

Molekulare Konsequenzen der Methionin-Restriktion

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

Im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie, Geographie
und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Roman Abrosimov

geb. in Waldaj, Russische Föderation

Mainz, 2025

1.Berichtserstatter:

2.Berichtserstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich Abrosimov Roman, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel:

Molekulare Konsequenzen der Methionin-Restriktion

selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel (dazu zählen auch KI-basierte Anwendungen oder Werkzeuge*) benutzt habe. Sämtliche wörtlichen oder sinngemäßen Übernahmen und Zitate sind kenntlich gemacht und nachgewiesen (dies gilt auch für Texte, die durch generative KI, wie Chat GPT erzeugt wurden). Ich versichere, dass ich keine Hilfsmittel verwendet habe, deren Nutzung die Prüferin oder der Prüfer explizit ausgeschlossen hat.

Im Anhang „Nutzung KI-Tools“ habe ich die verwendeten KI-Tools dokumentiert.

Mit Abgabe der vorliegenden Leistung übernehme ich die Verantwortung für das eingereichte Gesamtprodukt. Ich verantworte damit auch jegliche KI-generierten Inhalte, die ich in meine Arbeit übernommen habe. Die Richtigkeit übernommener (KI-generierter) Aussagen und Inhalte habe ich nach bestem Wissen und Gewissen geprüft.

Mir ist bekannt, dass ein Verstoß gegen die genannten Punkte prüfungsrechtliche Konsequenzen hat und insbesondere dazu führen kann, dass die Promotionsleistung als mit „nicht bestanden“ bewertet wird. Die Einschreibung kann für bis zu zwei Jahre widerrufen werden, wenn Studierende zweimal oder häufiger bei Prüfungsleistungen täuschen (§ 69 Abs. 4 und 5 HochSchG).

Ort, Datum und Unterschrift

Contents

1. Einleitung.....	9
1.1 Methionin als Aminosäure	9
1.2 Methionin-Stoffwechsel	9
1.3 S-Adenosylmethionin (SAM)	12
1.4 Cystein und Methionin	16
1.5 Methionin-Restriktion	17
2. Zielsetzung der Arbeit	23
3. Material	24
3.1 Gewebe.....	24
3.2 Chemikalienliste	24
3.3 Liste der Geräte	25
3.4 Puffer und Lösungen für die Proteinanalytik	26
3.5 Liste der Antikörper und rekombinanter Proteine.....	28
3.6 Liste der verwendeten EDV-Programme und Datenbanken	29
4. Methoden.....	30
4.1 Nasschemische Methoden	30
4.1.1 Vorbereitung von Gewebe für Proteinanalytik	30
4.1.2 Proteinbestimmung.....	30
4.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	30
4.1.4 Western Blot und Immunodetektion	30
4.1.5 Antikörper-Sensitivitäts-Test.....	31
4.1.6 PIMT-Isoaspartat-Reparatur-Assay	32
4.2 Bioinformatische Methoden	33
4.2.1 Datenerfassung publizierter Datensätze.....	33
4.2.2 Auswertung der Massenspektrometrie.....	35
4.3 Statistik.....	36
5. Ergebnisse.....	37
5.1 Identifizierung neuer möglichen Ursachen des MetR-Phänotyps mittels Analyse von Transkriptomdaten.....	37
5.2 Inhibition des Komplex I als mögliche Ursache der metabolischen Insuffizienz bei MetR	49
5.3 Nass-chemische Analytik des Komplex I als primäre Ursache für den Phänotyp von Methionin- Restriktion	55
5.4 Massenspektrometrie	64
5.4.1 Nachweis der Modifikation am D51 des ND1-Peptids	64
5.4.2 Allgemeine Expressionsunterschiede im Proteom durch Methionin-Restriktion.....	69
5.4.3 Das Deamidierungsmuster am Complex I	75

6. Diskussion.....	77
6.1 Eine mutmaßliche Komplex I-Inhibition erklärt die transkriptomischen Veränderungen bei MetR.....	77
6.2 Eine mutmaßliche Komplex I-Inhibition erklärt die metabolischen Veränderungen bei MetR..	79
6.2.1 NADPH-FADH ₂ -Achse ist zirkadian und räumlich getrennt	80
6.2.2 Transport der Metaboliten zwischen betroffenen Geweben	82
6.2.3 Endokrine Steuerung der NADPH-FADH ₂ -Achse	83
6.3 iso-Asp-Bildung als eine Ursache der Komplex I-Hemmung in der MetR	84
6.4 Könnte Komplex I- Isoaspartatbildung eine Ursache für diverse Krankheiten darstellen?	93
7. Zusammenfassung.....	95
8. Summary.....	96
9. Literatur	97
10. Anhang.....	113

Abbildung 1: Überblick der verschiedenen Reaktionen des Methionins im Organismus.....	10
Abbildung 2: Übersichtsreaktion der Synthese von SAM aus Methionin.	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Methionin-Bergungsweges.....	12
Abbildung 4: Der Stoffwechsel des Methionins, SAM und SAH.	14
Abbildung 5: Übersicht den Abbau von Methionin durch die Methionin-γ-Lyase.....	20
Abbildung 6: Schnittvorlage für die Massenspektrometrie aus einem Blue-Native Gel.....	35
Abbildung 7: Betroffene Kompartimente durch eine Langzeit-MetR.	38
Abbildung 8: a) Ein funktionell prominenter Cluster aus signifikant erhöhten Genen, die zur mitochondrialen Qualitätskontrolle gehören.	39
Abbildung 9: Hauptkomponentenanalyse der vier untersuchten Transkriptom-Datensätze.....	39
Abbildung 10: Heatmap-Darstellung aller Gene, die in vier von vier Studien signifikant differentiell reguliert waren.....	40
Abbildung 11: Heatmap-Darstellung aller Gene, die in mindestens drei von vier Studien signifikant anders reguliert waren.	41
Abbildung 12: STRING-Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk-Analyse der MetR-induzierten Veränderungen in der Leber.	42
Abbildung 13: NAD ⁺ -unabhängiger Glukoseabbau.	50
Abbildung 14: Repräsentation der zentralen Veränderungen in der Genexpression und Metabolitenkonzentration, induziert durch Methioninrestiktion in vivo.....	53
Abbildung 15: Western Blots verschiedener Untereinheiten der Atmungskette.....	56
Abbildung 16: Western Blots verschiedener Untereinheiten der Atmungskette.....	56
Abbildung 17: Die zentrale Lage der mt-ND1 Untereinheit (cyan) im Komplex I (gelb).	57
Abbildung 18: Western Blots der mt-ND1-Untereinheit mit zwei verschiedenen Antikörpern und die statistische Auswertung.	58
Abbildung 19: Massenspektrometrie des mt-ND1-Proteins.....	59
Abbildung 20: Blockpeptid-Assay mit einem kommerziellen Komplex-I Antikörper.....	61
Abbildung 21: Western Blot des Reparatur-Assays mit gezeigter mt-ND1-Untereinheit und Tubulin als Ladekontrolle.....	62
Abbildung 22: Quantitative Ergebnisse des Reparaturassays der mt-ND1 Untereinheit durch PIMT..	63
Abbildung 23: Extracted Ion Chromatogram der Referenzpeptide.	64
Abbildung 24: Detektion der verschiedenen Aspartatspezies des Peptides GPNIVGPYGLQPFADAMK aus einer MR-Ratte.....	65
Abbildung 25: Quantifizierung der untersuchten Peptide im isolierten Komplex I der Leber.....	65
Abbildung 26: Massenspektrometrisch nachweisbare Asp-haltige Peptide im Komplex I, aufgetragen nach der Anzahl der Features in der jeweiligen Kohorte.	66
Abbildung 27: Abstand der Punkt aus Abb. 26 zur Winkelhalbierenden.	67
Abbildung 28: D-/iso-Asp-haltige Peptide in Komplex I.	68
Abbildung 29: Verteilung des Haupt- und Nebenpeaks in den Peptiden mit Isoasparat aus Komplex I.....	69
Abbildung 30: Auswertung der Proteinexpression im hepatischen Komplex I (CI) und Superkomplex I+III (CI+III).	70
Abbildung 31: Auswertung der Proteinexpression des mitochondrialen Qualitätskontrollsystems im hepatischen Komplex I (CI) und Superkomplex I+III (CI+III).	71
Abbildung 32: Auswertung der Proteinexpression von an Stoffwechsel beteiligten Proteinen in Komplex I (CI) und Superkomplex I+III (CI+III).....	73
Abbildung 33: Heatmap der deamidierten Aminosäuren im Komplex I.	75
Abbildung 34: Cross-talk zwischen der Leber und dem Fettgewebe während einer Komplex-I Inhibition.	81
Abbildung 35: Chemischer Mechanismus der Isoaspartat-bildung und -reparatur.....	86

Abbildung 36: Die PIMT-Variante in <i>P. denitrificans</i> , gebunden an Komplex I.	87
Abbildung 37: Rolle des Aspartats-51 (zentriert) in der Struktur des Komplex I.	90
Abbildung 38: Räumliche Partner des D51.....	91
Abbildung 39: Der „Flaschenhals“ des Q-Kanals im Komplex I.	

