

MARIA WRÓBEL, HALINA JURKOWSKA, MARTA KACZOR, TOMASZ UCHACZ

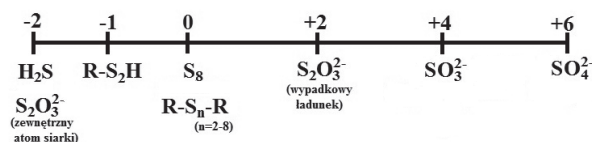
*Katedra Biochemii Lekarskiej UJ CM
 Kopernika 7; 31-034 Kraków
 E-mail: mbwrobel@cyf-kr.edu.pl*

RODANAZA I TRANSFERAZA SIARKOWA 3-MERKAPTOPIROGRONIANU – ENZYMY POKREWNE EWOLUCYJNIE

WSTĘP

Siarka jest składnikiem diety obecnym we wszystkich tkankach (TANABE 2008), szczególnie tych bogatych w białko, jak: erytrocyty, mięśnie, skóra, włosy. Siarka charakteryzuje się znaczną aktywnością chemiczną i biologiczną (KESSLER 2006). W tkankach zwierząt obecne są różne związki tego pierwiastka, np.: metionina, cysteina, glutation, siarczany oraz produkty ich przemian, takie jak: tauryna, homocysteina czy gazowy siarkowodor (H_2S) (UBUKA 2002, TANABE 2008). Metionina i cysteina są aminokwasami siarkowymi, które występują głównie jako składniki peptydów i białek (TOOHEY 1989). Głównym, końcowym produktem metabolizmu cysteiny są siarczany, które występują w tkankach zwierząt (NAGASAWA i współaut. 2007) jako część składowa proteoglikanów i estrów siarczanych. Atomy siarki w związkach obecnych w tkankach zwierzęcych występują na różnych stopniach utlenienia, najczęściej przybierają dwa skrajne stopnie utlenienia: 2- i 6+ (Ryc. 1) (THOMAS i SURDIN-KERJAN 1997, KESSLER 2006). Stan całkowicie utleniony albo całkowicie zredukowany charakteryzuje się największą stabilnością. Oprócz związków zawierających stabilne atomy siarki w organizmach występują jeszcze inne, labilne atomy tego pierwiastka (KESSLER 2006),

np. atomy siarki sulfanowej, która ze związków ją zawierających zostaje łatwo wydzielona pod postacią H_2S (SHIBUYA i współaut. 2009). Przykładami układów zawierających atomy siarki sulfanowej są np.: tiosiarczany (zewnętrzna siarka), białkowe poliosiarczki i nadiosiarczki lub siarka elementarna przyłączona do hydrofobowego miejsca w albuminie (TOOHEY 1989, WRÓBEL 2000, KESSLER 2006, NAGASAWA i współaut. 2007). Endogenne sulfhydrylowe związki odgrywają zasadniczą



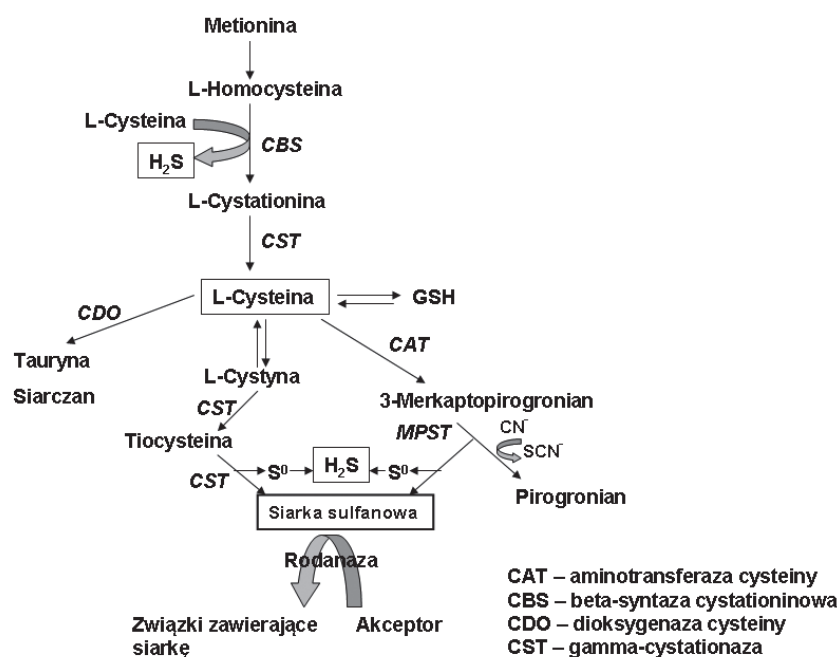
Ryc. 1. Stopnie utlenienia atomów siarki w związkach występujących w układach biologicznych.

rolę w prawidłowym przebiegu wielu fizjologicznych procesów w organizmie (TANABE 2008), takich jak: stabilizacja struktur białkowych, uczestnictwo w procesach redoks (glutation, tioredoksyna), regulacja aktywności enzymów (WRÓBEL 2000, UBUKA 2002, KESSLER 2006, JURKOWSKA i WRÓBEL 2008).

TRANSFERAZY SIARKOWE

Transferazy siarkowe, to enzymy szeroko rozpowszechnione w organizmach pro-

kariotycznych i eukariotycznych (NAGAHARA i współaut. 1995, NAGAHARA i NISHINO 1996,



Ryc. 2. Powstawanie i przemiany L-cysteiny (wg JURKOWSKA i współaut. 2011a).

WILLIAMS i współaut. 2003, AGBOOLA i współaut. 2006), katalizujące przenoszenie atomów siarki i przemiany związków zawierających siarkę sulfanową (WESTLEY i współaut. 1983, TANABE 2008) oraz odgrywające zasadniczą rolę w beztlenowym (desulfuracyjnym) metabolizmie L-cysteiny (Ryc. 2) (TOOHEY 1989, WRÓBEL 2000, ALPHEY i współaut. 2003, TANABE 2008). Do transferaz siarkowych zaliczamy: rodanazę (transferaza siarkowa tiosiarczanu, EC 2.8.1.1), transferazę siarkową 3-merkaptopirogronianu (MPST, EC 2.8.1.2) i γ -cystationazę (CST, γ -liaza cystationinowa, EC 4.4.1.1) (WRÓBEL 2000, TANABE

2008). Rodanaza i MPST są enzymami pokrewnymi ewolucyjnie (PALLINI i współaut. 1991, NAGAHARA i współaut. 1995, NAGAHARA i NISHINO 1996, AITA i współaut. 1997, ALPHEY i współaut. 2003), o czym świadczy wysoki procent homologii w sekwencji nukleotydowej kodującej gen dla MPST i rodanazy u człowieka (Ryc. 3). Identyfikacja sekwencji nukleotydów w cDNA i sekwencji aminokwasów pomiędzy ludzką MPST i rodanazą wynosi odpowiednio 67 % (Ryc. 3) i 59% (sekwencje nukleotydową i aminokwasową porównano wykorzystując funkcję BLAST bazy danych NCBI; MPST: NM_021126.4, NP_066949.2 porównano z rodanazą: NM_003312.4, NP_003303.2). Uwagę

zwraca duży stopień homologii—sekwencji aminokwasowej MPST i rodanazy z tkanek zwierząt na różnych szczeblach rozwoju ewolucyjnego (ok. 60%, białka konserwatywne). Na rycinie 4 przedstawiono podobieństwo sekwencji kodującej genu MPST u *Homo sapiens* i *Xenopus laevis*. Zwiększoną ekspresję transferaz siarkowych stwierdzono w warunkach szoku osmotycznego, niedoboru siarki lub w obecności nadtlenu (ADAMS i współaut. 2002, PINTO i współaut. 2006, SABELLI i współaut. 2008, KRUEGER i współaut. 2010).

