraten und Vertebraten vorkommen. Cystein fungiert hier in regulatorischer Weise als Ligand des katalytisch aktiven Zinkions. In der aktiven Form des Enzyms ist das Zink an drei hochkonservierte Histidinreste koordiniert, dazu existiert eine freie Koordinationsstelle für das Substratpeptid. Im inaktiven Propeptid jedoch ist diese vierte Koordinationsstelle von einem hochkonservierten Cysteinrest belegt, der sich in einem Abschnitt befindet, der das aktive Zentrum

verdeckt und durch proteolytische Aktivierung des Enzyms abgespalten wird.^[100]

Auch die Inhibitoren der MMPs, die „tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMPs) – Peptide von etwa 20 kDa –, enthalten zahlreiche konservierte Cysteinreste (zwölf im Falle von TIMP-1 und TIMP-2). Sie sind nicht nur für die strukturelle Integrität essenziell, sondern auch direkt an der Hemmung der MMPs beteiligt. Laut Kristallstruktur des Komplexes aus menschlichem Stromelysin-1 (MMP-3) und menschlichem TIMP-1 befindet sich ein solcher Cysteinrest nahe dem aktiven Zentrum von MMP-3.^[101]

6. Vom Schwefel zum Selen – Ähnlichkeiten und Unterschiede

Die Bedeutung des Selen in der Biologie erfährt derzeit ein beträchtliches Interesse, wie mehrere Übersichten belegen.^[4,102–105] Es ist hier nicht beabsichtigt, eine umfassende Übersicht über die Rolle des Selen in der Biologie zu geben, sondern vielmehr einen Blick auf die Redoxchemie der selenhaltigen Aminosäuren zu werfen sowie auf ihre Redoxmechanismen, Oxidationsstufen und Metallbindungseigenschaften in Proteinen im Vergleich zu Cystein und Methionin.

6.1. Natürliches Vorkommen von Selen in Proteinen

Das Element Selen befindet sich im Periodensystem unterhalb des Schwefels, sodass große Ähnlichkeiten zwischen diesen Elementen (aber auch klare Unterschiede) in ihrer Chemie und Biochemie bestehen. Selen kommt in der Erdkruste etwa um vier Größenordnungen seltener vor als Schwefel, was sich auch im Vorkommen in biologischen Systemen widerspiegelt. Während Schwefel im menschlichen Körper in ähnlichen Mengen wie Kalium vorkommt (140 g im Erwachsenen), ist Selen ein Spurenelement, von dem einige Milligramm vorhanden sind – vornehmlich als Selenocystein, Selenomethionin und, in weit geringerem Maße, in Form der metabolischen Vorstufen (z.B. GS-Se-SG, GSSeH, Selenophosphat). Selenhaltige Proteine in Säugern können in drei Gruppen unterteilt werden: 1) spezifisch Selenocystein enthaltende Proteine; 2) Proteine, die unspezifisch eingebautes Selenomethionin enthalten; 3) spezifisch Selen bindende Proteine. Unter den Selenoproteinen mit bekannten Funktionen befinden sich mehrere Glutathionperoxidasen, zwei Deiodinasen, mehrere Thioredoxinreduktasen und Selenophosphatsynthetase 2. Eine der biologischen Funktionen von Selenoprotein P, seine wichtige Rolle in der Verteilung von Selen auf spezifische Gewebe, wurde kürzlich an Knockout-Mäusen bestätigt.^[106,107] Selenoprotein W, ein 15-kDa-Protein, ein 18-kDa-Protein und einige weitere in silico anhand von Nucleotidsequenzen identifizierte Selenoproteine enthalten Selenocystein, aber ihre Funktion ist noch nicht vollständig bekannt. Eine Übersicht über den derzeitigen Kenntnisstand findet sich in Lit.[4]. Der Einbau von Selenocystein in diese Proteine bedarf einer ausgeklügelten Translationsmaschinerie.^[108] Selenomethionin wird dagegen zufällig anstelle von Methionin in Proteine eingebaut.