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.	24
Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.	25
Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper und rekombinanter Proteine.	28
Tabelle 4: Blockpeptidmasse für jedes verwendete Verhältnis.	32
Tabelle 5: Pipetierschema der Reaktionsansätze für den Reparaturassay.	33
Tabelle 6: Überblick über die vier in dieser Arbeit analysierten Met-Restriktionsstudien.	34
Tabelle 7: Ergebnisse des Textmining-Ansatzes von StringDB.	45
Tabelle 8: Vergleichende Analyse des Konsensus-Datensatzes mit den Knock-out-Genen der mitochondrialen DNA-Maschinerie (Lrp4, Mtef4, Polrmt, Tfam, Twinkle).	46
Tabelle 9: Anteil an Methionin (in Prozent) in mitochondrial-kodierten Untereinheiten der Atmungskette verglichen mit durchschnittlichen Methioninanteil der nukleär-kodierten Proteine in fünf Spezies.	46
Tabelle 10: Statistische Analyse des Vergleichs des Konsensus-MetR-Modells mit mutmaßlich verwandten pharmakologischen Phänotypen.	48
Tabelle 11: Gene, welche in allen vier untersuchten Transkriptomstudien entweder hoch- oder runterreguliert wurden.	113
Tabelle 12: Gene, welche in drei von vier untersuchten Transkriptomstudien entweder hoch- oder runterreguliert wurden.	115
Tabelle 13: Veränderung der Genexpression in den MR-Ratten.	124
Tabelle 14: Veränderungen der Metaboliten in verschiedenen Geweben durch Methionin-Restriktion	125

1. Einleitung

1.1 Methionin als Aminosäure

Methionin (Met, M) ist eine der acht strikt-essentiellen Aminosäuren, die der Körper nicht selbst synthetisieren kann und daher exogen zugeführt werden muss. Ebenfalls ist Methionin eine der wichtigsten Schwefelquellen für den Organismus und neben Cystein die einzige schwefelhaltige proteinogene Aminosäure. Chemisch handelt es sich bei Methionin um einen Methylthioether. Diese besondere chemische Beschaffenheit von Methionin kann auch die besondere Rolle von Methionin im Stoffwechsel erklären. Sie ist die erste Aminosäure in den Proteinsequenzen der Eukaryonten, da das Startcodon AUG für Methionin kodiert.

Methionin ist eine proteinogene Aminosäure und somit für die Proteinbiosynthese essenziell. Die Analyse der Proteome aller Eukaryoten ergibt, dass Methionin mit einem Anteil von 2,25 % die dritt-seltenste Aminosäure ist (Kozłowski, **2017**). Es handelt sich um eine oxidationslabile Aminosäure, die dazu neigt, reversibel Methionin-S-Sulfoxid zu bilden (Martinez et al., **2017**). Dieses kann enzymatisch durch Methioninsulfoxid-Reduktasen (MsrA und MsrB) zu Methionin reduziert werden. Somit ergibt sich die Rolle des Methionins als eine Art antioxidativen Systems für Proteine (Schindeldecker und Moosmann, **2015**). Besonders ist das Methionin in den Atmungskettenkomplexen und in den RNA-Einzelstrang-Bindungsproteinen akkumuliert: dort lassen sich Proteine mit über 6% Met-Gehalt finden.

1.2 Methionin-Stoffwechsel

Der Methionin-Stoffwechsel in Säugetieren ist grundsätzlich in drei Abschnitte zu unterteilen (Abb. 1). Das Schicksal jedes Methionins im Organismus ist es, zu SAM (S-Adenosylmethionin) umgesetzt zu werden. Dafür sind verschiedene MATs (Methionin-Adosyltransferasen) notwendig. Ein kleiner Teil des SAMs kann decarboxyliert werden und zur Polyaminsynthese genutzt werden. Das dabei entstandene MTA (5-Methylthioadenosin) wird über den Methionin-Rückgewinnungsweg zurückgewonnen. Der größte Teil des SAMs wird durch Methyltransferasen (MTs) auf verschiedene Substrate übertragen. Infolge dessen bildet sich das SAH (S-Adosylhomocystein), welches anschließend zu Homocystein (demethyliertes Methionin) umgesetzt wird. Der zweite Abschnitt des Methioninstoffwechsels, der Methionin-Zyklus, wird geschlossen, in dem das Homocystein auf zwei verschiedene Art und Weisen remethyliert wird; zu einem kann das Homocystein durch das Betain und das entsprechende Enzym BHMT S-remethyliert werden oder mithilfe des 5-Me-Tetrahydrofolats und der Methionin-Synthase. Das bereits erwähnte Homocystein stellt einen Knotenpunkt dar, von

welchem sich der dritte Teil des Methionin-Stoffwechsels, der Transsulfirierungsweg, ableitet. Durch die Arbeit der Enzyme CBS und CTH entsteht zuerst aus Homocystein das L-Cystathionin, woraus sich anschließend das Cystein bildet. Dieses kann als ein Baustein für die Protein- oder Glutathionsynthese verwendet werden. Anderweitig entsteht aus Cystein durch Oxidation das Taurin, ein wichtiger Osmoregulator im Organismus.

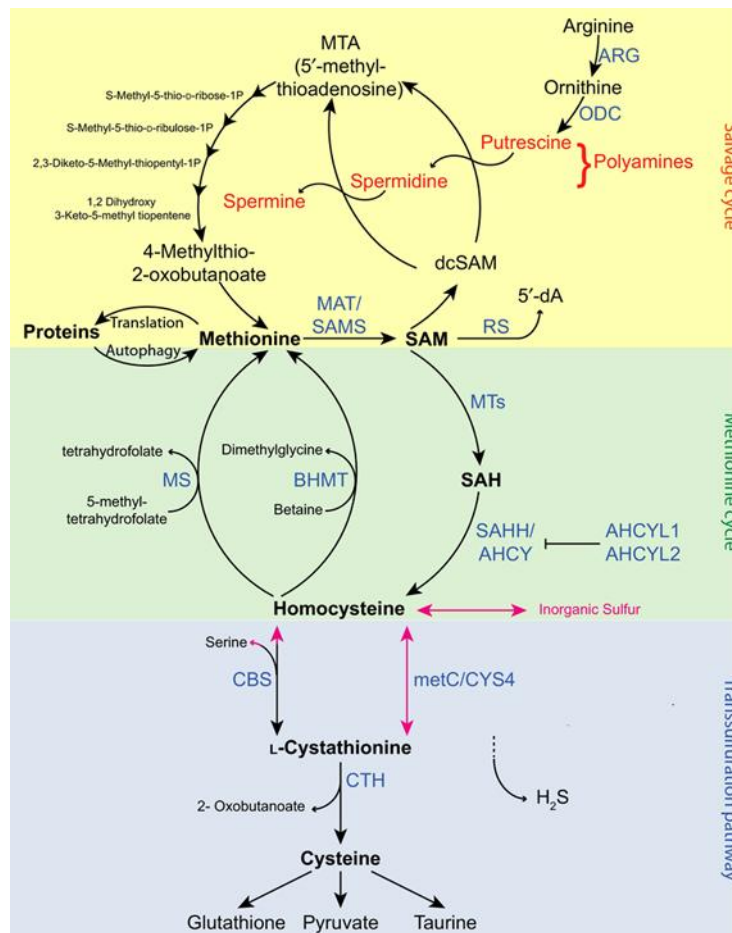


Abbildung 1: Überblick der verschiedenen Reaktionen des Methionins im Organismus. Es ist zwischen dem Methionin-Rückgewinnungsweg (gelb), dem Methionin-Zyklus (grün) und dem Transsulfirierungsweg (blau) zu unterscheiden. Abbildung aus Parkhitko et al., 2019.

Bei Betrachtung des Methionin-Stoffwechsels in Säugetieren ist eine Differenzierung zwischen Leber und anderen Geweben notwendig, da in Hepatozyten die involvierten Enzyme die höchste Aktivität aufweisen (Gil et al., 1996; Luka et al., 2009). Der erste Stoffwechselweg von Methionin ist die Biosynthese von S-Adenosylmethionin (SAM). Die Synthese erfolgt über die Methionin-Adenosyltransferasen (MATs), welche die Übertragung von Methionin auf ATP katalysieren, wodurch die aktivierte Form von Methionin gebildet wird (vgl. Abb. 1). Es gibt drei Isoformen von MAT, nämlich MATI/III und MATII. Während die MATI/III nahezu ausschließlich in der Leber vorkommt, ist die MATII ubiquitär vorhanden. Die Isozyme MATI/III unterscheiden sich darin, dass MATI ein Tetramer und MATIII ein Dimer ist (Gil et al., 1996). Zudem weisen die einzelnen MATs eine unterschiedliche Affinität

zu Methionin auf, wobei MATII die höchste, MATI die zweithöchste und MATIII die mit Abstand niedrigste Affinität besitzt (Markham et al., 2009).

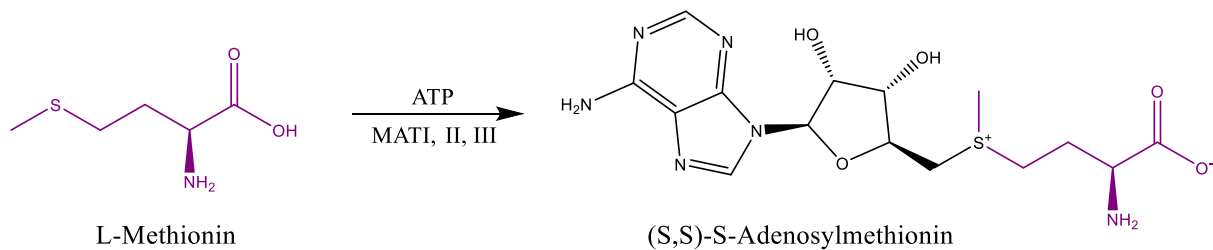


Abbildung 2: Übersichtsreaktion der Synthese von SAM aus Methionin. In violett ist der Methioninrest in SAM dargestellt.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft des Methioninstoffwechsels besteht in der Eigenstabilisierung des hepatischen Methioninspiegels, selbst bei einer stark variablen Methioninzufuhr. Diese Regulation gilt jedoch nicht für die Metaboliten S-Adenosylmethionin (SAM) und S-Adenosylhomocystein (SAH) (Finkelstein et al., 1986). Modellierungen auf mathematischer Basis legen nahe, dass es einen Schwellenwert für $c(\text{Met})$ gibt, bei dessen Erreichen eine metabolische Umschaltung stattfindet, dessen Schwelle bei ca. 54 μM liegt (Martinov et al., 2009). Jenseits dieser Konzentration erfolgt ein sprunghafter Anstieg der SAM-Konzentration. Die Methioninumsetzung agiert in zwei unterschiedlichen Modi: einem "low mode" unterhalb, und einem "high mode" oberhalb von 54 μM . Im "low mode" ist der Flux durch den Bedarf der Methyltransferasen an SAM determiniert. Die SAM-Synthese erfolgt im "low mode" ausschließlich durch MATI, wobei MATIII und das SAM-abbauende Enzym GNMT (Glycin-N-Methyltransferase) nahezu inaktiv sind (Martinov et al., 2009). Im "high mode", der bei höheren Methioninkonzentrationen eintritt, wird MATI durch höhere SAM-Konzentrationen unterdrückt, während MATIII aktiviert wird. Diese positive Rückkopplungsschleife wird durch gleichzeitig aktivierte GNMT unterbrochen, wodurch das überschüssige und nicht für Methylierungen benötigte SAM aus dem Umlauf entfernt wird. Bei diesem Overflow-Pathway wird das überschüssige SAM auf Glycin übertragen, wobei das N-Methylglycin (Sarcosin) entsteht, welches anschließend renal ausgeschieden werden kann. Somit besitzen die Eukaryonten ein System zur Abpufferung des zu vielen SAM.