RODANAZA

Rodanaza odkryta została w wątrobie szczurzej w 1933 r. (LANG 1933). Sörbo w 1953 r. jako pierwszy wyizolował i oczyścił rodanazę z wątroby wołu (SÖRBO 1953, HOROWITZ i DE TOMA 1970). Kolejne lata upływały pod znakiem licznych badań *in vitro* skupiających uwagę na występowaniu i aktywności rodanazy w organizmach zwierzęcych (SÖRBO 1953, 1957, 1960; WESTLEY 1973, 1977). W 1977 r. określono jej udział w tworzeniu centrów żelazowo-siarkowych białek (BONOMI i współaut. 1977, NAGAHARA i współaut. 1995). W przeciągu dwóch kolejnych lat określona

została struktura trzeciorzędowa tego enzymu (PLOGEMAN i współaut. 1978). W 1983 r. zlokalizowano miejsce aktywne rodanazy (HOL i współaut. 1983), a 3 lata później, w 1986 r., wyjaśniono mechanizm przenoszenia przez ten enzym zewnętrznej siarki tiosiarczanu (patrz Ryc. 1) na nukleofilowy akceptor — cyjanek (HOROWITZ i CRISCIMAGNA 1986). W 1990 r. określono strukturę pierwszorzędową rodanazy z wątroby kurzej (KOHANSKI i HEINRIKSON 1990, NAGAHARA i współaut. 1995, AITA i współaut. 1997). Pierwszorzędową strukturę ludzkiej odmiany tego enzymu udało się okre-

Wynik = 316 bity (350), Przewidywania = 7e-90
 Identyczność = 580/836 (69%), Luki = 24/836 (2%)

MPST	251	GCTCTGCCGCGCGCTGGTGTGCGCGCAATGGGTGGCGAGGCGCTGCGGGCCCCGCGCGC	310
Rodanaza	87	GCTCTACCGGGCGCTGGTCTCCACCAAGTGGCTGGCGGAGTCCAT-CAGGACTGGCAAGC	145
MPST	311	TGGG--CAGCCTCTGCAGCTGCTGGACGCCTCCTGGTACCTGCCGAAGCTGGGGCGCGAC	368
Rodanaza	146	TGGGGCCCCGCGC-CTGCGGGTGTCTGGACGCGTCTGGTACTCACC-AGGCACCCGAGAGGC	203
MPST	369	GCGCGACGCGAGTTGAGGAGCGCCACATCCCGGGCGCGCTTTCTTCGACATCGACCAG	428
Rodanaza	204	CCGCAAGG--AGTACCTCGAGCGCCACGTACCCGGCGCCTCTTCTTTGACATAGAAGAG	261
MPST	429	TGCAGCGACCGCACCTCGCCCTACGACCACATGCTGCCCCGGGGCGGAGCAT---TTCGCG	485
Rodanaza	262	TGCGGGGACACGGCGTTCGCCCTACGAGATGATGCTGCCAG---CGAGGCTGGCTTCGCC	318
MPST	486	GAGTACGCGAGGCCGCTGGGCGTGGGCGCGGCCACCCACGTCGTGATCTACGACGCCAGC	545
Rodanaza	319	GAGTATGTGGGCGCGCTGGGCATCAGCAACCACACGACGTCGTGGTGTATGATGGTGAA	378
MPST	546	GACCAGGGCCTCTACTCCGCCCGCGCGTCTGGTGGATGTTCCGCGCCTTCGGCCACCAC	605
Rodanaza	379	CACCTGGGCAGCTTCTATGCTCCCGGGTCTGGTGGATGTTCCGTGTGTTGGGCCACCGC	438
MPST	606	GCCGTGTCACTGCTTGATGGCGGCTCCGCCACTGGCTGCGCCAGAACCTCCCGCTCAGC	665
Rodanaza	439	ACCGTATCAGTGCTCAATGGTGGCTTCGGAACCTGGCTGAAGAGGGGCCACCCGGTGACA	498
MPST	666	TCCGGCAAGAGCCAAC---CTGCTCCCGCGAGTTCCGCGCTCAGCTCGACCCCGCCTTC	722
Rodanaza	499	TCCG---AGCCCTCAGCCCGAGAACCAGCGCTCTTCAAAGCCACACTGGACCGCTCCCTG	555
MPST	723	ATCAAGACCTACGAGGACATCAAGGAGAACCTGGAATCCCGGCGCTTCCAGGTGGTGGAC	782
Rodanaza	556	CTCAAGACCTACGAGCAGGTGCTGGAGAACCTGAATCTAAGAGGTTCCAGCTGGTGGAT	615
MPST	783	TCCCGAGC-CACTGGCAGGTTCCCGCGCACCGAGCCCGAGCCCGAGACG--GCATTGAA	839
Rodanaza	616	TCAAGGTCTCAAGGGC-GGTTCTCTGGGCACCGAGCCGGAGCCGGATGCAGTAGGACTGGA	674
MPST	840	C-CTGGCCACATCCAGGTACCGTGAACATCCCCCTTCACAGACTTCCTGAGCCAGGAGGG	898
Rodanaza	675	CTCGGGCCATATCCGTGGTGCCTCAACATGCCTTTTCATGGACTTCCTGACTGAGGATGG	734
MPST	899	GCTGGAGAAGAGCCCTGAGGAGATCCGCCATCTGTTCCAGGAGAAGAAAGTGGACCTGTC	958
Rodanaza	735	CTTCGAGAAGGGCCAGAGAGCTCCGTGCTCTGTTCCAGACCAAGAAGTGGATCTCTC	794
MPST	959	TAAGCCACTGGTGGCCACGTGTGGCTCTGGCGTCACAGCCTGCCACGTGGCCTAGGGGC	1018
Rodanaza	795	GCAGCCTCTCATTGCCACGTGCCGCAAGGGAGTCACCGCCTGCCACGTGGCCTTGGCTGC	854
MPST	1019	CTACCTCTGCGGCAAGCCAGACGTGCCCATCTACGATGGCTCCTGGGTGGAGTGGT	1074
Rodanaza	855	CTACCTCTGCGGCAAGCCTGATGTGGCCGTGTACGATGGCTCCTGGTCCGAGTGGT	910

Ryc. 3. Porównanie sekwencji nukleotydowej ludzkiego genu kodującego *MPST* i rodanazy (sekwencje nukleotydową porównano wykorzystując funkcję BLAST bazy danych NCBI; *MPST*: NM_021126.4 porównano z rodanazą: NM_003312.4).

ścić dopiero 10 lat później (AITA i współaut. 1997). Dalsze badania zaowocowały odkryciem na 22 chromosomie genu kodującego ludzką rodanazę (HUNT 1998). Wspomniany gen składa się z dwóch eksonów (E1: 595 bp i E2: 299 bp) oraz znajdującego się pomiędzy nimi intronu o wielkości 5,5 bp. Rozpiętość genu rodanazy szacuje się na 7,8 kbp (HUNT 1998).

Po transkrypcji w jądrze, translacji w cytoplazmie, odszczepieniu N-końcowej helisy, białko transportowane jest do macierzy mitochondrialnej (BOGGARAM i współaut. 1985). W cytoplazmie rodanaza wołu wykazuje monomeryczną strukturę białkową, a białko mitochondrialne ma dwie domeny strukturalne. Obie domeny mają nie tylko podobną wielkość, ale też strukturę prze-



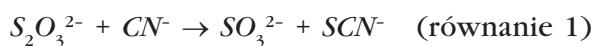
Ryc. 5. Transferaza siarkowa tiosiarczan: cyjanek (EC 2.8.1.1.) (PDB ID: 2ORA; GLIUBICH i współaut. 1996) (poszczególne elementy struktury wyszczególniono kolorami: czerwony – helisy α ; żółty – arkusze β ; zielony – łańcuchy polipeptydowe).

przestrzeni międzysdomenowej, jest utworzone głównie przez C-końcowe fragmenty domen (ALPHEY i współaut. 2003).