6.2. Selenocystein und Selenomethionin: Oxidationsstufen, Redoxkatalyse und antioxidative Aktivität

Ein wichtiger Unterschied zwischen Selenocystein- und Cysteinresten ist der sehr viel niedrigere pK_s -Wert der Selenolgruppe des Selenocysteins ($pK_s = 5.2$) gegenüber der Thiolgruppe des Cysteins ($pK_s = 8.3$).^[109] Infolgedessen liegen Selenole in selenocysteinhaltigen Proteinen bei physiologischem pH-Wert überwiegend als Selenolate vor, während Thiole in cysteinhaltigen Proteinen normalerweise als undissoziierte Thiole vorkommen. Natürlich gibt es wichtige Ausnahmen wie etwa NADH-Oxidase und die menschliche Thioltransferase. Der Dissoziationsgrad einer Mutante der Phospholipidhydroperoxid-GPx, mit Cystein statt Selenocystein im aktiven Zentrum, ähnelt dem der Wildtypform.^[110] Des Weiteren tritt Selenocystein hauptsächlich in den reaktiven Oxidationsstufen des Selenols und der Selenensäure auf (Schema 3), und reaktive Diselenide sind im Unterschied zu den Disulfiden noch nicht in Proteinen nachgewiesen worden. Der Redoxzyklus der GPx dient als Beispiel für den Redoxmechanismus dieser Peroxidasen: Selenocystein wird durch Übertragung eines Sauerstoffatoms oxidiert, gefolgt von der Reduktion der Selenensäure durch eine Austauschreaktion auf Kosten zweier GSH-Äquivalente.^[111]

Diselenide kommen in Proteinen anscheinend nicht vor, Selenylsulfide dagegen sind in GPx und menschlicher TrxR enthalten. Das Redoxverhalten des Selenocysteins in diesen Proteinen ist aus mechanistischer Sicht recht interessant. Die Reduktion von Disulfiden kann über Austausch- und Elektronenübertragungsreaktionen verlaufen (siehe Abschnitt 2). Prinzipiell wäre somit vorstellbar, dass das Selenylsulfid in der menschlichen TrxR durch Elektronentransfer von $FADH_2$ reduziert wird (das in menschlicher TrxR gebildete Disulfid wird im Anschluss durch Zweielektronen-Übertragung reduziert). Tatsächlich aber wird in menschlicher TrxR kein Elektronentransfer zum Selenylsulfid beobachtet; vielmehr verläuft die Reduktion über einen aufwändigeren Mechanismus (Schema 2): Das Selenylsulfid wird zunächst in einer Austauschreaktion durch Cystein und das resultierende Disulfid durch Elektronentransfer reduziert. Für Cystein übliche Redoxmechanismen wie Elektronentransfer, Hydridübertragung und radikalische Reaktionen sind für das Selenocystein in Proteinen bisher nicht beobachtet worden.

Dass Selenol, Selenylsulfid und Selenensäure in Selenoproteinen vorkommen, heißt nicht, dass andere Oxidationsstufen des Selen in vivo prinzipiell nicht vorliegen können. Das Redoxpotential von Selenocystein/Selenocystin liegt bei -488 mV (Abbildung 2), was darauf hindeutet, dass Diselenidbildung unter physiologischen Redoxbedingungen durchaus möglich wäre. Allerdings finden sich in wenigen Proteinen zwei Selenocysteinreste in einer für die Diselenidbildung hinreichenden Nähe zueinander (eine der möglichen Ausnahmen ist Selenoprotein P, das bis zu zehn Selenocysteinreste enthält). Im Selenmetabolismus taucht eine Reihe weiterer Oxidationsstufen des Selen auf: Selenit (SeO_3^{2-}) wird schrittweise durch GSH zu H_2Se reduziert und bildet letztlich Selenophosphat. An diesem Prozess sind unterschiedliche Selenverbindungen mit Se-Oxidationsstufen zwischen $+4$ und -2 beteiligt. Während der Ausscheidung von

überschüssigem H_2Se entsteht auch eine trivalente Selenoniumverbindung, nämlich Trimethylselenonium, das mit dem Urin ausgeschieden wird. Obgleich über eine Funktion in Protein-Mechanismen nichts bekannt ist, könnten auch Spezies wie Seleninsäuren, die in Gegenwart von Zinkthiolat-Zentren Redoxaktivität entfalten, unter physiologischen Bedingungen existieren.^[78]

Während Selenocystein spezifisch in Proteine eingebaut wird,^[112,113] kommt Selenomethionin in Proteinen je nach Selenomethioninzufuhr offenbar zufällig anstelle von Methionin vor. Wie Methionin ist auch Selenomethionin leicht zum entsprechenden Selenoxid oxidierbar.^[114] Anders als Methioninsulfoxid jedoch, das zur Reduktion eine Sulfioxidreduktase benötigt (siehe Abschnitt 3.3), wird das Selenomethionin-Selenoxid nichtenzymatisch durch zwei Äquivalente GSH reduziert.^[115] Selenomethionin könnte demnach als eine Barriere gegen permanente oxidative Schädigung in Proteinen dienen, denn die Hinführung einer oxidativen Belastung an eine Position, an der der Schaden repariert werden kann, ist gegenüber Stellen mit nichtreparierbarer Schädigung, die proteolytischen Abbau erfordern, von Vorteil. Ob eine solche Strategie in vivo in nennenswertem Umfang realisiert ist, wird noch diskutiert.^[116]

Diese Eigenschaft des Selenoxids wird auch in effektiven synthetischen Antioxidantien wie Ebselen genutzt, die die Glutathionperoxidaseaktivität nachahmen.^[117] Während Selenole häufig zu „Sackgassen“-Diseleniden oxidiert werden, können Dialkyl-, Diaryl- und Alkylarylselenide keine Diselenide bilden. Sie gehören zu den besten Redoxkatalysatoren mit Peroxidaseaktivität und werden in ihrer Aktivität lediglich von Diaryltelluriden übertroffen.^[83,118–120] Eine Übersicht über das schnell wachsende Gebiet selenorganischer Verbindungen mit katalytischer Aktivität als Mimetika von Selenoproteinen findet sich in Lit. [121].

