

Zusammenfassung

Der Molybdän-Cofaktor (Moco) wird in einem hoch konservierten Stoffwechselweg synthetisiert. In dem ersten und komplexesten Schritt der Moco-Biosynthese wird Guanosintriphosphat durch die MOCS1A und MOCS1AB Proteine zu cyclischem Pyranopterin-Monophosphat (cPMP) umgewandelt. MOCS1A und MOCS1AB werden dabei beide von *MOCS1* codiert und abhängig von dem Spleißen von Exon 9 werden MOCS1A oder MOCS1AB Proteine translatiert, während der Einfluss von Spleißen von Exon 1 auf MOCS1 Proteine nicht bekannt ist. Mutationen die Moco-Defizienz (MoCD) Typ A, eine sehr seltene erbliche Stoffwechselerkrankung, hervorrufen sind für beide MOCS1 Proteine bekannt. Patienten die an MoCD leiden zeigen schnell fortschreitende, schwerwiegende Neurodegeneration und Krämpfe, was unbehandelt meist zum Tod in der frühen Kindheit führt.

Zu Beginn dieser Arbeit wird ein untypisch milder Fall von MoCD untersucht, bei dem trotz einer schwerwiegenden Mutation eine verbleibende Moco-Biosynthese nachgewiesen werden konnte (1%). Der Patient exprimiert ein separates aber aktives MOCS1B Protein, durch eine Kozak-Sequenz, hervorgerufen durch die Mutation (c.1338delG). Jedoch werden nur sehr geringe Mengen an MOCS1B exprimiert, die zu einer geringen aber nicht ausreichenden Synthese von Moco führten.

Bei der nachfolgenden Untersuchung zur MoCD Typ A Häufigkeit wurden 267 genetische Varianten von *MOCS1* mit unbekannter Pathogenität aus dem *Exome Aggregation Consortium* extrahiert. Das diese Varianten eine epidemiologische Hürde darstellen wurde folglich deren Potential MoCD zu verursachen mit einer neuartigen iterativen Strategie untersucht, welche sowohl *machine learning* Vorhersagen als auch biochemische Funktionsanalysen beinhaltet. Letztendlich konnten so sowohl acht neue, pathogene *Missense*-Varianten identifiziert werden, als auch die Häufigkeit von MoCD Typ A mit 1/341,690 bis 1/411,187 bestimmt werden. Folglich stellt MoCD Typ A eine unterdiagnostizierte Krankheit dar, bei der die meisten Patienten aufgrund mangelnden Bewusstseins gegenüber MoCD nicht erkannt werden.

Der letzte Teil dieser Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen von alternative Spleißen auf MOCS1 Proteine. Die Bestimmung der zellulären Lokalisation von MOCS1A Proteinen zeigte Import in die mitochondriale Matrix durch Exon 1a, während MOCS1AB Proteine durch ein internes Signal dorthin gelangen, welches dabei proteolytisch geschnitten wird. Die MOCS1B-Domäne und MOCS1A folgen also unterschiedlichen Translokationswegen, durch die sie in die mitochondriale Matrix importiert werden, in der sie cPMP synthetisieren. Dabei überschreibt Exon 9 Spleißen das von Exon 1. Dies beschreibt einen neuartigen, alternativen Spleiß-Mechanismus, der eine koordinierte Translokation von zwei separaten, aber funktionell zusammenhängenden mitochondrialen Proteinen von einem einzelnen Gen sicherstellt.

Summary

Molybdenum cofactor (Moco) biosynthesis is a highly conserved ancient pathway present in all kingdoms of life comprising three major steps. In humans, in the first and most complex sequence of chemical rearrangements, guanosine triphosphate is converted to cyclic pyranopterin monophosphate (cPMP) by the actions of MOCS1A and MOCS1AB proteins. Both proteins are encoded by *MOCS1* producing either bicistronic or monocistronic transcripts resulting in MOCS1A or MOCS1AB proteins, dependent on alternative splicing of *MOCS1* exon 9, while alternative splicing of exon 1 remained elusive. Genetic variants affecting either *MOCS1* variant have been reported to cause Moco deficiency (MoCD) type A, a recessive inborn error of metabolism. The incidence of MoCD is considered as ultra-rare so far, yet it has been proposed recently that MoCD is an underdiagnosed disease. Most patients suffering from MoCD display fast progressing, severe neurodegeneration and seizures, leading to death in early childhood when untreated, yet milder disease progressions have been observed.

Here an atypical mild case of MoCD caused by a severe frameshift mutation was analyzed, displaying no seizures with residual Moco biosynthetic activity (1%). While the patient expressed a separate yet functional yet cryptic MOCS1B protein by a Kozak sequence derived from the mutation (c.1338delG), only very low amounts of MOCS1B were expressed thus resulting in residual but not sufficient Moco synthesis. Overall this patient case exemplified the heterogeneity of MoCD pathology contributing to the complexity in the diagnosis of MoCD.

Investigating the incidence of MoCD type A, *MOCS1* genetic variants were retrieved from the Exome Aggregation Consortium revealing 267 variants of unknown significance. Therefore the potential of these variants to cause MoCD was assessed to overcome the epidemiological burden of such variants using a novel iterative machine learning prediction and biochemical validation strategy. This ultimately led to the identification of eight novel pathogenic missense variants and a MoCD type A disease incidence of 1/341,690 to 1/411,187. In conclusion, MoCD type A represents a severely underdiagnosed disease, with the striking majority of patients not recognized due to the generally low awareness of MoCD.

In the last part of this thesis, the effects of alternative splicing on *MOCS1* proteins was investigated. By cellular localization studies of alternatively spliced *MOCS1A* proteins, exon 1a was identified to facilitate mitochondrial matrix import. *MOCS1AB* proteins on the other hand were translocated to the matrix via an internal signal in *MOCS1B*, inducing *MOCS1AB* proteolytic cleavage. As a result, the former *MOCS1B*-domain and the separately expressed *MOCS1A* were shown to arrive following different translocation routes in the mitochondrial matrix, where they catalyze cPMP synthesis. Exon 9 splicing overrides exon 1-dependent translocation, providing a novel mechanism of alternative splicing ensuring coordinated targeting of two separate, functionally connected mitochondrial proteins from one single gene.