Rodanaza zlokalizowana jest w komórkach ssaków głównie w mitochondriach, a w przypadku niższych kręgowców w cytozolu (DUDEK i współaut. 1980; NAGAHARA i współaut. 1995, 1998; AL-QARAWI i współaut. 2001). Tkankami o największej aktywności tego enzymu w organizmach zwierzęcych są wątroba i nerki (AL-QARAWI i współaut. 2001, JAMSHIDZADEK i współaut. 2001, AMINLARI i współaut. 2002, NAGASAWA i współaut. 2007). Co ciekawe, u przeżuwaczy w nabłonku różnych części przewodu pokarmowego wysoka jest aktywność rodanazy, przewyższająca nie raz wartość aktywności tego enzymu w wątrobie. Na przykład, psy i koty mają bardzo wysoką aktywność rodanazy w warstwie śluzówki jelita grubego, co wynika z konieczności detoksykacji cyjanów powstających podczas procesu trawienia (SHAHBAZKIA i współaut. 2009).

Mitochondrialna rodanaza z wątroby wołu występuje w dwóch izoformach (NAGAHARA i współaut. 1995, NANDI i współaut. 2000), które różnią się właściwościami katalitycznymi (NANDI i współaut. 2000). Obie izoformy są zdolne do wykorzystywania zredukowanej tioredoksyny jako akceptora siarki, ale tylko forma z mniejszym całkowitym ładunkiem ujemnym katalizuje bezpośrednie utlenianie zredukowanej tioredoksyny w obecności reaktywnych form tlenu (WILLIAMS i współaut. 2003, NANDI i współaut. 2000). Przeprowadzone badania wykazują, że rodanaza bierze czynny udział w procesach wewnątrzkomórkowej (wewnątrzmitochondrialnej) detoksykacji reaktywnych form tlenu (NANDI i współaut. 2000, ALPHEY i współaut. 2003, KRUEGER i współaut. 2010).

Rodanaza katalizuje rozerwanie wiązania tiosiarczanowego w substracie i przenosi atomy siarki z anionowych donorów, takich jak: tiosiarczany (SÖRBO 1953), układy nadsiarczkowe (SÖRBO 1960) i tiosulfoniany, na różne nukleofilowe akceptory: cyjanki (SÖRBO 1953), siarczyny (SÖRBO 1957) czy glutation (równanie 1) (SINGLETON i SMITH 1988, NAGAHARA i NISHINO 1996, NAGAHARA i współaut. 1998, ALPHEY i współaut. 2003, KESSLER 2006, NAGASAWA i współaut. 2007, HÄNZELMANN i współaut. 2009):



W reakcji tej zewnętrzny atom siarki przenoszony jest z tiosiarczanu na Cys-247 w centrum aktywnym enzymu i powstaje produkt pośredni zawierający układ nadsiarczkowy. W następnym etapie zachodzi addycja jonu CN^- , która prowadzi do rozpadu struktury zawierającej kowalencyjnie przyłączony do enzymu atom siarki i powstaje jon tiocyjanianowy SCN^- (WESTLEY 1973, NAGASAWA i współaut. 2007). Przyłączenie atomu siarki powoduje przesunięcia elektronowe w cząsteczce, które prowadzą do modyfikacji aktywnych reszt tiolowych (HARGROVE i WICHMAN 1987, NAGAHARA 2011). Siarka sulfanowa transportowana za pośrednictwem rodanazy może być przenoszona na wiele enzymów, aktywując je lub inaktywując. Ten labilny, reaktywny atom siarki sulfanowej aktywuje m.in. syntetazę δ -aminolewulinianową (YAMANISHI i współaut. 1983), hamuje zaś enzymy wątroby szczurzej, takie jak np.: fosfofruktokinazę, kinazę pirogronianową (OGASAWARA i współaut. 1997), dehydrogenazę serynową (KATO i współaut. 1966), aminotransferazę tyrozynową (HARGROVE 1988).

Warto zaznaczyć, że rodanaza wykazuje dwojaką aktywność; może ona działać jako reduktaza tiosiarczanowa (VILLAREJO i WESTLEY 1963, NANDI i współaut. 2000) lub jako syntaza tiosiarczanowa przenosząc wodorosiarczkowe i tiosiarczanowe atomy siarki na aniony siarczanowe (IV). Rodanaza uczestnicząc w reakcji przenoszenia siarki tworzy układ nadsiarczku R-S-SH, a zachowując się analogicznie do oksydazy tioredoksyny tworzy strukturę R-O-SH (TOOHEY 1989, NAGAHARA 2011). Zredukowana tioredoksyna może zostać utleniona przez reaktywne formy tlenu w reakcji katalizowanej przez rodanazę (SABELLI i współaut. 2008, KRUEGER i współaut. 2010, NAGAHARA 2011).

Spośród wielu funkcji rodanazy najwcześniej poznaną był udział tego enzymu w detoksykacji jonów cyankowych w organizmach żywych (WESTLEY 1973, 1980; NAGAHARA i współaut. 1995; ALPHEY i współaut. 2003; WILLIAMS i współaut. 2003; RAMASAMY i

współaut. 2006; TANABE 2008). Rodanaza odgrywa także ważną rolę w detoksykacji nieorganicznego siarczku (NAGAHARA i współaut. 1995, RAMASAMY i współaut. 2006, TANABE 2008), jest odpowiedzialna za utrzymywanie poziomu siarki sulfanowej w organizmach (WESTLEY 1980) oraz dostarcza siarki do tworzenia centrów żelazowo-siarkowych w białkach (BONOMI i współaut. 1985, NAGAHARA i współaut. 1995, WILLIAMS i współaut. 2003, AGBOOLA i współaut. 2006, TANABE 2008). Jest ponadto enzymem uczestniczącym we wbudowywaniu atomów siarki do nukleotydów podczas procesu potranskrypcyjnej modyfikacji tRNA (PALENCHAR i współaut. 2000), a u ssaków rodanaza wiąże się z 5S rRNA, uczestnicząc w transporcie tego rybosomalnego składnika do mitochondriów. W tym kompleksie rodanaza ma konformacje enzymatycznie nieaktywną (SMIRNOV i współaut. 2010).

TRANSFERAZA SIARKOWA 3-MERKAPTOPIROGRONIANU (MPST)

MPST (EC 2.8.1.2) została odkryta 20 lat później niż rodanaza, w 1953 r., również w wątrobie szczura (MEISTER 1953, WOOD i FIELDER 1953, MEISTER i współaut. 1954). Początkowo traktowano ją jako niezależny od rodanazy enzym przenoszący siarkę (MEISTER 1953, WOOD i FIELDER 1953). Lata 1957-1980 poświęcone były badaniom dotyczącym występowania i aktywności MPST oraz jej roli w organizmach zwierzęcych (WESTLEY 1980, DUDEK i współaut. 1980). Pierwszorzędowa struktura ludzkiej MPST ustalona została w 1991 r., 4 lata później wyizolowano i określono strukturę pierwszorzędową MPST wątroby szczurzej, a w 1996 r. podano dokładną masę cząsteczkową enzymu (NAGAHARA i NISHINO 1996). Rok 1998 przyniósł informacje dotyczące genu kodującego MPST (HUNT 1998).

Ludzki gen MPST, podobnie jak gen rodanazy, znajduje się na chromosomie 22 (dokładna lokalizacja: 22q11.2) i składa się z trzech eksonów (E1: 212 bp; E2: 619 bp; E3: 607 bp). Sekwencje kodujące dla MPST znajdują się na 2 i 3 eksonie i oddzielone są pomiędzy sobą intronem o wielkości 4,4 bp (według Banku Danych sekwencji; gen MPST: NT_011520.10, MPST mRNA: NM_021126.4). Charakterystyczne dla tego genu sekwencje bogate w guaninę i cytozynę zlokalizowane

są w miejscu promotorowym (NAGAHARA i współaut. 2004, BILLAUT-LADEN i współaut. 2006). W procesie mutagenезы ukierunkowanej wykazano, że zamiana dwóch aminokwasów w centrum aktywnym rodanazy wątroby wołowej (Arg i/lub Lys) z resztami aminokwasowymi MPST np. u *Leishmania major* (Gly i/lub Ser), zmniejsza aktywność rodanazy, a zwiększa aktywność MPST, co pokazuje, że te dwie pozycje determinują specyficzność substratową enzymów (NAGAHARA i współaut. 1995, NAGAHARA i NISHINO 1996, ALPHEY i współaut. 2003, WILLIAMS i współaut. 2003). Bazując na tych odkryciach stwierdzono, że MPST i rodanaza są pokrewne ewolucyjnie (NAGAHARA i współaut. 1995).