Eine weitere Familie von selenocysteinhaltigen Proteinen sind die Deiodinasen, die am Thyroxinmetabolismus beteiligt sind (Übersicht in Lit. [122]). Dabei spielt in vivo vermutlich eine ungewöhnliche nucleophile Substitution am Iodatom eines Aryliodids eine Rolle (Reaktion (13) in Schema 1).^[123] Das Selenolat des Selenocysteins im aktiven Zentrum ($SeCys-Se^-$) greift als Nucleophil ein Iodatom am 3,3',5,5'-Tetraiod-L-thyronin (d.h. am Prohormon L-Thyroxin) an. Dabei wird ein oxidiertes Selenenylodid-Intermediat ($SeCys-Se-I$) gebildet und das reduzierte aromatische Hormon 3,3',5-Triiod-L-thyronin protoniert und freigesetzt. Die reduzierte Form des Selenocysteins wird durch Reduktion mit Dithiolen wiederhergestellt, die wiederum zu Disulfiden oxidiert werden. Interessant ist ein Vergleich mit von Glutathiontransferasen katalysierten S-Konjugationen: Während in den Deiodinasen Selenocystein ein Halogenatom angreift und der (reduzierte) aromatische Ring die Abgangsgruppe ist, greift das Cystein in GSTs den Ring an, und das reduzierte Halogenid wirkt als Abgangsgruppe.

6.3. Selen und Metall-Bindung

Bindungen zu Metallen einzugehen, ist eine gängige Eigenschaft von Cysteinresten, und so könnte auch eine

Anzahl von Metall-Selen-Zentren in Proteinen erwartet werden. Überraschenderweise ist dies nicht der Fall: Nur in einigen wenigen Selenoproteinen wurden Beispiele für Selenocystein-Metall-Komplexe beobachtet, in denen das Selenocystein zudem unerwarteterweise eher harte und mittlere als weiche Schwermetallionen koordiniert. Eine Selen-Molybdän-Bindung wurde in der Formiatdehydrogenase aus *E. coli*^[124] und eine Selen-Wolfram-Bindung in der Formiatdehydrogenase aus *Desulfovibrio gigas* identifiziert.^[125] Selenocystein ist für die Formiatdehydrogenaseaktivität zwar essenziell, die Rolle des Selen in diesen Proteinen ist aber unklar. Der Genus *Desulfovibrio* enthält in Form eines Selen-Nickel-Zentrums in Nickel-(Eisen-Schwefel)-Selen-Hydrogenasen ebenfalls ein Metall mittlerer Polarisierbarkeit, das an Selen koordiniert.^[126] Mithilfe gentechnischer Untersuchungen an Azurin, das statt eines Cysteins einen Selenocysteinliganden für Kupfer enthält, konnte nachgewiesen werden, dass Selen in Proteinen durchaus an weiche Metallzentren binden kann.^[127] Der Nachweis einer solchen Selen-Kupfer-Bindung in vivo steht allerdings noch aus. Eine Bindung von Metallen an Selenensäuren oder Selenomethionin ist zwar chemisch möglich, in Proteinen aber noch nicht beobachtet worden.

Die Daten zur Metall-Bindung durch Selenocystein verdeutlichen die Diskrepanz zwischen chemisch Möglichem und biochemisch Realisiertem. Selenverbindungen in „ungewöhnlichen“ Oxidationsstufen und Metall-Selen-Wechselwirkungen werden Gegenstand künftiger Untersuchungen sein.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Wir haben hier die komplexe Biochemie von Cystein, Methionin, Selenocystein und Selenomethionin skizziert und biologische Beispiele unter dem Aspekt der Redoxchemie vorgestellt. Cystein wird bei der Proteinbiosynthese als eine der 21 proteinogenen Aminosäuren in Säugern eingebaut (mit Selenocystein als der 21. Aminosäure).^[108,128] Eine Reihe posttranslatieller Modifikationen bewirkt, dass diese eine Aminosäure in Form von etwa zehn unterschiedlichen Spezies mit jeweils einzigartigen chemischen und biochemischen Eigenschaften vorkommt. Cystein ist somit ein äußerst vielfältiger Aminosäurebaustein in Proteinen.

