

ABSTRACT

Skeletal muscle tissue is essential for locomotion and plays a central role in whole body metabolism and homeostasis. It provides the largest protein reservoir and can release amino acids on demand, for example in response to nutrient starvation. The proteolysis in skeletal muscle is primarily mediated by the ubiquitin-proteasome system (UPS) and activation of autophagy. The UPS is based on the selective ubiquitination of target molecules through ubiquitin ligases (E1-E3), leading to their degradation via the proteasome. During the autophagy process, a portion of the cytoplasm, including protein aggregates and organelles, is engulfed by autophagosomes, which then fuse to lysosomes, inducing degradation of the protein contents by proteases. Dysregulation of autophagy is implicated in a variety of diseases including autophagic vacuolar myopathies (AVMs) and multisystem proteinopathies (MSPs). Many of those pathologies are characterized by muscle weakness, caused by the accumulation of protein aggregates and damaged mitochondria in skeletal muscle.

The main focus of this thesis is the characterization of the methyltransferases METTL21C and METTL21E, which appear to be involved in the regulation of protein degradation. They belong to the methyltransferase family 16 (MTF16), whose members preferentially target molecular chaperones. Both methyltransferases are mainly expressed in skeletal muscle tissue and fiber type-specific analyses revealed, that METTL21C is restricted to MYH7-positive fibers (slow type I fibers) whereas METTL21E is restricted to MYH4-positive fibers (fast type IIb fibers).

The ablation of METTL21C in mice resulted in reduced running capacity, led to age-dependent accumulation of autophagic vacuoles and induced an upregulation of *Mettl21e* expression in skeletal muscles. Since METTL21C and METTL21E share high sequence homology, they might have redundant functions. Accordingly, it was demonstrated, that both methyltransferases can trimethylate the ATPase p97 at a lysine residue on position 315. p97 is involved in protein degradation via the UPS and autophagy and was further found to be mutated in various human MSP conditions. Several approaches to investigate the functional relevance of the p97 trimethylation showed that reduced trimethylation of K315 disturbs the p97 hexamer formation and decreases the ATPase activity. Moreover, experimental data indicate that the trimethylation affects protein-protein-interaction, subcellular localization and substrate selectivity of p97.

p97 was also shown to play a critical role in muscle atrophy. Denervation-induced muscle atrophy in *Mettl21c*^{-/-} mice highlighted a blockage of the autophagic flux as indicated by failed induction of LC3, p62 and cathepsin.

In conclusion, this thesis provides evidence, that the methyltransferases METTL21C and METTL21E are important fiber type-specific modulators of the protein degradation

machinery in skeletal muscle. This is likely mediated by the METTL21C- and METTL21E-dependent trimethylation of p97 and provides a novel post-translational modification (PTM)-based mechanism to modulate p97 activity.

ZUSAMMENFASSUNG

Skelettmuskeln sind essentiell für die Fortbewegung und spielen eine wichtige Rolle für Stoffwechsel und Homöostase im gesamten Körper. Sie stellen den größten Protein-Speicher dar und können nach Bedarf Aminosäuren liefern, z.B. während Nährstoffmangels. Die Proteolyse im Skelettmuskel basiert hauptsächlich auf dem Ubiquitin-Proteasom System (UPS) und der Autophagie. Das UPS beruht auf der selektiven Ubiquitinierung von Molekülen durch Ubiquitin Ligasen (E1-E3) und führt zum Proteinabbau durch das Proteasom. Während des Autophagie Prozesses wird ein Teil des Cytoplasmas, mitsamt Proteinaggregaten und ganzen Zellorganellen von Autophagosomen eingeschlossen. Diese fusionieren dann mit Lysosomen, was den Abbau des gesamten Inhalts durch Proteasen auslöst. Die Dysregulation der Autophagie ist mit verschiedenen Krankheitsbildern, einschließlich Autophag-Vakuoläre Myopathien (AVMs) und Multisystem Proteinopathien (MSPs), assoziiert. Viele dieser Pathologien weisen sich durch eine Anreicherung von Proteinaggregaten und beschädigten Mitochondrien in Skelettmuskeln aus, was zu charakteristischer Muskelschwäche führt.

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Methyltransferasen METTL21C und METTL21E, die eine Rolle in der Regulation des Proteinabbaus zu spielen scheinen. Sie gehören zur Methyltransferase Familie 16 (MTF16), deren Mitglieder bevorzugt molekulare Chaperone methylieren. Beide Methyltransferasen werden hauptsächlich im Skelettmuskel exprimiert und Fasertyp-spezifische Analysen zeigten, dass METTL21C in MYH7-positiven Fasern (langsame Typ I Fasern) und METTL21E in MYH4-positiven Fasern (schnelle Typ IIb Fasern) exprimiert wird.

Der Verlust von METTL21C in Mäusen führte zu reduzierter Laufausdauer und altersbedingter Ansammlung von Autophagie-Vakuolen im Skelettmuskel. Des Weiteren konnte ein Anstieg der *Mettl21e* Expression in *Mettl21c*^{-/-} Muskeln beobachtet werden und lässt aufgrund ihrer hohen Sequenzhomologie eine redundante Funktion vermuten. Folglich konnte gezeigt werden, dass beide Methyltransferasen die ATPase p97 an einem Lysin an Position 315 trimethylieren können. p97 ist sowohl im UPS als auch in der Autophagie involviert und p97-assoziierte Mutationen wurden in diversen humanen MSP Konditionen gefunden. Verschiedene genetische und biochemische Methoden wurden verwendet, um die Funktion der p97 Trimethylierung näher zu untersuchen, und es konnte gezeigt werden, dass eine reduzierte Trimethylierung an K315 in einer Störung der Bildung von p97 Hexameren resultiert und die ATPase Aktivität reduziert. Weiterhin beeinflusst die Trimethylierung die Protein-Protein-Interaktion, subzelluläre Lokalisation und Substratselektivität von p97 im Muskelgewebe.

p97 spielt außerdem eine wichtige Rolle während der Muskelatrophie. Muskelatrophie in *Mettl21c*^{-/-} Mäusen, ausgelöst durch Denervierung, zeichnete sich durch eine Blockade in der Autophagie aus und wurde durch die fehlende Induktion von LC3, p62 und Kathepsinen belegt.

Schlussfolgernd liefert diese Doktorarbeit Hinweise, dass die Methyltransferasen METTL21C und METTL21E wichtige Fasertyp-spezifische Modulatoren des Proteinabbaus im Skelettmuskel sind. Diese Funktion basiert vermutlich auf der METTL21C- und METTL21E-abhängigen Trimethylierung von p97 und stellt damit einen neuen Mechanismus zur Regulation der p97 Aktivität dar, der auf einer post-translationalen Modifikation (PTM) basiert.