U zwierząt ekspresja MPST obserwowana jest w nerkach, wątrobie, sercu, płucach, śledzionie i mózgu (UBUKA i współaut. 1985, AMINLARI i współaut. 1989, NAGAHARA i współaut. 1998, BILLAUT-LADEN i współaut. 2006). Nerki, wątroba i serce zawierają dużą ilość mRNA dla MPST, podczas gdy w innych tkankach, szczególnie w mózgu, mRNA dla MPST jest mniej (NAGAHARA i współaut. 1999, NAGAHARA i współaut. 2004, BILLAUT-LADEN i współaut. 2006). W komórkach MPST zlokalizowana jest zarówno w cytoplazmie, jak i mitochondriach (DUDEK i współaut. 1980, OGASAWARA i współaut. 1994, NAGAHARA i współ-

aut. 1995, WRÓBEL 2000). SHIBUYA i współaut. (2009) potwierdzili, że MPST oraz cytozomalne i mitochondrialne aminotransferazy cysteinowe zlokalizowane są w komórkach śródbłonna aorty piersiowej, gdzie odpowiadają za produkcję H_2S z cysteiny. Wykazano, że ilość mRNA dla MPST skorelowana jest z aktywnością tego enzymu (NAGAHARA i współaut. 1999).

Pierwszorzędowa struktura szczurzego MPST zawiera konserwatywną sekwencję aminokwasów: Arg-187, Arg-196, Cys-247, Gly-248, Ser-249 (NAGAHARA i NISHINO 1996). Arg-196 jest charakterystyczną dla MPST resztą aminokwasową i nie ma odpowiednika w rodanazie (NAGAHARA i NISHINO 1996). Istnieje również charakterystyczna kombinacja reszt aminokwasowych o następującej sekwencji: Cys-Gly-Ser-Gly-Val-(Thr/Ser), dzięki której istnieje możliwość identyfikacji enzymów należących do rodziny MPST (ALPHEY i współaut. 2003). Lys-249 w rodanazie jest zastąpiona przez Ser-249 w MPST. Arg-248 (Arg-247 w rodanazie) i Cys-247 są bardzo ważnymi resztami dla struktury i funkcji zarówno rodanazy, jak i MPST (NAGAHARA i współaut. 1995, 1999). Arg-196 i Arg-187 znajdujące się w centrum aktywnym MPST wiążą 3-merkaptopirogronian; Arg-187 reaguje z grupą karbonylową 3-merkaptopirogronianu, a Cys-247 obecna w centrum aktywnym odpowiedzialna jest za tworzenie układu nadsiarczku podczas reakcji (NAGAHARA i NISHINO 1996, NAGAHARA i współaut. 2004, NAGAHARA i KATAYAMA 2005, NAGAHARA i współaut. 2007).

Struktura trzeciorzędowa MPST podobna jest do struktury rodanazy. MPST, podobnie jak rodanaza, zawiera dwie domeny (N- i C-końcowa domena) o podobnych rozmiarach i konformacji (pofałdowaniu), lecz stosunkowo niskiej homologii sekwencji aminokwasowej (NAGAHARA i współaut. 1995, ALPHEY i współaut. 2003, WILLIAMS i współaut. 2003). Rozpatrując strukturę cząsteczki ludzkiej MPST (PDB ID: 3LOH) stwierdzono, że domena N-końcowa składa się z 5 ułożonych równolegle β -płyt otoczonych przez 5 α -helis; jest to struktura charakterystyczna dla tzw. domeny rodanazowej. Podobnie, C-końcowa domena składa się z 4 ułożonych równolegle β -płyt otoczonych w podobny sposób przez 5 α -helis (ALPHEY i współaut. 2003, SPALLAROSSA i współaut. 2004, HÄNZELMANN i współaut. 2009).

Sekwencja miejsca aktywnego w MPST wyizolowanej z *Leishmanii major* różni się

nieznacznie od sekwencji aminokwasów miejsca aktywnego enzymu otrzymanego z wątroby szczurzej. Miejsce aktywne MPST *Leishmanii major* zlokalizowane jest pomiędzy N- i C-końcową domeną i utworzone zostało przez 7 odcinków łańcucha polipeptydowego (ALPHEY i współaut. 2003, WILLIAMS i współaut. 2003). Miejsce aktywne MPST i rodanazy *Leishmanii major* jest dodatkowo naładowane i przez to wykazuje zdolność do przyciągania oraz wiązania ujemnie naładowanych ligandów (WILLIAMS i współaut. 2003, NAGAHARA 2011). Arg-185 (Arg-186 w rodanazie) odpowiedzialna jest za elektrostatyczne wiązanie ligandów, np. jonu siarczanu (IV) w centrum aktywnym enzymu (NAGAHARA i współaut. 1995, ALPHEY i współaut. 2003). Ser-255 bierze prawdopodobnie udział w wiązaniu 3-merkaptopirogronianu poprzez oddziaływanie z grupą karbonylową (ALPHEY i współaut. 2003). To oddziaływanie polaryzuje grupę karbonylową ułatwiając nukleofilowy atak na tiolową grupę Cys-253 (ALPHEY i współaut. 2003, NAGAHARA i współaut. 2007). Ze względu na strukturę aminokwasową, wypadkowe pole elektryczne otaczające resztę cysteinową miejsca aktywnego w mitochondrialnej rodanazie jest silniejsze niż w MPST - hipoteza ta nie jest jeszcze potwierdzona doświadczalnie (NAGAHARA 2011).

MPST przenosi siarkę z 3-merkaptopirogronianu (fizjologiczny substrat) na nukleofilowe akceptory takie jak: cyjanki, sulfoniany czy 2-merkaptioetanol, tworząc odpowiednio rodanki, tiosulfoniany lub tiosiarczany i nadsiarczki merkaptioetanolu (NANDI i współaut. 2000, WRÓBEL 2000, ALPHEY i współaut. 2003, WILLIAMS i współaut. 2003, NAGASAWA i współaut. 2007). Wiązanie substratu jest możliwe dzięki obecności płytkiego zagłębienia w miejscu aktywnym, umożliwiającego specyficzne dopasowanie się cząsteczki 3-merkaptopirogronianu. Obecne w katalitycznej wnęce trzy aminokwasy: Cys-247, Arg-187 i Arg-196, aktywnie uczestniczą w wiązaniu substratu (ALPHEY i współaut. 2003). Proces przyłączenia substratu do wnęki katalitycznej wspomagany jest przez dodatnio naładowane łańcuchy boczne Arg-187 i Arg-196, które oddziałują elektrostatycznie z atomami tlenu z grupy karboksylowej i karbonylowej substratu (NAGAHARA 2011). Ujemnie naładowany atom siarki z grupy -SH katalitycznej cysteiny (Cys-247), znajdującej się z tyłu szczeliny katalitycznej, przyciąga i wiąże kowalencyjnie atom siarki 3-merkaptopirogronianu, tworząc układ nadsiarczkowy (równanie 2)

(NAGAHARA i współaut. 2007). Atom ten stabilizowany jest przez pięć wiązań wodorowych (PLOGMAN i współaut. 1978, NAGAHARA i NISHINO 1996, NAGAHARA i współaut. 1998, ALPHEY i współaut. 2003, KESSLER 2006).



gdzie:

$E-SH$ – wolny enzym

$E-S-SH$ – kompleks enzym-siarka.