Eine weitere Besonderheit des Methionin-Stoffwechsels besteht in der Möglichkeit der Wiederverwertung der essenziellen Thiomethylgruppe. Die Synthese von SAM ist energetisch betrachtet sehr teuer. Dies liegt zum einen daran, dass SAM einen hohen Anteil am Methioninpool hat und zum anderen werden bei der Synthese alle zwei energetisch reichen ATP-Bindungen gespalten (Cantoni et al., 1953). Daher ist es von entscheidender Bedeutung, möglichst viel Methionin zu regenerieren. Dazu kann zum Beispiel das während der Polyaminsynthese gebildete MTA (5-Methylthioadenosin) zu Methionin regeneriert werden, wobei dieser Prozess als Methionin-

Rückgewinnungsweg (engl. methionine salvage pathway) bezeichnet wird (Albers, **2009**). Dieser Stoffwechselweg ist in Pro- und Eukaryonten nachgewiesen. Die Umwandlung von MTA in Methionin erfolgt über sechs verschiedene Reaktionen, zusammengefasst in Abb. 3. Die Besonderheit besteht darin, dass das C4-Grundgerüst von Methionin vollständig aus der Ribose des MTA (und somit ATP) stammt. Die aufwendige Synthese beginnt mit der Abspaltung von Adenin und Phosphorylierung durch MTA-Phosphorylase, wobei MTR1P (5-Methylthioribose-1P) entsteht (Della Ragione et al., **1996**). Im Anschluss erfolgt eine Isomerisierung des Zuckerrings durch die MTR1P-Isomerase, wodurch eine lineare Struktur entsteht (Albers, **2009**). Im Anschluss erfolgen zwei weitere Schritte, nämlich eine Enolisierung und eine Dephosphatierung. Schließlich wird der entstandene C5-Körper durch eine Fe-abhängige Dioxygenase deformyliert, wobei Ameisensäure und 4-Methylthio-2-oxobutyrat (MOB) entstehen (Hirano et al., **2005**). Das MOB stellt die Oxo-Form des Methionins dar und kann durch gewöhnliche Transaminasen in Methionin überführt werden (Sekowska et al., **2002**).

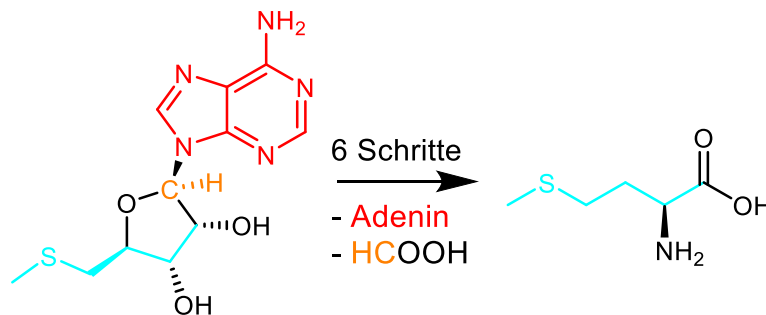


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Methionin-Bergungsweges. Aus der Ausgangssubstanz MTA (links) entsteht das Endprodukt Methionin (rechts). Die farbliche Markierung zeigt die Herkunft der Produkte an.

Die Ergebnisse genetischer Manipulationen im hepatischen Methionin-Stoffwechsel zeigen interessante Auswirkungen auf den Phänotyp (Jacobs RL et al., **2010**). Der Knock-out des Gmmt-Gens in Mäusen resultiert in der Entwicklung hepatozellulärer Karzinome. Eine Ursache dafür könnte die Hypermethylierung der DNA. Dabei wurde ein Anstieg des SAM-Spiegels um den Faktor 35 sowie eine Zunahme der Methylierungskapazität (ausgedrückt durch das SAM-zu-SAH-Verhältnis, SAM/SAH-ratio) um den Faktor 100 beobachtet (Luka et al., **2006**). Durchaus häufiger werden Mat1a-Gen bzw. MAT1/III-Protein untersucht. So war bei Mat1a^{-/-}-Mäusen der Plasmaspiegel an Methionin um das Siebenfache erhöht, während der hepatische SAM-Spiegel um drei Viertel sinkt. Der KO der Mat1a führt ebenfalls zu schweren Leberschäden und einer Absenkung des hepatischen Glutathionspiegels (Lu et al., **2001**).

1.3 S-Adenosylmethionin (SAM)

SAM wird als Substrat für verschiedene Methylierungen eingesetzt, wobei lediglich das (S,S)-Stereoisomer eine biologische Aktivität aufweist (Hoffmann, **1986**). In den Hepatozyten wird das

meiste SAM jedoch durch das leberspezifische Enzym GNMT (Glycin-N-Methyltransferase) verbraucht, wobei aus Glycin das *N*-Methylglycin (Sarcosin) entsteht. Die GNMT hat einen Anteil von ca. 2 % am gesamten löslichen Protein der Leber und ist somit in großen Mengen vorhanden (Yeo et al., **1994**). Bei allen Methylierungen resultiert die Reaktion von SAM mit einem weiteren Substrat in der Bildung des demethylierten Analogons SAH (S-Adenosylhomocystein). Im Anschluss erfolgt eine Hydrolyse durch das Enzym SAHH (S-Adenosylhomocysteinhydrolase), wodurch Adenosin und Homocystein (die demethylierte Form von Methionin, Hcy) entstehen. Bei dieser Umwandlung handelt es sich um eine Gleichgewichtsreaktion, welche thermodynamisch auf der Seite von SAH liegt. Dieses Problem wird umgangen, indem in einer Nebenreaktion das entstandene Adenosin irreversibel desaminiert wird und somit das Gleichgewicht auf die Seite des Homocysteins gezogen wird (Conway EJ et al., **1939**). Homocystein stellt einen weiteren wesentlichen Knotenpunkt im Methioninstoffwechsel dar. Der Methionin-Zyklus (Abb. 1) wird geschlossen, indem das Homocystein zu Methionin remethyliert werden. Die Remethylierung von Homocystein zu Methionin erfolgt in praktisch allen Zellen über den Folsäureweg. Das B12-abhängige Enzym Methionin-Synthase (MS) katalysiert diesen Prozess, wobei 5-Methyltetrahydrofolat (5-MeTHF) als Coenzym wirkt. In Hepatozyten findet diese Reaktion zum überwiegenden Teil über das Enzym BHMT (Betain-Homocystein-S-Methyltransferase) statt, welches zur Methylierung von Homocystein einen anderen Methylgruppendedonor, nämlich Betain (*N,N,N*-Trimethylglycin), verwendet. Das Betain kann aus dem Abbau von Cholin oder aus Cholin-reicher Ernährung gewonnen werden.