Während redoxaktive Metallionen in der Biologie Elektronen, NAD(P)H Hydridionen und Oxoanionen Sauerstoff übertragen, FAD Hydrid- oder Elektronenüberträger ist und Tyrosin Radikale bildet, ist Cystein an allen diesen und noch weiteren Redoxreaktionen beteiligt, z.B. am Long-Range-Elektronen- und Short-Range-Wasserstofftransfer sowie an Thiol-Disulfid-Austauschreaktionen. Es existiert in der Biologie vermutlich keine andere chemische Verbindung, die in derart vielen unterschiedlichen Oxidationsstufen vorkommt, derart viele posttranslationale Proteinseitenketten-Modifikationen und gleichermaßen viele Redoxreaktionswege ermöglicht, eine solche Vielzahl spezifischer Metallbindezentren erzeugt und so mannigfaltige biologische Funktionen ausübt wie das „Redox-Chamäleon“ Schwefel in der Aminosäure Cystein.

Auch die biologische Redoxchemie des Methionins gewinnt an Bedeutung, seit unterschiedliche Oxidationsstu-

fen des Schwefels und eine Sulfoxidreduktase nachgewiesen sowie Methionin-Metall-Bindungen in Proteinen postuliert wurden.

Neuere Entwicklungen im Bereich der Genomanalyse und der Bioinformatik haben zur Aufklärung von Genomsequenzen geführt, die die Entdeckung neuer schwefel- und selenhaltiger Proteine ermöglichen. Auf ähnliche Weise wird die Proteomik die Entdeckung neuer posttranslatieller Modifikationen erleichtern. Unsere Forschung zur natürlichen Regulation von Proteinstruktur und -funktion durch Oxidationsstufen steckt noch in den Anfängen; die in diesem Aufsatz dargestellten neueren Entwicklungen weisen auf mögliche, bislang nicht identifizierte Reaktionswege und -mechanismen hin, die in der Zelle ablaufen könnten. So hat sich bei der Untersuchung der Oxidationsstufen des Schwefels herausgestellt, dass unter physiologischen Bedingungen Disulfid-S-oxide entstehen können. Diese oxidieren die Spezies können, zusätzlich zu ihren eigenen Reaktionswegen, durch Reduktion „aktiviert“ werden und hochreaktive Sulfensäuren bilden. Derzeitige Untersuchungen des Schwefel-Redoxmetabolismus deuten darauf hin, dass mehrere Schwefel-Redoxkaskaden in der Zelle existieren, die Proteinaktivitäten und Signalwege beeinflussen.

Ein weiteres Thema ist die mögliche Metall-Bindung durch Sulfen- und Sulfinsäuren und deren potenzielle Bedeutung für Proteinfunktionen. Interessanterweise ist im aktiven Zentrum von SoxAX, einem Cytochrom vom c-Typ aus *Rhodovulum sulfidophilum*, kürzlich das erste Häm-koordinierte Cysteinpersulfid identifiziert worden, was neue Einsichten zum bakteriellen Schwefelzyklus liefert.^[129] Es wird erwartet, dass noch weitere posttranslationale Schwefelmodifikationen aufgedeckt werden. Zugleich können synthetische Enzymmimetika im rationalen Wirkstoff-Design von Nutzen sein, wie sich am Beispiel von Organochalkogen-GPx-Mimetika zeigt, die in der Therapie der zerebralen Ischämie eingesetzt werden,^[130] und anhand vielversprechender Leitstrukturen aus elektrochemischen und anderen In-vitro-Experimenten sowie Zellkulturversuchen im Zusammenhang mit Krebs und Demenz.^[83,120]

Diese Arbeit wurde unterstützt von Wellcome Trust, Leverhulme Trust, DAART, Exeter Antioxidant Therapeutics Ltd. und von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Schwerpunktsprogramm Selenoproteine Si 255/11-2). C.J. ist Chairman der EAT Ltd., und H.S. ist Fellow der National Foundation for Cancer Research. Wir danken Prof. G. Buettner (Iowa City), Dr. L.-O. Klotz (Düsseldorf), Prof. J. A. Littlechild (Exeter), Prof. W. Stahl (Düsseldorf) und Prof. J. Thomas (Ames) für hilfreiche Diskussionen.

Eingegangen am 24. Januar 2003 [A573]

- [1] *Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions* (Hrsg.: A. Pompella, G. Bahegyi, M. Wellman-Rousseau), IOS Press, Amsterdam, **2002**, S. 1–348.
- [2] *Cellular Implications of Redox Signalling* (Hrsg.: C. Gitler, A. Danon), World Scientific, Singapur, **2003**.