W drugim etapie, ilustrującym przebieg procesu detoksykacji (równanie 3), w centrum aktywnym enzymu następuje nukleofilowy atak anionu CN^- na atom siarki układu nadsiarczowego, powodując jego oderwanie i utworzenie końcowego produktu reakcji, jakim jest anion tiocyjankowy SCN^- . Produkt ten charakteryzuje się znacznie niższą, niż jon CN^- , toksycznością oraz możliwością wydalania przez nerki (WING i BASKIN 1992, PORTER i BASKIN 1995, AGBOOLA i współaut. 2006, BILLAUT-LADEN i współaut. 2006, NAGASAWA i współaut. 2007). Funkcja MPST jest w tym przypadku analogiczna do działania ro-

danazy (KESSLER 2006). Ostatnim etapem wyżej opisaney reakcji jest oddysocjowanie tiocyjanku i pirogronianu z centrum aktywnego MPST. Enzym ten uczestniczy również w procesie desulfuracji 3-merkaptopirogronianu do pirogronianu i H_2S (SHIBUYA i współaut. 2009). MPST, poza tym, że odgrywa kluczową rolę w procesach detoksykacji cyjanków (WING i BASKIN 1992, PORTER i BASKIN 1995, BASKIN i współaut. 1999), bierze też aktywny udział w katabolizmie cysteiny (ALPHEY i współaut. 2003, NAGAHARA i KATAYAMA 2005, NAGASAWA i współaut. 2007) oraz sulfurylacji tRNA (HARRIS 1978; WONG i współaut. 1974, 1975) na etapie jego potranskrypcyjnych modyfikacji (PALENCHAR i współaut. 2000). W ostatnim z wymienionych procesów, MPST wspomaga wbudowywanie atomów siarki w strukturę nukleotydów, co prowadzi do powstania tiopirymidyn i metyloitiopuryn będących integralnymi składnikami tRNA wszystkich organizmów żywych (WRÓBEL 2000).

Niedobór lub brak aktywności MPST może być związany z dziedziczną chorobą znaną jako disulfiduria merkaptopmleczanowo-cysteinowa (BILLAUT-LADEN i współaut. 2006).

RESZTY CYSTEINOWE A BIOLOGICZNA ROLA TRANSFERAZ SIARKOWYCH

Reszty cysteinowe występujące w białkach stabilizują ich strukturę, regulują ich funkcje i koordynują metale. Enzymy zawierające w miejscu aktywnym reszty cysteiny odgrywają zasadniczą rolę w procesach biologicznych, takich jak: regulacja przebiegu cyklu komórkowego, apoptozy czy transdukcji sygnału (NAGAHARA 2011). Zarówno rodanaza, jak i MPST posiadają zdolność wiązania selenu w stosunku 1:1, przy czym selen łatwiej uwalniany jest z adduktu powstałego z MPST niż z rodanazy. Co więcej, selen związany z MPST jest bardziej dostępny dla syntetazy selenofosforanowej, co czyni ten enzym potencjalnie lepszym białkiem uczestniczącym w transporcie tego pierwiastka (OGASAWARA i współaut. 2005, SABELLI i współaut. 2008). Aktywność enzymów zawierających redokso aktywną cysteinę w miejscu aktywnym, hamowana jest w wyniku utlenienia grupy $-SH$, lecz aktywność ta może zostać przywrócona przez redukcję w obecności związków, takich jak tioredoksyna lub glu-

tation (NAGAHARA 2011). Nukleofilowe centrum aktywne enzymu jest korzystne dla reakcji katalizowanych przez transferazy (desulfurazy, fosfatazy i siarkotransferazy), hydrolazy (proteazy cysteinowe) i izomerazy (izomeraza disiarczowa). Biologiczne znaczenie przechodzenia pomiędzy formą sulfenylową i tiolanową katalitycznej cysteiny nie jest jasne (NAGAHARA 2011).

Obecnie prowadzone są badania wskazujące na wzrost aktywności MPST w nerkach w odpowiedzi na narażanie zwierząt na działanie jonów metali ciężkich (ołów, kadm, rtęć). Wyniki tych badań sugerują udział transferaz siarkowych w ochronie antyoksydacyjnej m.in. w nerkach, o czym świadczy zwiększenie aktywności tych enzymów w odpowiedzi na stres oksydacyjny (WRÓBEL i współaut. 2004; SURA i współaut. 2006, 2011; KRUEGER i współaut. 2010). KRUEGER i współaut. (2010) badają wpływ stresu oksydacyjnego na zmniejszoną ekspresję genu kodującego rodanazę, w przypadku hemodializowanych pacjentów.

PODSUMOWANIE

Rodanaza i MPST są enzymami pokrewnymi ewolucyjnie (NAGAHARA i współaut. 1995, NAGAHARA i NISHINO 1996, ALPHEY i współaut. 2003, NAGAHARA 2011), o czym świadczy podobieństwo strukturalne genów oraz białek, w tym również podobna struktura centrum aktywnego, a także znaczne podobieństwo w sekwencji nukleotydów w cDNA (Rys. 2) (HUNT 1998). Masy cząsteczkowe obu enzymów również są zbliżone i wynoszą ok. 33 kDa (NAGAHARA i współaut. 1995, KRUEGER i współaut. 2010). Ponadto, enzymy te mają podobne właściwości fizykochemiczne i katalityczne (NAGAHARA i współaut. 1995, ALPHEY i współaut. 2003, KESSLER 2006, NAGAHARA 2011). NISHINO i współaut. (1983, 1985) wykazali, że zarówno rodanaza, jak i MPST mogą przenosić atomy siarki z tiosiarczanu lub merkaptopirogronianu na molibdenowe ligandy oksydazy ksantynowej.

Transferazy siarkowe w organizmie przeciwdziałają stresowi oksydacyjnemu (OGASAWARA i współaut. 1999, 2005; WRÓBEL i JURKOWSKA 2007), a przez to wykazują pośrednio działanie antynowotworowe (TOOHEY 1989, PINTO i współaut. 2006, SABELLI i współaut. 2008). Badania prowadzone na ludzkich komórkach nowotworowych U373

(astrocytoma) (JURKOWSKA i WRÓBEL 2008, 2011b) wykazały, że prekursorzy cysteiny wpływają na zwiększenie aktywności MPST i wzrost poziomu siarki sulfanowej, czemu towarzyszy hamowanie proliferacji tych komórek. Wykazano, że w komórkach U373 (WRÓBEL i JURKOWSKA 2007), w odpowiedzi na stres oksydacyjny generowany menadionem, hamowana jest aktywność MPST i rodanazy, spada poziom siarki sulfanowej i glutationu, co może być wynikiem utleniania grup sulfhydrylowych w centrach aktywnych siarkotransferaz, prowadzącego do ich inaktywacji.

Niewiele wiadomo na temat regulacji procesu transkrypcji genu kodującego ludzką rodanazę (KRUEGER i współaut. 2010). U bakterii transkrypcja homologów tego enzymu jest pod kontrolą mechanizmu uruchamianego w odpowiedzi na anion nadtlenny (CEREDA i współaut. 2009). Reaktywne formy tlenu modyfikujące białka sygnałowe i/lub czynniki transkrypcyjne mogą wpływać na ekspresję genów, w tym również rodanazy, co jest interesujące z punktu widzenia medycyny molekularnej i może mieć potencjalne znaczenie terapeutyczne (PINTO i współaut. 2006).