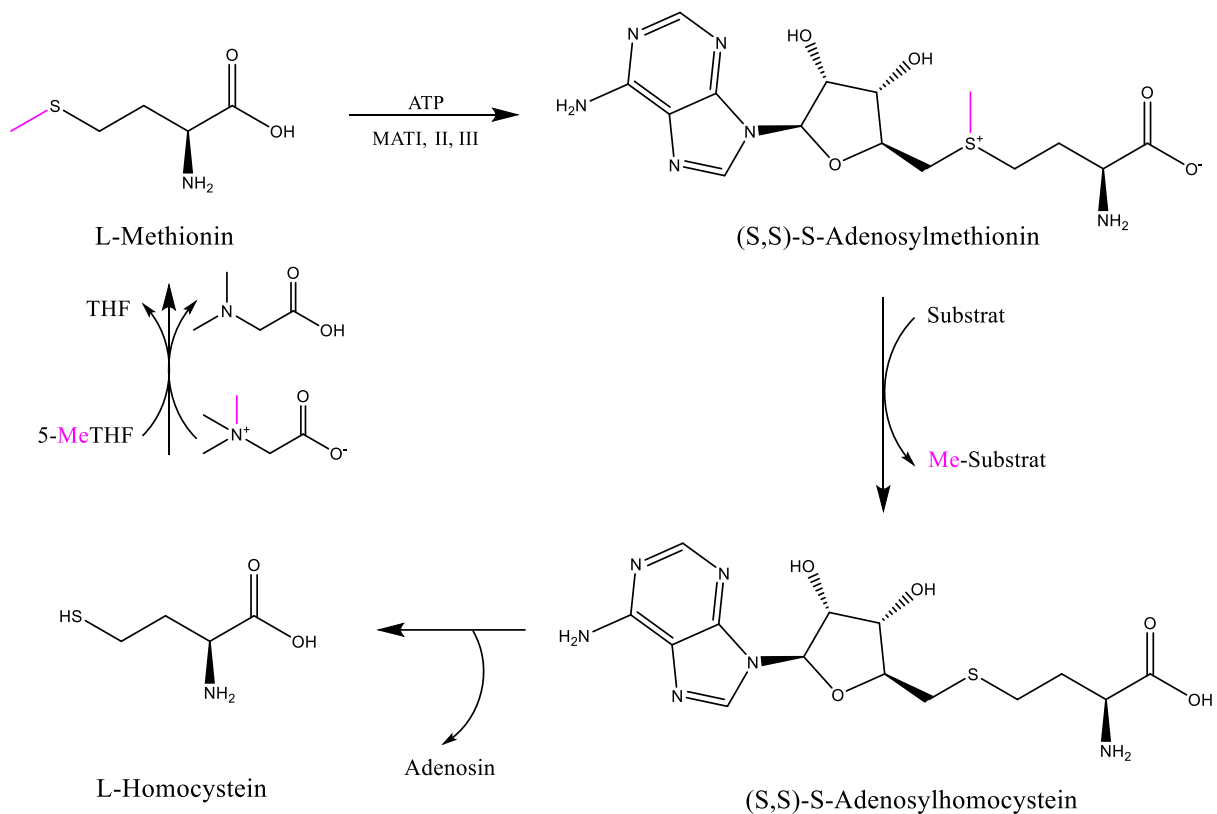


Abbildung 4: Der Stoffwechsel des Methionins, SAM und SAH. Die Methylgruppe, die übertragen wird, ist in violett markiert.

Es sind 208 Proteine bekannt, welche als bekannte oder vermeintliche Methyltransferasen im Menschen identifiziert sind (Petrossian et al., **2011**). Bis auf die bereits thematisierten Hcy-Methyltransferasen MS und BHMT nutzen alle weiteren Methyltransferasen SAM als Methylgruppendonor. Es erfolgt eine Differenzierung in fünf verschiedene Klassen von Methyltransferasen, bezeichnet mit den Zahlen I bis V (Abdelraheem et al., **2022**). Die erste und gleichzeitig größte Klasse ist durch sogenannte Rossmann-like Strukturen aus alternierenden α -Helices und β -Faltblättern gekennzeichnet (Cheng et al., **1993**). Die Substratbindungsdomäne ist jedoch variabel, sodass eine Vielzahl unterschiedlicher Substrate, darunter Antibiotika, Kofaktoren oder Biomakromoleküle, gebunden und methyliert werden können (Vidgren et al., **1994**; Keller et al., **2002**). Zwei weitere wichtige Klassen von Methyltransferasen sind zum einen die SET-Methyltransferasen (*suppressor of variegation, enhancer of zeste and trithorax*) (Xiao et al., **2003**), und zum anderen die SPOUT-Domänen-haltigen Methyltransferasen. Einige Methyltransferasen sind mit der Ätiologie diverser Krankheitsbilder assoziiert. Exemplarisch sei hier die Methioninsynthese genannt, deren Dysfunktion eine Rolle bei der Pathogenese der perniziösen Anämie spielt (Green et al., **2022**). Darüber hinaus weisen genetische Polymorphismen im TPMT (Thiopurin-Methyltransferase)-Gen eine ungünstige Prognose bei der Tumorthherapie mit Substanzen wie 6-Mercaptopurin an (Weinshilboum et al., **1980**).

Die essenzielle Funktion von SAM besteht in der Übertragung von Methylgruppen auf verschiedene Akzeptoren, welche durch den aktivierten, dreibindigen, geladenen Schwefel des Moleküls erfolgt. Die tägliche Synthese von SAM im menschlichen Körper beträgt 6–8 Gramm (Perez-Sala et al., **2018**). Dadurch werden Prozesse wie z.B. Genregulation oder die Synthese von Neurotransmittern präzise gesteuert. Der Großteil des SAM-Verbrauchs, nämlich über 90 %, entfällt auf Methylierungsreaktionen, wie z.B. die Kreatin- oder die Phosphatidylcholin-synthese. Etwa 5 % gehen auf die SAM-Decarboxylase (Loenen et al., **2018**), und ein geringer Prozentsatz auf radikalische SAM-Reaktionen zurück. Der größte Anteil am SAM-Verbrauch entfällt jedoch auf drei Methylierungsprozesse, nämlich die Synthese von Phosphatidylcholin, Kreatin, und die bereits erwähnte Sarcosinsynthese durch GNMT (Harvey et al., **2007**). Es ist bemerkenswert, dass epigenetische Modifikationen, die durch Methylierungen verursacht werden, eine untergeordnete Rolle beim SAM-Verbrauch spielen (Perez-Sala et al., **2018**).

Eine weitere wesentliche Funktion des SAM besteht in der Bereitstellung des Grundbausteins für die Polyamin-Synthese. In diesem Kontext ist die SAM-Decarboxylase (AMD1) von zentraler Bedeutung. Durch eine mechanistische seltene, durch Pyruvat vermittelte Decarboxylierung (Pegg, **2009**) entsteht aus SAM das S-Adenosylmethioninamin (dcSAM), welches als Aminopropylgruppendonor fungiert. Dieser Prozess stellt den zentralen Schritt der Polyaminsynthese dar, da die Bildung des dcSAM einen initialen Schritt darstellt, der ausschließlich innerhalb dieses Stoffwechselwegs erfolgt. Die Methyltransferasen sind nicht in der Lage, dcSAM als Substrat zu verwenden (Pegg, **2009**). Infolgedessen wird der Gehalt an dcSAM auf einem sehr geringen Niveau von lediglich 1–2 % des SAM gehalten, wodurch die Carboxylierung den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Pegg, **2009**). Die Aminopropylgruppe ist eine essentielle Komponente im Prozess der Synthese der wichtigsten Polyamine Spermidin und Spermin, welche eine entscheidende Rolle beim Überleben und der Entwicklung von Säugetieren spielen (Lee et al., **2010**). Die Aktivierung der AMD1 erfolgt durch Putrescin (decarboxyliertes Ornithin, 1,4-Diaminobutan). Dabei wird das Proenzym autokatalytisch in die aktive Form überführt, wodurch die Pyruvoyl-prothetische Gruppe gebildet wird (Stanley, **1994**). Die Bildung der Polyamine Spermidin und Spermin erfolgt nach der Bildung von dcSAM aus SAM durch die Spermidinsynthese (SRM) und anschließend die Sperminsynthese (SMS). Dabei wird jeweils ein dcSAM-Äquivalent verbraucht, wobei als Nebenprodukt das bereits angesprochene MTA (5-Methylthioadenosin) entsteht, welches zu Methionin recycelt wird.

Die Kontrolle der Genexpression erfolgt ebenfalls durch Methylierungen an der DNA sowie an den Histonen. Die DNA wird an dem 5'-C-Atom der in CpG-Dinukleotiden vorkommenden Cytosinreste methyliert (Jeltsch, **2002**), wobei ca. 80 % des Cytosins in diesen Dinukleotiden methyliert sind (Tost, **2010**). In diesem Kontext kommt den DNA-Methyltransferasen (DNMT1, 3a-b) eine zentrale Rolle zu. DNMT1 gewährleistet die Aufrechterhaltung der Methylierungsmuster während der Replikation,

während DNMT3a-b an der *de novo* Methylierung beteiligt sind (Perez-Sala et al., **2018**). Die Methylierung an Histonen wird durch eine Vielzahl an Methyltransferasen bewerkstelligt, wobei hier die EZH1 und EZH2 (*Enhancer of Zeste Homologues 1/2*) von besonderer Relevanz sind (Lee et al., **2022**). Die Mono-, Di- oder Trimethylierung des Lysin-27 des Histons 3 erfolgt mit SAM (H3K27me1/2/3). Die Trimethylierung führt zu einer Repression der benachbarten Gene durch die Bildung von Heterochromatin-Regionen (Ferrari et al., **2014**). Histonmethyltransferasen weisen eine Affinität für SAM auf, die unterhalb des normalen SAM-Spiegels liegt, sodass eine epigenetische Modulation selbst bei geringer Verfügbarkeit von Methylgruppen möglich ist (Mentch et al., **2015**).

1.4 Cystein und Methionin

Die zweite schwefelhaltige Aminosäure, Cystein (Cys, C), ist ebenfalls eng mit Methionin verknüpft. Im Gegensatz zu Methionin kann Cystein vom Menschen aus Methionin synthetisiert werden und ist somit eine semi-essentielle Aminosäure (de Jong et al., **2024**). Das Bindeglied zwischen Cystein- und Methioninstoffwechsel ist Homocystein und der Transsulfurierungsweg: Während Hcy auf der einen Seite zur Remethylierung und Methioningewinnung genutzt werden kann, kann Cystein aus Homocystein gewonnen werden (Chen et al., **2004**). Der letzte Reaktionsweg wird von der Cystathionin- β -Synthase (CBS) und der Cystathionin- γ -Lyase (CTH) bewerkstelligt. CBS ist ein PLP- und Protoporphyrin IX-abhängiges Enzym, das Cystathionin aus Homocystein und Serin synthetisiert (Taoko et al., **2002**), wobei Protoporphyrin IX als Redoxsensor dienen könnte (Taoka et al., 1998). Dieses Enzym wird durch SAM aktiviert, wodurch eine Akkumulation von eventuell vermehrt gebildetem Hcy verhindert wird (Finkelstein et al., **1975**). Das zweite Enzym der Kaskade, CTH, spaltet anschließend Cystathionin in Cystein und α -Ketobutyrat.