- [3] *Antioxidant and Redox Regulation of Genes* (Hrsg.: C. K. Sen, H. Sies, P. A. Baeuerle), Academic Press, San Diego, **2000**, S. 1–556.
- [4] *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Part A: Selenoproteins and Thioredoxin* (Hrsg.: H. Sies, L. Packer), Academic Press, San Diego, **2002**, S. 1–461.
- [5] *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Part B: Thiol Enzymes and Proteins* (Hrsg.: H. Sies, L. Packer), Academic Press, San Diego, **2002**, S. 1–364.
- [6] Y. M. Torchinsky, *Sulfur in Proteins*, Pergamon, Oxford, **1981**, S. 1–277.
- [7] P. C. Jocelyn, *Biochemistry of the SH Group*, Academic Press, London, **1972**.
- [8] *Glutathione Conjugation: Mechanisms and Biological Significance* (Hrsg.: H. Sies, B. Ketterer), Academic Press, London, **1988**, S. 1–470.
- [9] W. J. Lees, G. M. Whitesides, *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 642–647.
- [10] T. P. Akerboom, M. Bilzer, H. Sies, *J. Biol. Chem.* **1982**, *257*, 4248–4252.
- [11] R. C. Fahey, *Adv. Exp. Med. Biol.* **1977**, *86A*, 1–30.
- [12] H. Sies, *Free Radical Biol. Med.* **1999**, *27*, 916–921.
- [13] F. Q. Schäfer, G. R. Buettner, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
- [14] Y. Nishinaka, H. Masutani, H. Nakamura, J. Yodoi, *Redox Rep.* **2001**, *6*, 289–295.
- [15] A. Holmgren, *Struct. Bonding (Berlin)* **1995**, *3*, 239–243.
- [16] R. Brigelius in *Oxidative Stress* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, **1985**, S. 243–272.
- [17] D. M. Ziegler, *Annu. Rev. Biochem.* **1985**, *54*, 305–329.
- [18] J. A. Thomas, R. Mallis, H. Sies in *Cellular Implications of Redox Signalling* (Hrsg.: C. Gitler, A. Danon), World Scientific, Singapur, **2003**, S. 141–174.
- [19] G. I. Giles, C. Jacob, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 375–388.
- [20] Y. C. Chai, S. Hendrich, J. A. Thomas, *Arch. Biochem. Biophys.* **1994**, *310*, 273–281.
- [21] L. F. Chasseaud, *Adv. Cancer Res.* **1979**, *29*, 175–274.
- [22] J. P. Ploemen, M. L. van Iersel, L. W. Wormhoudt, J. N. Commandeur, N. P. Vermeulen, P. J. van Bladeren, *Biochem. Pharmacol.* **1996**, *52*, 197–204.
- [23] R. Morgenstern, J. W. DePierre, L. Ernster, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, *87*, 657–663.
- [24] R. Rinaldi, E. Eliasson, S. Swedmark, R. Morgenstern, *Drug Metab. Dispos.* **2002**, *30*, 1053–1058.
- [25] Y. Ji, B. M. Bennett, *Mol. Pharmacol.* **2003**, *63*, 136–146.
- [26] L. D. Arscott, S. Gromer, R. H. Schirmer, K. Becker, C. H. Williams, Jr., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 3621–3626.
- [27] E. F. Pai, G. E. Schulz, *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 1752–1757.
- [28] L. D. Arscott, D. M. Veine, C. H. Williams, Jr., *Biochemistry* **2000**, *39*, 4711–4721.
- [29] D. Mustacich, G. Powis, *Biochem. J.* **2000**, *346*, 1–8.
- [30] J. T. Spence, M. J. Barber, L. P. Solomonson, *Biochem. J.* **1988**, *250*, 921–923.
- [31] G. E. Arteel, K. Briviba, H. Sies, *Chem. Res. Toxicol.* **1999**, *12*, 264–269.
- [32] R. Zhao, H. Masayasu, A. Holmgren, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 8579–8584.
- [33] D. C. Rees, *Annu. Rev. Biochem.* **2002**, *71*, 221–246.
- [34] C. R. Staples, E. Ameyibor, W. Fu, L. Gardet-Salvi, A. L. Stritt-Etter, P. Schurmann, D. B. Knaff, M. K. Johnson, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11425–11434.
- [35] S. Dai, C. Schwendtmayer, P. Schurmann, S. Ramaswamy, H. Eklund, *Science* **2000**, *287*, 655–658.
- [36] G. N. Jameson, E. M. Walters, W. Manieri, P. Schurmann, M. K. Johnson, B. H. Huynh, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 1146–1147.
- [37] A. L. Persson, M. Sahlin, B. M. Sjöberg, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 31016–31020.