RODANAZA I TRANSFERAZA SIARKOWA 3-MERKAPTOPIROGRONIANU – EWOLUCYJNIE POKREWNE ENZYMY

Streszczenie

Endogenne związki siarki odgrywają ważną rolę w przebiegu wielu fizjologicznych procesów w organizmie, takich jak: stabilizacja struktury białek, regulacja aktywności enzymów oraz udział w procesach utleniania i redukcji (glutation, tioredoksyna). Transferazy siarkowe: rodanaza (transferaza siarkowa tiosiarczanu, EC 2.8.1.1) i transferaza siarkowa 3-merkaptopirogronianu (MPST, EC 2.8.1.2) są szeroko rozpowszechnionymi enzymami w świecie organizmów prokariotycznych i eukariotycznych. W komórkach ssaków MPST występuje w cytoplazmie i mitochondriach, zaś rodanaza głównie w mitochondriach. W przypadku niższych kręgowców takich jak: płazy, gady i ryby jej aktywność stwierdzono również w cytozolu. Rodanaza przenosi atomy siarki z anionowych donorów (związki zawierające siarkę sulfanową) na różne nukleofilowe akceptory. MPST katalizuje przeniesienie atomu siarki z 3-merkaptopirogronianu na nukleofilowe akceptory wytwarzając związki zawierające atomy siarki sulfanowej (jak np.: tiosiarczan) lub uwalnia ją w postaci siarkowodoru. Rodanaza i MPST są enzymami pokrewnymi ewolucyjnie. Świadczą o tym podobieństwa w strukturze genów, struktura trzeciorzędowej obydwu białek

oraz strukturze miejsca aktywnego. Masy cząsteczkowe obydwu enzymów są podobne – około 33 kDa. Ponadto, enzymy te mają podobne właściwości fizykochemiczne i katalityczne. Aktywność katalityczna obydwu zaangażowanych w przemiany L-cysteiny enzymów zależna jest od reszty cysteinowej centrum aktywnego. Podczas katalizy enzymy te oscylują pomiędzy dwoma stabilnymi stanami: niezwiązanym z atomem siarki i związanym z dwuwartościowym atomem siarki z utworzeniem nadsiarczku z grupą tiolową miejsca aktywnego. Związki chemiczne zanieczyszczające środowisko i ksenobiotyki mogą łączyć się z grupami -SH tych enzymów obniżając ich aktywność i zmieniając poziom siarki sulfanowej – produktu desulfuracji L-cysteiny. Cysteina miejsca aktywnego enzymów tiolowych może uczestniczyć w procesach utleniania i redukcji; MPST i rodanaza mogą funkcjonować jako miejscowe białkowe przeciwutleniacze. Reaktywne formy tlenu modyfikujące białka sygnałowe i/lub czynniki transkrypcyjne mogą wpływać na ekspresję genów, w tym również genu dla rodanazy, co ze względu na potencjalne terapeutyczne efekty może być interesujące z punktu widzenia medycyny molekularnej.

RHODANESE AND 3-MERCAPTOPYRUVATE SULFURTRANSFERASE – EVOLUTIONARY RELATED ENZYMES

Summary

Endogenous sulfur-containing compounds play an important role in numerous physiological processes in organisms, such as stabilization of protein structure, regulation of enzymatic activity, and they are engaged in redox reactions (glutathione, thioredoxine). Sulfurtransferases are enzymes widespread in nature. Rhodanese (thiosulfate sulfurtransferase, EC 2.8.1.1) and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST, EC 2.8.1.2) have been found in the majority of living organism. In animal cells, MPST is located in cytosol and mitochondria, while rhodanese distribution is restricted to mitochondria. In lower vertebrates, such as amphibians, reptiles and fish, it has been also detected in cytosol. Rhodanese transfers sulfur atoms from various donors (sulfane sulfur-containing compounds) to various acceptors. MPST catalyses the transfer of the sulfur atom from 3-mercaptopyruvate to various acceptors, producing sulfane sulfur containing compounds (e.g. thiosulfate), or releases it as hydrogen sulfide. Rhodanese and MPST are evolutionary related enzymes. Both of them have similar structure of gene, protein ter-

tiary structure and the structure of active site. Molecular weight is also comparable – about 33 kDa. Moreover, they have similar physicochemical and catalytic properties. The catalytic activity of these two enzymes participating in L-cysteine metabolism depends on cysteine residues in their active sites. During catalysis, enzymes cycle between two stable intermediates: a sulfur-free form and a sulfur-substituted enzyme containing a divalent sulfur atom bound by persulfide linkage to the sulfhydryl group of the active site. Pollutants and xenobiotics can bind to -SH groups and, therefore, lower the activity of enzymes and change the level of sulfane sulfur, a product of L-cysteine desulfuration. The catalytic site cysteine of a thiol enzyme is redox active; MPST and rhodanese could locally serve as antioxidant proteins. Reactive oxygen species modify signal proteins and/or transcription factors and have an impact on rhodanese gene expression. It is interesting from the point of view of molecular medicine because of potential therapeutic effects.

LITERATURA

- ADAMS H., TEERTSTRA W., KOSTER M., TOMMASSEN J., 2002. *PspE (phage-shock protein E) of Escherichia coli is a rhodanese*. FEBS Lett. 518, 173–176.
- AGBOOLA F. K., FAGBOHUNKA B. S., ADENUGA G. A., 2006. *Activities of thiosulphate and 3-mercaptopyruvate-cyanide-sulphurtransferases in poultry birds and fruit bat*. J. Biol. Sci. 6, 833–839.
- AITA N., ISCHII K., AKAMATSU Y., OGASAWARA Y., TANABE S., 1997. *Cloning and expression of human liver rhodanese cDNA*. Biochem. Biophys. Res. Com. 231, 56–60.
- ALPHEY M. S., WILLIAMS R. A., MOTTRAM J. C., COOMBS G. H., HUNTER W. N., 2003. *The crystal structure of Leishmania major 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase. A three-domain architecture with a serine protease-like triad at the active site*. J. Biol. Chem. 278, 48219–27. PDB ID: 1OKG (http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgibin/CSA/CSA_Site_Wrapper.pl?pdb=1OKG.)
- AL-QARAWI A. A., MOUSA H. M., ALI B. H., 2001. *Tissue and intracellular distribution of rhodanese and mercaptopyruvate sulfurtransferase in remnant and birds*. Vet. Res. 32, 63–70.
- AMINLARI A., GILANPOUR H., TAGHAVIANPOUR H., VESEGHİ T., 1989. *Comparative studies on the distribution of rhodanese and beta-mercaptopyruvate sulfurtransferase in different organs of sheep (Ovis aries) and cattle (Bos taurus)*. Comp. Biochem. Physiol. C 92, 259–262.
- AMINLARI M., KUNANITHY V., SCAMAN CH. H., 2002. *Rhodanese distribution in porcine (Sus scrofa) tissues*. Comp. Biochem. Physiol. Part B 132, 309–313.
- BASKIN S. I., PORTER D. W., ROCKWOOD G. A., ROMANO J. A., PATEL H. C., KISER R. C., COOK CH. M., TERNAY A. L., 1999. *In vitro and in vivo comparison of sulfur donors as antidotes to acute cyanide intoxication*. J. App. Toxicol. 19, 173–183.
- BILLAUT-LADEN I., RAT E., ALLORGE D., CRUNELLE-THIBAUT A., CAUFFIEZ C., CHEVALIER D., LO-GUIDICE J. M., BROLY F., 2006. *Evidence for a functional genetic polymorphism of the human mercaptopyruvate sulfurtransferase (MPST), a cyanide detoxification enzyme*. Toxicol. Lett. 165, 101–111.
- BOGGARAM V., HOROVITZ P., WATERMAN M. R., 1985. *Studies on rhodanese synthesis in bovine adrenocortical cells*. Biochem. Biophys. Res. Com. 130, 407–411.
- BONOMI F., PAGANI S., CERLETTI R.L., CANNELLA C., 1977. *Rhodanese-mediated sulfur transfer to succinate dehydrogenase*. Eur. J. Biochem. 72, 17–24.
- BONOMI F., PAGANI S., KURTZ D. M., 1985. *Enzymatic synthesis of the 4Fe-4S clusters of Clostridium pasteurianum ferredoxin*. Eur. J. Biochem. 148, 67–73.
- CEREDA A., CARPEN A., PICARIELLO G., TEDESCHI G., PAGANI S., 2009. *The lack of rhodanese Rhda affects the sensitivity of Azotobacter vinelandii to oxidative events*. Biochem. J. 418, 135–143.
- DUDEK M., FRENDO J., KOJ A., 1980. *Subcellular compartmentation of rhodanese and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in the liver of some vertebrate species*. Comp. Biochem. Physiol. 65B, 383–386.
- GLIUBICH F., GAZERRO M., ZANOTTI G., DELBONO S., BOMBIERI G., BERNI R., 1996. *Active site structural features for chemically modified forms of rhodanese*. J. Biol. Chem. 271, 21054–21061 (PDB ID: 2ORA).
- HARGROVE J. L., 1988. *Persulfide generated from L-cysteine inactivates tyrosine aminotransferase. Requirement for a protein with cysteine oxidase activity and gamma-cystathionase*. J. Biol. Chem. 263, 17262–17269.
- HARGROVE J. L., WICHMAN R. D., 1987. *A cysteine-dependant inactivator of tyrosine aminotransferase co-purifies with gamma-cystathionase (cysteine desulfurase)*. J. Biol. Chem. 262, 7351–7357.