Cystein ist ein Teil von einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen und Signalübertragungswegen. Die Oxidation von Cysteinresten in Proteinen führt zur Bildung von Disulfidbrücken, welche eine kovalente Vernetzungsstruktur von einzigartiger Natur generieren. Des Weiteren ist eine Spaltung von Cystein durch die CTH zu Ammoniak, Pyruvat und H₂S möglich (Renga, **2011**). H₂S hat eine Funktion als Gasotransmitter und zeigt gefäßerweiternde Eigenschaften (Bhatia, **2005**). Weiterhin kann Cystein für die Synthese von Fe-S-Clustern desulfuriert werden, wobei aus Cystein Alanin entsteht (Kato S. et al., **2002**). Der oxidative Abbau von Cystein liefert Taurin (2-Aminoethansulfonsäure), welches ein bekanntes Antioxidans ist (Schaffer et al., **2009**), für die Funktion der Photorezeptoren verantwortlich ist (Gaucher et al., **2012**) und am Alterungsprozess beteiligt ist (Singh et al., **2023**). Ebenfalls ist das Taurin ein kompatibler Osmoregulator (Lang et al., **1998**). Ferner wird Taurin zur post-translationalen Modifikationen der RNA verwendet. Im Falle der mitochondrialen tRNA können Uridinreste taurinyliert werden, wodurch die taurinylierte tRNA ihr Codon besser erkennt (Suzuki et al., **2011**).

Zu den essenziellen nicht-proteinischen Funktionen des Cysteins zählt die Beteiligung an der Biosynthese von Glutathion (GSH). Dieses γ -Tripeptid stellt das wichtigste Redox-Shuttle des Körpers dar und kann gleichzeitig als Marker für oxidativen Stress herangezogen werden (Pastore, **2001**). Die Bildung von GSH erfolgt in der Leber durch die Enzyme Glutamat-Cystein-Ligase (GCL) und GSH-Synthetase (Meister, **1982**). Die GCL ist ein Heterodimer, welches aus einer katalytischen (GCLC) und einer modifizierten (GCLM) Untereinheit besteht. Es katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der GSH-Synthese (Meister, **1991**). Dieses Enzym ist besonders für die Leber von essenzieller Bedeutung: Der höchste Spiegel an Glutathion im gesamten Körper ist in den Hepatozyten zu finden. Ein hepatischer Gclc-Knock-Out (Gclc^{-/-}) führt zu abnormen mitochondrialen Leberschäden und zum Tod des Tieres nach 28 Tagen (Chen et al., **2007**). Es existieren mindestens fünf Proteinfaltungsmuster, welche für die Glutathionbindung- und katalyse sich im Laufe der Evolution sich herausgebildet haben (Deponte, **2013**). Dazu zählen z.B. die Superfamilie der Flavin-abhängigen Oxidasen (Glutathion-Reduktase, GR), das Thioredoxin-Faltungsmuster (Glutathion-S-Transferase oder das Peroxiredoxin) oder das four-helix bundle Motiv (wie in MAPEG - **M**embrane-**A**ssociated **P**roteins in **E**icosanoid and **G**lutathione metabolism – z.B. Leukotrien C4 Synthase). Die hohe Diversität der Enzyme veranschaulicht die vielfältigen Funktionen und die Notwendigkeit des Glutathions für den Organismus.

1.5 Methionin-Restriktion

Obleich Methionin eine essenzielle Aminosäure ist, erweist sich die Methionin-Restriktion (MetR) als eine vielversprechende ernährungstherapeutische Maßnahme mit einer Vielzahl Vorteilen. Der Begriff "Methionin-Restriktion" bezeichnet eine Einschränkung der Methioninaufnahme von 0,86 % im Futter (bei Nagetieren) auf 0,17 %, was einer Restriktion von ca. 80 % entspricht. Das Kaloriendefizit, der durch die Methioninrestriktion verursacht wird, wird durch Glutamat ausgeglichen. Im Rahmen der klassischen MetR wird darüber hinaus vollständig auf Cystein verzichtet, sodass Methionin die einzige verfügbare Quelle für die schwefelhaltigen Aminosäuren des Körpers darstellt. Der Bereich von 0,25 % bis 0,12 % Methioningehalt im Futter kann die wichtigsten Effekte einer Methionin-Restriktion (MetR) auslösen, während ein höherer Methioningehalt in der Nahrung keine Effekte hervorbringt (Fang et al., **2022**). Eine Restriktion von über 86 % des Methioningehalts im Essen wird als Methionin-Deprivation bezeichnet und ist für Säuger nicht mehr tolerierbar und endet letal.

Die Konsequenz dieser Diät ist die Entwicklung eines einzigartigen Phänotyps bei den MetR-Tieren. Zu nennen ist die Veränderung der durchschnittlichen und maximalen Lebensspanne. Die Lebensspanne verlängert sich bei MetR-Tieren um ca. 40%. Des Weiteren ist zu beobachten, dass die MetR-Tiere eine deutlich schlankere Körperform sowie ein geringeres Körpergewicht als ihre kontrolliert gefütterten

Geschwister aufweisen. Die MetR-Tiere erreichen dabei zu einem späteren Zeitpunkt ihr maximales Körpergewicht. Das Körpergewicht liegt in allen Lebensstadien circa 30 bis 40 Prozent unter dem der Kontrolltiere (Miller et al., **2005**). Es ist bemerkenswert, dass die Tiere ab der zweiten Fütterungswoche eine höhere Nahrungsaufnahme pro Kilogramm Körpergewicht zeigen. Der Effekt beläuft sich auf ca. 90% in Ratten (Orentreich et al., **1993**). Dies bedeutet, dass die MetR-Tiere etwa 25% mehr Futter aufnehmen, bezogen auf die kontroll-gefütterten Tiere. Die MetR-Tiere weisen somit eine ausgeprägte Hyperphagie auf (Fang et al., **2022**). Die Wasseraufnahme der Tiere auf MetR steigt bereits am zweiten Tag nahezu auf das Doppelte an und bleibt auf diesem Niveau, solange die Diät fortgesetzt wird (Forney et al., **2017**).

Mit der Abnahme der Fettmasse sinkt die Größe der einzelnen, gereiften Adipozyten in allen untersuchten Fettgeweben (Inguinal, epididymal, mesenterial und retroperitoneal) signifikant (Perrone et al., **2013**). In Übereinstimmung damit wird eine Reduktion des Fettanteils um ca. 30 % bezogen auf das Gesamtkörpergewicht berichtet (Orentreich et al., **1993**). Die mit MetR gefütterten Tiere wiesen ferner eine gesteigerte Aktivität auf, die sich anhand ihres Energieverbrauchs quantifizieren ließ (Hasek et al., **2010**). Zudem ließ sich ein stärkerer Anstieg des Energieverbrauchs von Tag zu Nacht bei den MetR-Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren beobachten.

In der Physiologie wird der respiratorische Quotient (RQ) als das Verhältnis aus ausgeatmetem Kohlendioxid und eingeatmetem Sauerstoff definiert. Die Art des aktuell katabolisierten Biomoleküls determiniert diesen Wert, sodass eine Echtzeitanalyse der verbrauchenden Nahrung möglich ist. Die Werte für den respiratorischen Quotienten (RQ) liegen gewöhnlich zwischen 1 (bei Abbau von Glukose) und 0,7 (Fett). Sie hängen insbesondere von der Oxidationsstufe des jeweiligen Substrats ab. In den MetR-Studien erlaubte der RQ einen wichtigen Rückschluss auf die Art des aktuell umgesetzten Substrates. Nachts können bei MetR-Tieren, jedoch nicht bei den Kontrollen, RQ-Werte über 1 erreicht werden, was für eine Umwandlung von Zucker zu Fett spricht (Heyman et al., **2019**).

Des Weiteren weisen die MetR-Tiere eine deutlich geringere Anfälligkeit für durch hochdosiertes Acetaminophen (Paracetamol) verursachte Leberschäden auf. In einer Studie von Miller et al. (**2005**) konnte nachgewiesen werden, dass MetR-Tiere einen im Durchschnitt fünfmal geringeren Anstieg der LDH (Lactat-Dehydrogenase) und ALT (Alanin-Transaminase) aufwiesen, welche als typische Marker für Leberschäden gelten. Der Verlauf der Entzündung blieb bei den Kontroll- und Behandlungsgruppen unverändert, jedoch manifestierte sich der Effekt mit verminderter Intensität. Dies könnte an der erhöhten Menge der Phase I/II-Enzyme liegen.

Nekropsie-Analysen belegen, dass es keine signifikanten Unterschiede in den Todesursachen zwischen kontrollgefütterten und MetR-Tieren gibt (Miller et al., **2005**). In beiden Gruppen stellten Lymphome

die häufigste Todesursache dar, gefolgt von histiozytischem Sarkom. Dieses Ergebnis stützt die Annahme, dass die MetR nicht die Pathologie verändert, sondern den Krankheitsbeginn und das Altern lediglich zeitlich nach hinten verschiebt.