- [38] X. Sun, S. Ollagnier, P. P. Schmidt, M. Atta, E. Mulliez, L. Lepape, R. Eliasson, A. Gräslund, M. Fontecave, P. Reichard, B. M. Sjöberg, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6827–6831.
- [39] S. Ollagnier, E. Mulliez, P. P. Schmidt, R. Eliasson, J. Gaillard, C. Deronzier, T. Bergman, A. Gräslund, P. Reichard, M. Fontecave, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 24216–24223.
- [40] P. A. Frey, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 121–148.
- [41] J. A. Gerlt, P. C. Babbitt, *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 209–246.
- [42] H. Miller, S. S. Mande, D. Parsonage, S. H. Sarfaty, W. G. Hol, A. Claiborne, *Biochemistry* **1995**, *34*, 5180–5190.
- [43] A. L. Claiborne, T. C. Mallett, J. I. Yeh, J. Luba, D. Parsonage, *Adv. Protein Chem.* **2001**, *58*, 215–276.
- [44] S. S. Mande, D. Parsonage, A. Claiborne, W. G. Hol, *Biochemistry* **1995**, *34*, 6985–6992.
- [45] D. Parsonage, A. Claiborne, *Biochemistry* **1995**, *34*, 435–441.
- [46] T. C. Mallett, A. Claiborne, *Biochemistry* **1998**, *37*, 8790–8802.
- [47] B. Hofmann, H. J. Hecht, L. Flohé, *Biol. Chem.* **2002**, *383*, 347–364.
- [48] S. Hirotsu, Y. Abe, K. Okada, N. Nagahara, H. Hori, T. Nishino, T. Hakoshima, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 12333–12338.
- [49] E. Schröder, J. Littlechild, A. Lebedev, N. Errington, A. Vagin, M. Isupov, *Struct. Bonding (Berlin)* **2000**, *8*, 605–615.
- [50] H. Sies in *Oxidative Stress* (Hrsg.: H. Sies), Academic Press, London, **1985**, S. 1–8.
- [51] H. Sies, *Angew. Chem.* **1986**, *98*, 1061–1075; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, *25*, 1058–1071.
- [52] H. Sies in *Encyclopedia of Stress, Vol. III* (Hrsg.: G. Fink), Academic Press, San Diego, **2000**, S. 102–105.
- [53] G. I. Giles, K. M. Tasker, C. Jacob, *Free Radical Biol. Med.* **2001**, *31*, 1279–1283.
- [54] G. I. Giles, K. M. Tasker, C. Jacob, *Gen. Physiol. Biophys.* **2002**, *21*, 65–72.
- [55] G. I. Giles, K. M. Tasker, C. Collins, N. M. Giles, E. O'Rourke, C. Jacob, *Biochem. J.* **2002**, *364*, 579–585.
- [56] T. Okamoto, T. Akaike, T. Sawa, Y. Miyamoto, M. A. van der Vliet, H. Maeda, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 29596–29602.
- [57] J. Li, F. L. Huang, K. P. Huang, *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 3098–3105.
- [58] G. Nöhammer in *Thiol Metabolism and Redox Regulation of Cellular Functions* (Hrsg.: A. Pompella, G. Banhegyi, M. Wellman-Rousseau), IOS Press, Amsterdam, **2002**, S. 48–60.
- [59] B. Kagedal, M. Kallberg, B. Sorbo, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *136*, 1036–1041.
- [60] D. A. Keller, D. B. Menzel, *Chem.-Biol. Interact.* **1989**, *70*, 145–156.
- [61] C. D. Klaassen, J. W. Boles, *FASEB J.* **1997**, *11*, 404–418.
- [62] M. Negishi, L. G. Pedersen, E. Petrochenko, S. Shevtsov, A. Gorokhov, Y. Kakuta, L. C. Pedersen, *Arch. Biochem. Biophys.* **2001**, *390*, 149–157.
- [63] F. Gliubich, R. Berni, M. Colapietro, L. Barba, G. Zanotti, *Acta Crystallogr. Sect. D* **1998**, *54*, 481–486.
- [64] Y. Ogasawara, G. Lacourciere, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9494–9498.
- [65] H. Dobbek, L. Gremer, O. Meyer, R. Huber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8884–8889.
- [66] H. Dobbek, L. Gremer, R. Kiefersauer, R. Huber, O. Meyer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 15971–15976.
- [67] N. Brot, H. Weissbach, *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *223*, 271–281.
- [68] W. Vogt, *Free Radical Biol. Med.* **1995**, *18*, 93–105.
- [69] R. L. Levine, B. S. Berlett, J. Moskovitz, L. Mosoni, E. R. Stadtman, *Mech. Ageing Dev.* **1999**, *10*, 323–332.
- [70] M. K. Unnikrishnan, M. N. Rao, *Agents Actions* **1990**, *31*, 110–112.

