

## Zusammenfassung

Die Molybdän-Cofaktor (Moco)-Biosynthese ist ein hoch konservierter, mehrstufiger Prozess mit drei Reaktionsintermediaten: cyclisches Pyranopterin-Monophosphat (cPMP), Molybdopterin (MPT) und MPT-AMP. Im Menschen wird der erste Schritt - die cPMP Synthese aus GTP - von zwei Proteinen MOCS1A und MOCS1AB katalysiert, die von einem bicistronischen Gen kodiert werden und alternativem Spleißen unterliegen.

Die Funktion des alternativen Spleißens von *MOCS1* ist wenig verstanden, so dass sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Charakterisierung der MOCS1-Spleißvarianten auf funktionaler und zellulärer Ebene befasst. Es wurden zwölf verschiedene MOCS1-Proteine kombinatorisch aus vier Exon 1- und drei Exon 9/10-Varianten erzeugt und analysiert. Rekonstitutionsstudien in *E. coli moaA*- und *moaC*-Mutanten konnten MOCS1A-Aktivität für die REISS-, GROSSHARDT- und LARIN-Varianten zeigen, wohingegen alle Typ II- und III-Varianten unabhängig von ihrer N-terminalen Zusammensetzung MOCS1B-Aktivität aufwiesen. In COS7-Zellen zeigten alle MOCS1AB-Proteine mitochondriale Lokalisierung mit einer Assoziation an die innere Membran. Im Gegensatz dazu wiesen nur LARIN und ARENAS MOCS1A eine mitochondriale Lokalisierung auf, während REISS und GROSSHARDT Aggregatbildung außerhalb der Mitochondrien zeigten. Der Import in die Mitochondrien wird für MOCS1A-Proteine über ein N-terminales Matrixsignal, bestehend aus den ersten 22 Resten kodiert durch Exons 1a, oder im Falle der MOCS1AB-Proteine über ein internes Signalsequenz-ähnliches Motiv und einer putativen Transmembrandomäne in Exon 10 vermittelt.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der humanen Moco-Defizienz (MoCD). Zuerst wurden vier neue Mutationen der humanen MPT-Synthase (MOCS2) mittels Isothermaler Titrationskalorimetrie, CD-Spektroskopie und Aktivitätsmessungen der *in vitro* assemblierten MPT-Synthase charakterisiert. Die Substitutionen von S15R und I82F in MOCS2A resultierten in einer Beeinträchtigung der Sekundärstruktur, die für S15R zum nahezu vollständigen Funktionsverlust, für I82F in der Störung der Heterodimer-Bildung mit MOCS2B und damit einem teilweisen Funktionsverlust führte. Die Substitution L19F in MOCS2B liegt in einem nicht konservierten Bereich, so dass kein Effekt aufgezeigt werden konnte. Im Gegensatz dazu interferiert in S140F der Phenylalaninrest mit der Homodimerisierung von MOCS2B, was den beobachteten Aktivitätsverlust erklärt.

Abschließend wurden die molekularen Grundlagen der MoCD untersucht. Es wird vermutet, dass Sulfit der hauptsächlich akkumulierende toxische Metabolit der MoCD ist; daher wurde dessen Einfluss auf die mitochondriale Morphologie und Funktion untersucht. Die Applikation geringer Sulfitkonzentrationen auf Wildtyp-Fibroblasten resultierte dabei in einer Stress-induzierten Hyperfusion, wohingegen hohe Sulfitkonzentrationen zur mitochondrialen Fragmentierung führten. Die Sulfit-induzierte Reduktion der mitochondrialen Respiration, hervorgerufen durch eine Inhibition der Glutamatdehydrogenase, was vermutlich durch die Bindung des Sulfit-abhängigen Metaboliten S-Sulfocystein vermittelt wird, wurde als Hauptursache der mitochondrialen Dysfunktion in der MoCD identifiziert.

## Abstract

Molybdenum cofactor (Moco) biosynthesis is a highly conserved multi-step pathway that involves three different intermediates: cyclic pyranopterin monophosphate (cPMP) molybdopterin (MPT) and MPT-AMP. In humans, the first step of Moco biosynthesis - the conversion of GTP into cPMP - is catalyzed by two proteins: MOCS1A and MOCS1AB, which are encoded by a bicistronic gene undergoing alternative splicing. The functional significance of *MOCS1* splicing is still poorly understood.

The first part of this work focused on the characterization of *MOCS1* splice variants on functional and cellular level. Therefore, twelve MOCS1 variants comprising all combinations of four exon 1 splice variants with three exon 9/10 variants were analyzed. Using *E. coli moaA* and *moaC* mutant strains, MOCS1A activity could be shown for REISS, GROSSHARDT and LARIN variants, whereas all MOCS1AB (type II and III variants) fusion proteins showed MOCS1B activity independent from their N-terminal variation. In COS7 cells, all MOCS1AB proteins exhibited mitochondrial localization with an association to the inner membrane. In contrast, only LARIN and ARENAS MOCS1A variants were localized in mitochondria, whereas REISS and GROSSHARDT variants showed aggregate formation outside mitochondria. Therefore, two signals mediating the mitochondrial import of MOCS1 proteins were identified: one classical N-terminal matrix targeting signal consisting of the first 22 residues encoded by exon 1a and one internal pre-sequence motif located in exon 10, which together with a putative trans-membrane domain ensures translocation of MOCS1A and MOCS1AB proteins into mitochondria, respectively.

The second part of this work focused on the characterization of Moco deficiency (MoCD). First, four novel mutations of human MPT-synthase (MOCS2) were characterized using isothermal titration calorimetry, CD-spectroscopy and activity measurements of *in vitro* assembled enzyme. Individual substitutions of S15R and I82F residues in MOCS2A resulted in a disruption of the secondary structure, which for S15R led to an almost complete loss of function. For I82F the interaction of MOCS2A with MOCS2B was impaired, resulting in a partial loss of activity. L19F substitution in MOCS2B had no effect due to its location in a non-conserved area, while S140F substitution affected the dimer interface of two MOCS2B subunits, resulting in loss of activity.

Finally, the molecular basis of MoCD was investigated. Given that sulfite is believed to be the major accumulating toxic metabolite in MoCD, its impact on mitochondrial morphology and function was analyzed. Low sulfite levels led to a stress-induced mitochondrial hyperfusion in cultured wildtype fibroblasts, whereas application of high sulfite concentrations resulted in mitochondrial fragmentation. Sulfite-reduced mitochondrial respiration by inhibition of glutamate dehydrogenase, which is presumably accomplished by the binding the sulfite-derived metabolite S-sulfocysteine, was found to be the major cause of mitochondrial dysfunction.