Methionin-Restriktion hat ebenfalls einen vielversprechenden Stellenwert als Ernährungsstrategie in der Krebsforschung (Ming Ji et al., **2024**). Humane Krebszellen weisen eine höhere Abhängigkeit von der exogenen Methioninzufuhr auf als normale Zellen, was bereits 1983 erkannt wurde (Mecham et al., **1983**). In verschiedenen Studien (Mecham et al., **1983**; Tan Y. et al., **2010**) konnte nachgewiesen werden, dass alle normalen, nicht-malignen Zelllinien nicht auf das L-Met angewiesen sind. Sie sind in der Lage, in Met⁻Hcy⁺-Medium (durch die Aktivität von MS) ähnlich wie in Met⁺Hcy⁻-Medium zu wachsen. In Krebszellen hingegen zeigte sich ein anderes Bild: Von 23 untersuchten malignen Zelllinien wuchsen lediglich 11 im Met⁻Hcy⁺-Medium, was darauf hinweist, dass sie erhöht von Met abhängig sind. Dieser erhöhte Bedarf an Methionin, auch als Hoffmann-Effekt bekannt (Hoffmann et al., **1978**), ist hierfür verantwortlich. Es sei jedoch darauf verwiesen, dass sich die Methioninabhängigkeit der Krebszellen je nach Tumorart signifikant unterscheidet (Stern et al., **1984**). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine verminderte Methioninaufnahme nicht nur das Wachstum von Krebszellen hemmt, sondern auch die Wirkung von Zytostatika verstärkt (Guo et al., **1993**; Poirson-Bichat et al., **1997**; Hens et al., **2016**). *In vivo* besteht jedoch ein Konkurrenzkampf um das exogene Methionin zwischen Tumor- und Immunzellen, wobei insbesondere T-Zellen von Bedeutung sind, da sie eine wesentliche Rolle bei der Beseitigung von Tumoren spielen. Methionin ist zudem essenziell für die Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen (Zhao T. et al., **2022**; Sinclair et al., **2019**). Somit birgt diese Strategie auch Nachteile: Während die Methionin-Restriktion die Krebszellen aufgrund ihrer Met-Abhängigkeit schwächt, führt sie auch zu einer Beeinträchtigung der T-Zellen. Dies äußert sich in einer Reduzierung der Überlebensrate, des Gedächtniszustandes sowie der Effektor-Funktionen der T-Zellen (Bian et al., **2020**). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Behandlung mit MetR bei fortgeschrittenem Krebs in immunsuppressiven Patienten zu einer positiven Prognose führt, da das Immunsystem weniger beeinträchtigt wird und sich die volle Wirkung von MetR auf den Krebs entfalten kann. Bei gesunden oder bei Patienten mit Krebs im Frühstadium ist hingegen eine gegenläufige Prognose zu erwarten (Ming Ji et al., **2024**).

Einer der naheliegenden Mechanismen der MetR-vermittelten Krebsbekämpfung besteht in der verringerten Methylierung bestimmter Promotoren. So kann in Magenkrebs durch eine verringerte Methylierung des BNIP3-Promoters mitophagischer Zelltod eingeleitet werden (Xin et al., **2021**). Auch eine verminderte Histonmethylierung, beispielsweise H3K36me₃, kann zum Zelltod bei Leukämie sowohl *in vivo* als auch *in vitro* führen (Cunningham et al., **2022**). Ein weiteres Ziel der MetR stellt die SUV39H1-cGAS-Achse dar. cGAS ist ein DNA-Sensor im Cytosol, während SUV39H1 die

Methyltransferase für cGAS ist. Durch die verringerte Methylierung von cGAS kann dieses besser an die DNA binden, wodurch der Typ-I-Interferon-Weg aktiviert wird. Dies führt zu einer Sensibilisierung der Zellen gegen Zytostatika (Fang et al., **2023**).

Obgleich die MetR viele nützliche Auswirkungen auf den Organismus hat, ist der Verzicht auf eine bestimmte Aminosäure nur schwer umsetzbar. Eine Möglichkeit, die MetR-Effekte zu imitieren, ohne diätetische Einschränkungen in Kauf nehmen zu müssen, stellt das bakterielle Enzym Methionin- γ -Lyase (EC 4.4.1.11; METase) dar. Das Enzym ist in der Lage, innerhalb weniger Stunden den Blutspiegel von Methionin zu senken (Tan Y. et al., **1997**). METase ist ein Pyridoxal-5'-phosphat (PLP)-abhängiges Enzym, welches die Spaltung von Methionin bewerkstelligt (Tanaka et al., **1985**). Im ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt findet eine γ -Eliminierung von Methylthiol unter Bildung von 2-Aminobut-2-enoat (1) statt, welches einer spontanen Tautomerisierung zu 2-Iminobuttersäure unterliegt (2). Durch anschließende Hydrolyse (3) wird das Endprodukt, die α -Ketobutyrate, gebildet (Abb.5) (Sato D et al., **2009**).

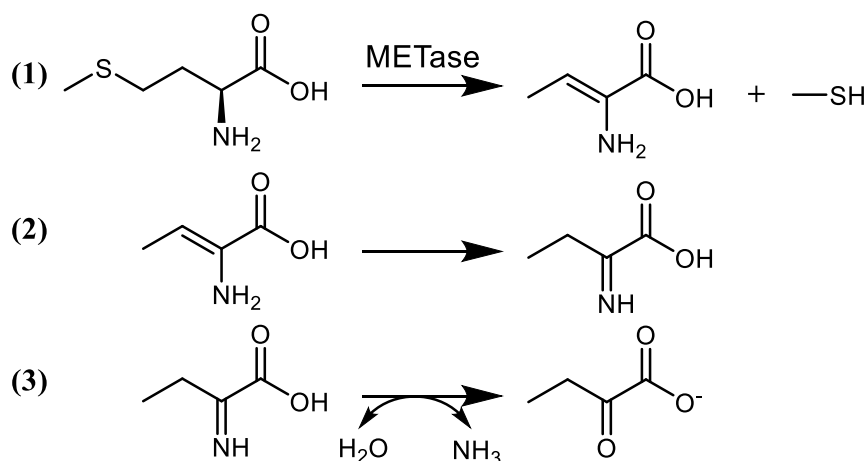


Abbildung 5: Übersicht den Abbau von Methionin durch die Methionin- γ -Lyase.

Es konnte gezeigt werden, dass eine einzelne i.v. Dosis von METase den Plasmaspiegel an Methionin auf 1/12 reduzieren kann (Kreis et al., **1980**). Seither findet die rekombinante METase (r-METase) aus *Pseudomonas putida*, kloniert in *E. coli*, Verwendung in der Krebsforschung. (Tan Y. et al., **1997**). Um das Problem des Dissoziierens des PLP vom Enzym im Blut zu umgehen, wurde eine oralverfügbare r-METase (o-rMETase) entwickelt (Yang et al., **2004**). Die einzige bei Primaten beobachtete Nebenwirkung dieses Enzyms war eine transiente Anämie. Die Therapie mit o-rMETase als Adjuvans erwies sich als erfolgreich bei Prostatakrebs (Reduktion des PSA, Prostata-spezifisches Antigen, um 70 %), Darm- und Pankreaskrebs (Han et al., **2021**; Kawaguchi K. et al., **2018**). Des Weiteren konnte ein

additiver Effekt von O-rMETase in Kombination mit Dexamethason, Doxorubicin und Cyclophosphamid nachgewiesen werden (Kubota et al., **2022**; Igarashi et al., **2020**).

Zur der Adaption der Zelle an äußere Stressumstände wie beispielsweise Nahrungsmangel existieren Sensoren, welche den Stressor wahrnehmen und eine zelluläre Antwort auslösen (Pakos-Zebrucka et al., **2016**). Zu den Sensoren, die spezifisch auf einen Mangel an essentiellen Aminosäuren reagieren, zählt EIF2AK4 bzw. Gcn2 (*eIF2 α kinase 4*), welcher im anterior piriformen Cortex, einem Teil des olfaktorischen Cortex, lokalisiert ist (Hao et al., **2005**). Die Wahrnehmung eines Aminosäuremangels erfolgt durch die Bindung unbeladener tRNA an EIF2AK4 (Anda et al., **2017**). In der Folge wird EIF2S1 phosphoryliert und somit aktiviert (Dang et al., **2023**). Die Aktivierung von EIF2S1 resultiert in einer Inhibierung der globalen Proteinbiosynthese sowie einer selektiven Translation ausgewählter Gene mit spezifischen offenen Leserastern, um den Aminosäuremangel zu kompensieren (Palam et al., **2011**). Es sei darauf verwiesen, dass dieser Vorgang nicht für alle Aminosäuren gilt. Während für Leucin und Threonin eine experimentelle Bestätigung vorliegt, konnte bei einer akuten Methioninrestriktion der Effekt nicht bestätigt werden. Dies lässt auf einen alternativen Mechanismus bei einem Schwefelaminosäuremangel schließen (Johnson W. et al., **2022**). In Gcn2^{-/-}-Mäusen konnte der Knock-out den Einfluss der MetR-Diät nicht verhindern. Weder die Abnahme der Adipositas noch die Insulinsensitivität, die Körpergewichtsreduktion oder der Energieverbrauch waren zwischen dem Wildtyp und dem Knock-out unterschiedlich (Wanders et al., **2016**). Die Phosphorylierung von Eif2 α war von der genetischen Absenz von Gcn2 ebenfalls unbeeinflusst, was die Hypothese stützt, dass eine andere Eif2 α -Kinase durch MetR aktiviert wird. In der Tat kann die PERK (*Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3*) durch eine verringerte Konzentration an Glutathion aktiviert werden (Cullinan et al., **2004**). Bei MetR-Tieren, ist eine Verringerung der hepatischen Glutathionkonzentration um den Faktor 10 zu beobachten (Perrone et al., **2012**). Die vermutete PKR-like-PKC (PERK/EIF2AK3) konnte die Phänomene der MetR aber ebenfalls nicht erklären. In den hepatischen PERK-Knockouts konnten keine Einschränkungen der durch MetR erhöhten Nahrungsaufnahme oder der verringerten Lipidablagerung im Gewebe nachgewiesen werden (Pettit et al. (**2017**). Aufgrund der oben aufgelisteten Beobachtungen kann davon ausgegangen werden, dass ein Sensing-Effekt nicht die Effekte der MetR erklären kann.

Die biochemischen Charakteristika der MetR korrelieren mit dem äußeren Phänotyp. In einer Vielzahl von Studien konnte ein antidiabetischer Effekt durch das Absinken des Blutglucosespiegels um 20 % beobachtet werden (Perrone et al., **2012**). Des Weiteren konnte eine Senkung des Nüchterninsulins beobachtet werden, ebenso wie eine Reduktion der hepatischen und Serumtriglyceride (Wanders et al., **2016**). Es konnte gezeigt werden, dass die durch die MetR vermittelte Insulinsensitivität teilweise unabhängig von der Adipositas ist (Wanders et al., **2015**, Wanders et al., **2017**).