- HARRIS C. L., 1978. *Mammalian tRNA sulfurtransferase: properties of the enzyme in rat liver*. Nucl. Acids Res. 5, 599–613.
- HÄNZELMANN P., DAHL J. U., KUPER J., URBAN A., MÜLER-THEISSEN U., LEIMKÜHLER S., SCHINDELIN H., 2009. *Crystal structure of YnjE from Escherichia coli, a sulfurtransferase with three rhodanese domains*. Protein Sci. 18, 2480–2491.
- HOL W. G., LIJK L. J., KALK K. H., 1983. *The high resolution Three-dimensional structure of bovine liver rhodanese*. Fund. Appl. Toxicol. 3, 370–376.
- HOROWITZ P., DE TOMA F., 1970. *Improved preparation of bovine liver rhodanese*. J. Biol. Chem. 245, 984–985.
- HOROWITZ P., CRISCIAMAGNA N. L., 1986. *Low concentrations of guanidinium chloride expose apolar surfaces and cause differential perturbation in catalytic intermediates of rodanese*. Biol. Chem. 261, 15652–15658.
- HUNT A., 1998. *Human DNA sequence from done E146D10 on chromosome 22 contains thiosulfate sulfurtransferase (EC 2.8.1.1) (rhodanese) genes*. Revised version, direct submission to GenBank/EBI Data Bank with accession number (HSE146D10).
- JAMSHIDZADEK A., AMINLARI M., RASEKH H.-R., 2001. *Rhodanese and arginase activity in normal and cancerous tissues of human breast, esophagus, stomach and lung*. Arch. Irn. Med. 4, 88–92.
- JURKOWSKA H., WRÓBEL M., 2008. *N-acetyl-L-cysteine as a source of sulfane sulfur in astrocytoma and astrocyte cultures: correlation with cell proliferation*. Amino Acids 34, 231–237.
- JURKOWSKA H., PLACHA W., NAGAHARA N., WRÓBEL M., 2011a. *The expression and activity of cystathionine γ -lyase and 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase in human neoplastic cell lines*. Amino Acids 41, 151–158.
- JURKOWSKA H., UCHACZ T., ROBERTS J., WRÓBEL M., 2011b. *Potential therapeutic advantage of ribose-cysteine in the inhibition of astrocytoma cell proliferation*. Amino Acids 41, 131–139.
- KATO A., OGURA M., SUDA M., 1966. *Control mechanism in rat liver enzyme system converting L-methionine to L-cystine. 3. Noncompetitive inhibition of cystathionine synthetase-serine dehydratase by elemental sulfur and competitive inhibition of cystathionase-homoserine dehydratase by L-cysteine and L-cystine*. J. Biochem. 59, 40–48.
- KESSLER D., 2006. *Enzymatic activation of sulfur for incorporation into biomolecules in prokaryotes*. Microbiol. Rev. 30, 825–840.
- KOHANSKI R. A., HEINRIKSON R. L., 1990. *Primary structure of avian hepatic rhodanese*. J. Protein Chem. 9, 369–377.
- KRUEGER K., KOCH K., JÜHLING A., TEPEL M., SCHOLZE A., 2010. *Low expression of thiosulfurtransferase (rhodanese) predicts mortality in hemodialysis patients*. Clin. Biochem. 43, 95–101.
- LANG K., 1933. *Die Rhodanbildung im Tierkörper*. Biochem. Z. 259, 243–256.
- MEISTER A., 1953. *Conversion of the α -keto analog cysteine to pyruvate and sulfur*. Fed. Proc. 12, 245.
- MEISTER A., FRASER P. E., TICE S. V., 1954. *Enzymatic desulfuration of beta-mercaptopyruvate to pyruvate*. J. Biol. Chem. 206, 561–575.
- NAGAHARA N., 2011. *Catalytic site cysteine of thiol enzyme, sulfurtransferase*. J. Amino Acids, 2011, 1–7.
- NAGAHARA N., NISHINO T., 1996. *Role of amino acid residues in the active site of rat liver mercaptopyruvate sulfurtransferase*. J. Biol. Chem. 271, 27395–27401.
- NAGAHARA N., KATAYAMA A., 2005. *Post-translation regulation of mercaptopyruvate sulfurtransferase via a low redox potential in the maintenance of redox homeostasis*. J. Biol. Chem. 280, 34569–34576.
- NAGAHARA N., OKAZAKI T., NISHINO T., 1995. *Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionary related to mitochondrial rhodanese. Striking similarity in active site amino acid sequence and the increase in the mercaptopyruvate sulfurtransferase activity of rhodanese by site-directed mutagenesis*. J. Biol. Chem. 270, 16230–16235.
- NAGAHARA N., ITO T., KIMURA H., NISHINO T., 1998. *Tissue and subcellular distribution of mercaptopyruvate sulfurtransferase in the rat: confocal laser fluorescence and immunoelectron microscopic studies combined with biochemical analysis*. Histochem. Cell Biol. 110, 243–250.
- NAGAHARA N., ITO T., MINAMI M., 1999. *Mercaptopyruvate sulfurtransferase as a defense against cyanide toxication: molecular properties and mode of detoxication*. Histol. Histopathol. 14, 1277–1286.
- NAGAHARA N., SAWADA N., NAKAGAWA T., 2004. *Affinity labeling of catalytic site, cysteine 247, in rat mercaptopyruvate sulfurtransferase by chloropyruvate as an analog of a substrate*. Biochemistry 86, 723–729.
- NAGAHARA N., YOSHII T., ABE Y., MATSUMURA T., 2007. *Thioredoxin-dependant enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase. An inter-subunit disulfide bond severs as a redox switch for activation*. J. Biol. Chem. 282, 1561–1569.
- NAGASAWA H. T., GOON D. J., CRANKSHAW D. L., VINCE R., PATTERSON S. E., 2007. *Novel, orally effective cyanide antidotes*. J. Med. Chem. 50, 6462–6464.
- NANDI D. L., HOROWITZ P. M., WESTLEY J., 2000. *Rhodanese as a thioredoxin oxidase*. Internat. J. Biochem. Cell Biol. 32, 465–473.
- NISHINO T., 1985. *Reversible interconversion between sulfo and desulfo xanthine dehydrogenase*. Adv. Exp. Med. Biol. 195, 259–262.
- NISHINO T., USAMI C., TSUSHIMA K., 1983. *Reversible interconversion between sulfo and desulfo xanthine oxidase in a system containing rhodanese, thiosulfate, and sulfhydryl reagent*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1826–1829.
- OGASAWARA Y., ISODA S., TANABE S., 1994. *Tissue and subcellular distribution of bound and acid-labile sulfur, and the enzymic capacity for sulfide production in the rat*. Biol. Pharm. Bull. 17, 1535–1542.
- OGASAWARA Y., SUZUKI T., ISHII K., TANABE S., 1997. *Modification of liver cytosol enzyme activities promoted in vitro by reduced sulfur species generated from cystine with gamma-cystathionase*. Biochem. Biophys. Acta 1334, 33–43.
- OGASAWARA Y., LACOURCIERE G. M., ISHII K., STADTMAN T. C., 2005. *Characterization of potential selenium-binding proteins in the selenophosphate synthetase system*. PNAS 102, 1012–1016.
- PALENCHAR P. M., BUCK C. J., CHENG H., LARSON T. J., MUELLER E. G., 2000. *Evidence that ThiI, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate*. J. Biol. Chem. 275, 8283–8286.
- PALLINI R., GUZZI G. C., CANNELLA C., CACACE M. G., 1991. *Cloning and sequence analysis of the human liver rodanese: comparison with bovine and chicken enzymes*. Biochem. Biophys. Res. Com. 180, 887–893.
- PINTO J. T., KRASNIKOV B. F., COOPER A. J. L., 2006. *Redox-sensitive proteins are potential targets of*