- [71] R. L. Levine, L. Mosoni, B. S. Berlett, E. R. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1996**, 93, 15036–15040.
- [72] W. T. Lowther, N. Brot, H. Weissbach, B. W. Matthews, *Biochemistry* **2000**, 39, 13307–13312.
- [73] S. Boschi-Müller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani, F. Talfournier, A. Van Dorsselaar, G. Branlant, *J. Biol. Chem.* **2000**, 275, 35908–35913.
- [74] T. Finkel, *FEBS Lett.* **2000**, 476, 52–54.
- [75] W. Maret, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 237–241.
- [76] S. Zhang, J. Li, C.-C. Wang, C.-L. Tsou, *FEBS Lett.* **1999**, 462, 383–386.
- [77] C. Jacob, W. Maret, B. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 3489–3494.
- [78] C. Jacob, W. Maret, B. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1910–1914.
- [79] J. D. Otvos, D. H. Petering, C. F. Shaw, *Comments Inorg. Chem.* **1989**, 1, 1–35.
- [80] C. Jacob, W. Maret, B. L. Vallee, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, 248, 569–573.
- [81] W. Maret, B. L. Vallee, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 3478–3482.
- [82] S. Lee, W. Maret, *Antioxid. Redox Signaling* **2001**, 3, 531–534.
- [83] N. M. Giles, N. J. Gutowski, G. I. Giles, C. Jacob, *FEBS Lett.* **2003**, 535, 179–182.
- [84] W. Maret, C. Jacob, B. L. Vallee, E. H. Fischer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, 96, 1936–1940.
- [85] M. Tsujimura, N. Dohmae, M. Odaka, M. Chijimatsu, K. Takio, M. Yohda, M. Hoshino, S. Nagashima, I. Endo, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 29454–29459.
- [86] D. Bonnet, J. M. Stevens, R. Alves de Sousa, M. Sari, D. Mansuy, I. Artuad, *J. Biochem.* **2001**, 130, 227–233.
- [87] T. Murakami, M. Nojiri, H. Nakayama, M. Odaka, M. Yohda, N. Dohmae, K. Takio, T. Nagamune, I. Endo, *Protein Sci.* **2000**, 9, 1024–1030.
- [88] A. Miyanaga, S. Fushinobu, K. Ito, T. Wakagi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 288, 1169–1174.
- [89] D. N. Kachru, S. Khandelwal, S. K. Tandon, *Biomed. Environ. Sci.* **1989**, 2, 265–270.
- [90] A. C. Esteves, J. Felcman, *Biol. Trace Elem. Res.* **2000**, 76, 19–30.
- [91] Y. Kajiwar, A. Yasutake, T. Adachi, K. Hirayama, *Arch. Toxicol.* **1996**, 70, 310–314.
- [92] A. Messerschmidt, A. Rossi, R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, G. Gatti, A. Marchesini, R. Petruzzelli, A. Finazzi-Agro, *J. Mol. Biol.* **1989**, 206, 513–529.
- [93] R. O. Louro, E. C. de Waal, M. Ubbink, D. L. Turner, *FEBS Lett.* **2002**, 510, 185–188.
- [94] A. Buzy, V. Bracchi, R. Sterjiades, J. Chroboczek, P. Thibault, J. Gagnon, H. M. Jouve, G. Hudry-Clergeon, *J. Protein Chem.* **1995**, 14, 59–72.
- [95] D. P. Buchczyk, K. Briviba, F. U. Hartl, H. Sies, *Biol. Chem.* **2000**, 381, 121–126.
- [96] K. Brocklehurst, A. B. Watts, M. Patel, C. Verma, E. W. Thomas in *Comprehensive Biological Catalysis*, Vol. 2 (Hrsg.: M. L. Sinnott), Academic Press, London, **1998**, S. 381–423.
- [97] J. D. Shore, H. Gutfreund, R. L. Brooks, D. Santiago, P. Santiago, *Biochemistry* **1974**, 13, 4185–4191.
- [98] H. Eklund, B. V. Plapp, J. P. Samama, C. I. Branden, *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 14349–14358.
- [99] Y. Pocker, *Chem.-Biol. Interact.* **2001**, 130–132, 383–393.
- [100] I. Massova, L. P. Kotra, R. Fridman, S. Mobashery, *FASEB J.* **1998**, 12, 1075–1095.
- [101] F. X. Gomis-Ruth, K. Maskos, M. Betz, A. Bergner, R. Huber, K. Suzuki, N. Yoshida, H. Nagase, K. Brew, G. P. Bourenkov, H. Bartunik, W. Bode, *Nature* **1997**, 389, 77–81.
- [102] M. P. Rayman, *Lancet* **2000**, 356, 233–241.
- [103] T. C. Stadtman, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, 899, 399–402.
- [104] M. Birringer, S. Pilawa, L. Flohé, *Nat. Prod. Rep.* **2002**, 19, 693–718.