Der erste Hinweis darauf, dass der MetR-Phänotyp nicht allein vom Methioninspiegel abhängt, ergab sich aus der Beobachtung, dass der hepatische mRNA-Spiegel von Fgf21 (Fibroblast Growth Factor 21) deutlich ansteigt (Perrone et al., **2012**). Fgf21 ist ein Hepatokin, ein exklusiv von der Leber sezerniertes Hormon, welches eine große Rolle bei diversen metabolischen Prozessen spielt. Dieses Hormon steuert beispielsweise die Fettsäureoxidation in der Leber und trägt allgemein zur Regulation des Fettstoffwechsels in verschiedenen Geweben bei (Fisher et al., **2015**). Es ist von Interesse, dass Fgf21 zum Braunen des Fettgewebes führt (Fisher et al., **2012**). Dabei erfolgt eine Ausdifferenzierung des Fettgewebes zu einem Gewebe mit mehr Mitochondrien und Thermogenin, wodurch eine Gewinnung von Wärme aus Fettsäureoxidation ermöglicht wird (Montanari et al., **2017**). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Erhöhung von Fgf21 nur so lange anhält, wie die MetR-Diät appliziert wurde. In Fgf21^{-/-}-Mäusen konnte keine Erhöhung des Energieverbrauchs aufgrund der Stimulation des sympathischen Nervensystems festgestellt werden, was durch mehrere Studien bestätigt wurde (Forney et al., **2020**; Wanders et al., **2017**). Allerdings lassen sich nicht alle Phänomene durch Fgf21 erklären. In denselben Fgf21^{-/-}-Mäusen konnte eine unerwartete Abnahme in Adipositas festgestellt werden, was daraufhin deutet, dass Fgf21 alleine nicht alle mit dem MetR assoziierten Phänomene erklären kann und keinen Einfluss auf den hepatischen Fettstoffwechsel hat.

Durch bioinformatische Analysen konnten weitere potenzielle Effektoren von MetR identifiziert werden. Unter den am stärksten erhöhten Gencluster-Termini befand sich die NRF2-vermittelte Antwort auf oxidativen Stress. NRF2 (*Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*) ist ein Transkriptionsfaktor der bZip-Familie, welcher als Antwort auf metabolischen, oxidativen oder onkogenen Stress aktiviert wird (He et al., **2020**). Die Verringerung der hepatischen Glutathionspiegel bei MetR könnte zu einer Erhöhung der NRF-2 vermittelten Antwort führen, da solche Veränderung oxidativen Stress hervorrufen könnte (Fang et al., **2022**). Jedoch konnten in Nrf2^{-/-}-Mäusen ebenfalls, wie bei Fgf21^{-/-}, keine Unterschiede in den durch MetR vermittelten Veränderungen im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden (Fang et al., **2021**). Ein weiterer Upstream-Aktivator von Fgf21 ist ATF4 (Activating Transcription Factor 4). Nach einer Restriktion essenzieller Aminosäuren wird dieser zentrale Effektor der zellulären Stressantwort translatiert (Harding HP et al., **2000**). In der 5'-Flankenregion des humanen FGF21 befinden sich zwei ATF4-Bindungsstellen (De Sousa-Coelho AL et al., **2012**). Es wurde jedoch gezeigt, dass der hepatische Knock-out von Atf4 in Mäusen keinen Einfluss auf die Fgf21-Transkription unter MetR-Bedingungen hat (Jonsson WO et al. **2021**). Diese Ergebnisse legen nahe, dass ATF4 nicht das Bindeglied zwischen MR und FGF21 darstellt, da die zelluläre Stressantwort in diesen Knock-Outs nahezu vollständig intakt blieb und Fgf21 nur partiell die MetR-Effekte vermittelt. (Fang et al., **2022**).

2. Zielsetzung der Arbeit

Methionin ist eine der zwanzig proteinogenen Aminosäuren und ist für Säugetiere essenziell, sie muss mit der Nahrung zugeführt werden. Eine intendierte Reduktion der Methionineinnahme ist bekannt als Methionin-Restriktion und hat in einem bestimmten Konzentrationsbereich überraschenderweise positive Auswirkungen auf den Organismus, wie z.B. einen ausgeprägten antidiabetischen Phänotyp und eine Verlängerung der Lebensspanne. Nachdem im Jahre 1993 Methionin-Restriktion erstmals mit Langlebigkeit bei Nagetieren in Verbindung worden war (Orentreich et al., **1993**), wurden in der Folgezeit systematische Ansätze verfolgt, um die molekularen Mechanismen hinter diesem interessanten und unerwarteten Phänotyp aufzudecken. Verschiedene attraktive Hypothesen, darunter eine Induktion des antioxidativen Regulators NRF2 (Fang et al., **2021**), ein „Nutrient-Sensing“ durch die GCN2-Kinase (Wanders et al., **2016**), eine Stimulation der Genexpression durch den Transkriptionsfaktor ATF4 (Jonsson WO et al., **2021**), oder eine spezifische Induktion des Cytokins FGF21 (Perrone et al., **2012**), konnten den Globalphänotyp der Methionin-Restriktion jedoch nicht hinreichend erklären. Die Hochregulation von FGF21 vermag lediglich einen Teil der antidiabetischen Wirkung einer MetR zu erklären, nicht jedoch beispielsweise die Veränderungen im Fettstoffwechsel (Wanders et al., **2017**).

Die vorliegende Dissertation verfolgt das Ziel, die molekularen Mechanismen, die durch Methionin-Restriktion ausgelöst werden, näher zu erforschen, um insbesondere zu einem besseren Verständnis ihrer antidiabetischen und lebensverlängernden Effekte zu gelangen.

In einem ersten Schritt sollte eine vergleichende Analyse von bekannten Gensignaturen auf bioinformatischer Ebene durchgeführt werden. Neben einer vertieften Beschreibung des MetR-Modells war hierbei das Ziel, Ähnlichkeiten und gemeinsame Mechanismen mit anderen zu MetR phänotypisch ähnlichen Modellen, insbesondere antidiabetischen Modellen, wie der Metformin-Behandlung, zu definieren. Damit sollte gleichzeitig überprüft werden, ob das Mitochondrium, das in einzelnen Studien bereits als Wirkort der MetR verdächtigt worden ist, in der Tat als zentraler Angriffspunkt der MetR zu betrachten ist. Durch eine detaillierte Betrachtung der metabolischen Veränderungen bei MetR sollten Hinweise auf konkrete, möglicherweise bei MetR betroffene Proteine, wie zum Beispiel Atmungskettenkomplexe, gewonnen werden.

In einem zweiten Schritt sollte eine experimentelle Charakterisierung der in bioinformatischen Ansatz identifizierten Zielstrukturen durchgeführt werden. Hierzu sollte Gewebesmaterial von MetR-Ratten analytisch untersucht werden, wobei insbesondere proteinbiochemische Methoden und massenspektrometrische Analysen zum Einsatz kommen sollten.

3. Material

3.1 Gewebe

Für diese Dissertation wurden Leber und Herzen von männlichen Fischer 344 Ratten verwendet. Die Tiere wurden zu ihrer Lebenszeit in zwei Kohorten zu je acht Tiere unterteilt: eine Kohorte (CF, *control-fed*) erhielt ab der sechsten Lebenswoche für drei Monate eine Kontrolldiät (AIN-76), während die andere Kohorte eine Methionin-restringierte Diät (AIN-76 mit 0,17% Met, 0% Cys, MP Biomedicals, USA) erhielt. Die Tiere wurden für die Publikation (Perrone et al., **2012**) verwendet und mit freundlicher Erlaubnis von AR Carmen Perrone, Orientreich Foundation for the Advancement of Science, New York, USA, für diese Arbeit benutzt. Das Gewebe wurde vor der Benutzung bei -80°C gelagert.

3.2 Chemikalienliste

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien.

Chemikalie	Hersteller	Katalognummer
1,4-Dithiothreitol	Hoffmann-La Roche (Schweiz)	10708984001
2-Mercapthoethanol	Carl Roth (Germany)	4227.3
Acrylamid-Bisacrylamid (29:1)	Sigma-Aldrich (USA)	A3699
Essigsäure	Carl Roth (Germany)	6755.2
BCA-Assay	Thermo Fischer Scientific (USA)	23228
Bis-Tris	Sigma-Aldrich (USA)	B9754
Bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich (USA)	A7906
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (USA)	B-6131
D(+)-Saccharose	Carl Roth (Germany)	4621.1
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (USA)	D4540
Ethanol	VWR Chemicals (Germany)	85033.320
EDTA	Carl Roth (Germany)	8043.2
EGTA	Sigma-Aldrich (USA)	E4738
Glycerin	Sigma-Aldrich (USA)	56815
Salzsäure	Merck (Germany)	100319
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma-Aldrich (USA)	216763
Kaliumchlorid	Carl Roth (Germany)	9781.1

Luminol	Sigma-Aldrich (USA)	123072-5G
Methanol	VWR Chemicals (Germany)	20903.368
Methionin	Bachem	9000285
Milchpulver (fettfrei)	VWR Chemicals (Germany)	3957.2
Natriumchlorid	Carl Roth (Germany)	A0830
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific (USA)	26616
p-Cumarinsäure	Sigma-Aldrich (USA)	C9008-5G
PhosSTOP Cocktail Tabletten	Hoffmann-La Roche (Schweiz)	04906837001
Ponceau S	Sigma-Aldrich (USA)	P3504
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich (USA)	P8340
SDS	Sigma-Aldrich (USA)	75746
TRIS	Carl Roth (Germany)	4855.2
TRIS-HCl	Carl Roth (Germany)	9090.3
Tween 20	Carl Roth (Germany)	9127.1
APS	Sigma-Aldrich	A3678
TEMED	BioRad	161-0801
SAM	Sigma-Aldrich (USA)	A7007-25MG
SAH	Sigma-Aldrich (USA)	A9384