- garlic-derived mercaptocysteine derivatives. *J. Nutr.* 136, 835S-841S.
- PLOEGMAN J. H., DRENT G., KALK K. H., HOL W. G., 1978. *Structure of bovine liver rhodanese. I. Structure determination at 2.5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains.* *J. Mol. Biol.* 123, 557-594.
- PORTER D. W., BASKIN S. I., 1995. *Specificity studies of 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase.* *J. Biochem. Toxicol.* 10, 287-292.
- RAMASAMY S., SINGH S., TANIÈRE P., LANGMAN M. J. S., EGO M. C., 2006. *Sulfide-detoxifying enzymes in the human colon are decreased in cancer and upregulated in differentiation.* *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G288-G296.
- SABELLI R., IORIO E., DE MARTINO A., PODO F., RICCI A., VITICCHIE G., ROTILIO G., PACI M., MELINO S., 2008. *Rhodanese – thioredoxin system and allyl sulfur compounds.* *FEBS J.* 275, 3884-3899.
- SHAHBAZKIA H. R., AMINLARI M., TAVANA M., 2009. *Distribution of the enzyme rhodanese in tissues of the cat (Felis catus).* *J. Feline Med. Surg.* 11, 305-308.
- SHIBUYA N., MIKAMI Y., KIMURA Y., NAGAHARA N., KIMURA H., 2009. *Vascular endothelium expresses 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase and produces hydrogen sulfide.* *J. Biochem.* 146, 623-626.
- SINGLETON D. R., SMITH D. W., 1988. *Improved assay for rhodanese in Thiobacillus spp.* *Environm. Microbiol.* 54, 2866-2867.
- SMIRNOV A., COMTE C., MARGER-HECKEL A. M., ADDIS V., KRASHENINNIKOV I. A., MARTIN R. P., ENTELIS N., TARASSOV I., 2010. *Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5S ribosomal RNA import into human mitochondria.* *J. Biol. Chem.* 285, 30792-30803.
- SÖRBO B., 1953. *Crystalline rhodanese. Purification and physico-chemical examination.* *Acta Chem. Scand.* 7, 1129-1136.
- SÖRBO B., 1957. *Sulfite and complex-bound cyanide as sulfur acceptors for rhodanese.* *Acta Chem. Scand.* 33, 267-269.
- SÖRBO B., 1960. *On the mechanism of sulfide oxidation in biological systems.* *Biochem. Biophys. Acta* 38, 349-351.
- SPALLAROSSA A., FORLANI F., CARPEN A., ARMIROTTI A., PAGANI S., BOLONGESI M., BORDO D., 2004. *The 'rhodanese' fold and catalytic mechanism of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferases: crystal structure of SseA from Escherichia coli.* *J. Mol. Biol.* 335, 583-593.
- SURA P., WRÓBEL M., BRONOWICKA P., 2006. *Season Dependent Response of the Marsh Frog (Rana ridibunda) to cadmium exposure.* *Folia Biol.* 54, 159-165.
- SURA P., BRONOWICKA-ADAMSKA P., FURTAK E., WRÓBEL M., 2011. *Effect of mercury ions on cysteine metabolism in Xenopus laevis tissues.* *Comp. Biochem. C. Physiol. Toxicol. Pharmacol.* 154, 180-186.
- TANABE S., 2008. *Development of assay methods for endogenous inorganic sulfur compounds and sulfurtransferases as evaluation of the physiological functions of bound sulfur.* *Yakugaku Zasshi* 128, 881-900.
- THOMAS D., SURDIN-KERJAN Y., 1997. *Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae.* *Microbiol. Molecular. Biol. Rev.* 61, 503-532.
- TOOHEY J. I., 1989. *Sulphane sulfur in biological systems: a possible regulatory role.* *Biochemistry* 264, 625-632.
- UBUKA T., 2002. *Assay methods and biological roles of labile sulfur in animal tissues.* *J. Chromatogr. B.* 781, 227-249.
- UBUKA T., HOSAKI Y., NISHINA H., IKEDA T., 1985. *3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase activity in guinea pig and rat tissues.* *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR* 17, 41-43.
- VILLAREJO M., WESTLEY J., 1963. *Mechanism of rodanese catalysis of thiosulfate-lipoate oxidation-reduction.* *J. Biol. Chem.* 238, 4016-4020.
- WESTLEY J., 1973. *Rhodanese.* *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biol.* 39, 327-368.
- WESTLEY J., 1977. *Sulfane-transfer catalysis by enzymes.* *Bioorg. Chem.* 1, 371-390.
- WESTLEY J., 1980. *Rhodanese and the sulfane pool.* [W:] *Enzymatic basis of detoxification.* JACOBY W.B. (red.) Academic Press, New York 2, 246-262.
- WESTLEY J., ADLER H., WESTLEY L., NISHIDA C., 1983. *The sulfurtransferases.* *Fundam Appl. Toxicol.* 3, 377-382.
- WILLIAMS R. A. M., KELLY S. M., MOTTRAM J. C., COOMBS G. H., 2003. *3-mercaptopyruvate sulfurtransferase of Leishmania contains an unusual C-terminal extension and is involved in thioredoxin and antioxidant metabolism.* *J. Biol. Chem.* 278, 1480-1486.
- WING D. A., BASKIN S. I., 1992. *Modifiers of mercaptopyruvate sulfurtransferase catalyzed conversion of cyanide to thiocyanate in vitro.* *J. Biochem. Toxicol.* 7, 65-72.
- WONG T. W., HARRIS M. A., JANKOWICZ C. A., 1974. *Transfer ribonucleic acid of sulfurtransferase isolated from rat cerebral hemispheres.* *Biochemistry* 13, 2805-2812.
- WONG T. W., HARRIS M. A., MORRIS H. P., 1975. *The presence of an inhibitor of RNA sulfurtransferase in Morris hepatomas.* *Biochem. Biophys. Res. Com.* 65, 1137-1145.
- WOOD J. L., FIELDER H., 1953. *β-Mercaptopyruvate, a substrate for rhodanese.* *J. Biol. Chem.* 205, 231-234.
- WRÓBEL M., 2000. *Comparative study on physiological roles of enzymes that participate in sulfane sulfur production and metabolism in animal tissues.* Rozprawa habilitacyjna, Jagiellonian University Press, Kraków.
- WRÓBEL M., JURKOWSKA H., ŚLIWA L., SREBRO Z., 2004. *Sulfurtransferases and cyanide detoxification in mouse liver, kidney and brain.* *Toxicol. Mech. Method.* 14, 331-337.
- WRÓBEL M., JURKOWSKA H., 2007. *Menadione effect on L-cysteine desulfuration in U373 cells.* *Acta Biochim. Pol.* 54, 407-411.
- YAMANISHI T., KUBOTA I., TUBOI S., 1983. *Mechanism of the activation of delta-aminolevulinic synthetase in Rhodopseudomonas spheroides by rat liver mitochondrial function.* *J. Biochem.* 94, 181-188.