- [105] G. E. Arteel, H. Sies, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **2001**, 10, 153–158.
- [106] L. Schomburg, U. Schweizer, B. Holtmann, L. Flohé, M. Sendtner, J. Köhrle, *Biochem. J.* **2003**, 370, 397–402.
- [107] K. E. Hill, J. Zhou, W. J. McMahan, A. K. Motley, J. F. Atkins, R. F. Gesteland, R. F. Burk, *J. Biol. Chem.* **2003**, 278, 13640–13646.
- [108] M. Thanbichler, A. Böck, *Methods Enzymol.* **2002**, 347, 3–16.
- [109] R. E. Huber, R. S. Criddle, *Arch. Biochem. Biophys.* **1967**, 122, 164–173.
- [110] M. Maiorino, K. D. Aumann, R. Brigelius-Flohé, D. Doria, J. van den Heuvel, J. McCarthy, A. Roveri, F. Ursini, L. Flohé, *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **1995**, 376, 651–660.
- [111] P. Mauri, L. Benazzi, L. Flohé, M. Maiorino, P. G. Pietta, S. Pilawa, A. Roveri, F. Ursini, *Biol. Chem.* **2003**, 384, im Druck.
- [112] J. Köhrle, R. Brigelius-Flohé, A. Böck, R. Gartner, O. Meyer, L. Flohé, *Biol. Chem.* **2000**, 381, 849–864.
- [113] A. Böck, *BioFactors* **2000**, 11, 77–78.
- [114] A. Assmann, M. Bonifacic, K. Briviba, H. Sies, D. Asmus, *Free Radical Res.* **2000**, 32, 371–376.
- [115] A. Assmann, K. Briviba, H. Sies, *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, 349, 201–203.
- [116] R. J. Hondal, A. K. Motley, K. E. Hill, R. F. Burk, *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, 371, 29–34.
- [117] A. Müller, E. Cadenas, P. Graf, H. Sies, *Biochem. Pharmacol.* **1984**, 33, 3235–3239.
- [118] C. Jacob, G. E. Arteel, T. Kanda, L. Engman, H. Sies, *Chem. Res. Toxicol.* **2000**, 13, 3–9.
- [119] K. Briviba, R. Tamler, L. O. Klotz, L. Engman, I. A. Cotgreave, H. Sies, *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 55, 817–823.
- [120] G. I. Giles, K. M. Tasker, R. J. Johnson, C. Jacob, C. Peers, K. N. Green, *Chem. Commun.* **2001**, 23, 2490–2491.
- [121] G. Magesh, W.-W. du Mont, H. Sies, *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2125–2179.
- [122] J. Köhrle, *Mol. Cell. Endocrinol.* **1999**, 151, 103–119.
- [123] J. Köhrle in *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species, Part A: Selenoproteins and Thioredoxin* (Hrsg.: H. Sies, L. Packer), Academic Press, San Diego, **2002**, S. 125–167.
- [124] V. N. Gladyshev, S. V. Khangulov, M. J. Axley, T. C. Stadtman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 7708–7711.
- [125] H. Raaijmakers, S. Macieira, J. M. Dias, S. Teixeira, S. Bursakov, R. Huber, J. J. Moura, I. Moura, M. J. Romão, *Struct. Bonding (Berlin)* **2002**, 10, 1261–1272.
- [126] G. Fauque, H. D. Peck, J. J. G. Moura, B. H. Huynh, Y. Berlier, D. V. Dervartanian, M. Teixeira, A. E. Przybyla, P. A. Lespinat, I. Moura, J. Legall, *FEMS Microbiol. Rev.* **1988**, 4, 299–344.
- [127] S. M. Berry, M. D. Gieselman, M. J. Nilges, W. A. van der Donk, Y. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 2084–2085.
- [128] J. F. Atkins, R. F. Gesteland, *Science* **2002**, 296, 1409–1410.
- [129] V. A. Bamford, S. Bruno, T. Rasmussen, C. Appia-Ayme, M. R. Cheesman, B. C. Berks, A. M. Hemmings, *EMBO J.* **2002**, 21, 5599–5610.
- [130] M. Parnham, H. Sies, *Expert Opin. Invest. Drugs* **2000**, 9, 607–619.
- [131] T. Sandalova, L. Zhong, Y. Lindqvist, A. Holmgren, G. Schneider, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, 98, 9533–9538.
- [132] F. Åslund, K. D. Berndt, A. Holmgren, *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 30780–30786.
- [133] E. Nogoceke, D. U. Gommel, M. Kiess, H. M. Kalisz, L. Flohé, *Biol. Chem.* **1997**, 378, 827–836.
- [134] N. Reckenfelderbaumer, R. L. Krauth-Siegel, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 17548–17555.
- [135] J. Lundstrom, A. Holmgren, *Biochemistry* **1993**, 32, 6649–6655.
- [136] J. F. Collett, J. C. Bardwell, *Mol. Microbiol.* **2002**, 44, 1–8.