3.3 Liste der Geräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte.

Bezeichnung	Modell	Hersteller
Abzugssystem	System DELTA 30	Wesemann, Syke
Chemilumineszenz-Detektor	Imager 600	Amersham
Eismaschine	AF 80	Scotsman
Gefrierschränke	-20° - Liebherr MEDline -80°	
Heizbad		Julabo
Heizblöcke	ThermoMixer F1.5 Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg Eppendorf, Hamburg
Kühlschränke	4° - Liebherr Comfort NoFrost	

Magnetrührer	MR 3001	Heidolph
Netzgeräte (Elektrophorese)	PowerPac HC	BioRad
pH-Meter	PB-11 Sartorius	Schott, Mainz
Pipetten	Eppendorf Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfen	accu-jet	BRAND, Bestenheid
Schüttler	Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
	Rocker 2D Digital	IKA
	Mini Rocker MR-1	Biosan
Spektralphotometer	Varioskan Lux	ThermoFisher, USA
Ultraschallprozessor	UP50H	Hielscher
Vortexer	MS2 Minishaker	
Waagen	QUINTIX124-1S	Sartorius
	PL1200	
Wasseraufbereitung	MilliQ	Millipore
Western Blot-System	Trans-Blot Turbo	BioRad
Zentrifugen	5424 R	Eppendorf, Hamburg
	5415 D	

3.4 Puffer und Lösungen für die Proteinanalytik

10x Tris-Buffered-Saline-Puffer (TBS):

- 1,37 M NaCl
- 27 mM KCl
- 0,25 M Tris
- pH 7,4

1x Tris-Buffered-Saline-Puffer mit Tween 20 (TBST)

- 1x Tris-Buffered-Saline-Puffer (TBS):
- 0,1% v/v Tween 20

3x Lysispuffer

- 10% (w/v) Saccharose
- 2% (w/v) SDS
- 62,5 mM Tris-HCl
- pH 7,4

SDS-freies Lysispuffer

- 100 mM Tris
- pH 7,4

Bis-Tris-Puffer

- 1,25 M Bis-Tris
- pH 6,5-6,8

10% Trenngel für die SDS-PAGE

- 4,9 mL deionisiertes H₂O
- 3 mL Bis-Tris-Puffer
- 2,6 mL Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
- 74 µL 10% APS
- 20 µL TEMED

Sammelgel für die SDS-PAGE

- 3,2 mL deionisiertes H₂O
- 1,5 mL Bis-Tris-Puffer
- 550 µL Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)
- 84 µL 10% APS
- 42 µL TEMED

4x Laufpuffer für die SDS-PAGE

- 20x MES-Puffer (kommerziell, Invitrogen NP0002)

Probepuffer

- 48 mM Tris-HCl
- 152 mM Tris-Base
- 40% (v/v) Glycerol
- 20 mM EDTA
- 0.08% (w/v) Bromphenolblau
- 8% (w/v) SDS
- 20% (v/v) 2-Mercaptoethanol
- pH 6,8

Transferpuffer

- 20% (v/v) EtOH
- 60% (v/v) VE H₂O
- 20% (v/v) 5x Trans-Blot Turbo Puffer (kommerziell, BioRad #10026938)

1x Ponceau S

- 5% (v/v) Essigsäure
- 0,2% (w/v) Ponceau S

Blockreagenz für den Western Blot

- 5% (w/v) entfettetes Trockenmilchpulver in 1x TBST

ECL A-Lösung

- 0,1 M Tris
- 0,05 (w/v) Luminol

ECL B-Lösung

- 0,11% (w/v) *p*-Cumarinsäure in DMSO

3.5 Liste der Antikörper und rekombinanter Proteine

Tabelle 3: Liste der verwendeten Antikörper und rekombinanter Proteine.

Target	Hersteller/Artikel	Wirt	Klonalität	Verdünnung
anti-mt-ND1	Abcam #181848	Kaninchen	Monoklonal	1:3000
anti-mt-ND1	Abclonal #A18316	Kaninchen	Polyklonal	1:1000
anti-Tubulin	BioRad #MCA77P	Ratte	Monoklonal	1:4000
anti-PCMT1	Antibodies-Online ABIN6578717	Kaninchen	Polyklonal	1:1000
anti-mt-ND4	Sigma-Aldrich HPA053928	Kaninchen	Polyklonal	1:250
OXPHOS: Ndufb8 SDHB UQCRC2 MTCO1 ATP5A	Abcam #110413	Maus	Monoklonal	1:250
anti-TOM20	Cell Signaling 42406S	Kaninchen	Monoklonal	1:1000
Anti-Maus-HRP	Jackson ImmunoResearch 711-035-151	Esel	Polyklonal	1:10000
Anti-Rabbit-HRP	Jackson ImmunoResearch 711-035-152	Esel	Polyklonal	1:10000
Anti-Rat-HRP	Jackson ImmunoResearch 712-005-150	Esel	Polyklonal	1:10000
PIMT	MyBioSource MBS144034	Human, exprimiert in <i>E.coli</i>	-	-

3.6 Liste der verwendeten EDV-Programme und Datenbanken

Programm	Anwendung	Referenz/Firma
Gene Expression Omnibus	Datenbank für RNA-Sequenzierungen	
GraphPad PRISM 10.2.2	Grapherstellung	
MitoCarta 3.0	Datenbank für Mitoproteine	Rath et al., 2020
Mouse Genome Informatics	Datenbank für Mausgene	Baldarelli., et al, 2024
SynGO	Datenbank für Genbezeichnungen	Koopmann et al., 2019
Protein Data Bank (PDB)	Datenbank für Proteinstrukturen	
PyMOL	Strukturanalyse	
Rat Genome Database	Datenbank für das Rattengenom	Vedi M., et al, 2023
SPSS 27	Statistik	
STRING	Protein-Protein Interaktionen	Szklarczyk et al., 2023

4. Methoden

4.1 Nasschemische Methoden

4.1.1 Vorbereitung von Gewebe für Proteinanalytik

Das Gewebe (Leber und Herz) wurde zur Präparation für biochemische Analysen auf Trockeneis gelagert. Anschließend wurde in einer Schale ein kleines Stück (ca. 50-100 mg) Gewebe abgeschnitten und sofort mithilfe von 400 μ L SDS-freiem Lysispuffer mithilfe eines Glasstabes manuell homogenisiert. Danach wurde das Homogenisat bei 80% Amplitude für 2 Sekunden sonifiziert. Das Sonifikat wurde mit 1 μ L 50x Proteaseinhibitor versetzt und im Gefrierschrank bis zur Benutzung gelagert.

4.1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Assays nach Smith (Smith et al., **1985**). Das BCA (Bichinonsäure) ist eine organische Säure, welche in der Lage ist, an der Peptidbindung gebundene Kupferionen zu reduzieren, wobei durch Komplexbildung ein blau-violetter Komplex entsteht, dessen Intensität proportional zu Proteinmenge ist. Anschließend kann die Intensität des Komplexes bei 562 nm bestimmt werden.

4.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Das Gel für die SDS-PAGE wurde entsprechend Materialteil 3.4 zusammengesetzt. Die Proben (15 μ g Protein) für die SDS-PAGE wurden mit vierfachem Lämmli-puffer versetzt und anschließend bei 95° sieben Minuten lang erhitzt. Anschließend wurden die Proben fünf Sekunden bei 8000 rpm zentrifugiert, um das Kondensat mit der Probe zu vereinen. Anschließend wurden die Proben und der Proteinmarker in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese wurde bei 80 Volt gestartet. Nach einer halben Stunde wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht und bis zum Ende der Elektrophorese bei diesem Wert belassen.

4.1.4 Western Blot und Immunodetektion

Der Transfer der nach Molekulargewicht aufgetrennten Proteine erfolgte mittels Western Blot Verfahren (Burnette et al., **1981**). Hierbei werden die Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine nicht-modifizierte Nitrocellulosemembran (0,2 mm, Amersham) mittels elektrischer Spannung

übertragen, wobei die SDS-haltigen, negativ geladenen Proteine zur Anode wandern, an der sich die Membran befindet. Für diese Arbeit wurde das Semi-Dry-Verfahren mit dem Turbo-Blot System von BioRad verwendet. Der Blotsandwich wurde nach Angaben des Herstellers zusammengebaut und bei 25 Volt und 1,3 Ampere für 12 Minuten lafengelassen. Die Überprüfung des Übertrags erfolgte mittels Ponceau-Färbung (Sander et al., **2019**); die Membran wurde fünf Minuten mit dem Farbstoff inkubiert und anschließend fotografiert. Der Farbstoff wurde durch Waschen mit TBST entfernt. Die Membran wurde mit entfetteter Milch (5%) geblockt, um die non-spezifische Bindung von Antikörpern an die Membran zu verhindern. Anschließend wurde der primäre Antikörper über Nacht auf die Membran gegeben und unter moderaten Schütteln für 16 Stunden bei 4° C inkubiert. Danach wurde der Antikörper von der Membran entfernt, und es wurde dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde wurde die Membran dreimal zehn Minuten mit TBST gewaschen, und anschließend wurde das gewünschte Protein mithilfe 500 µL der H₂O₂-haltigen Chemilumineszenz-Lösung (ECL) im Chemilumineszenz-Detektor detektiert.

4.1.5 Antikörper-Sensitivitäts-Test

Es wurden identische Proben (15 µg SDS-freien Leberlysats des CF8-Tieres) aufgetrennt und die Proteine wurden anschließend mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach der Ponceau-Färbung wurden die einzelnen Streifen mit einem Skalpell aus der Membran geschnitten. Während unspezifische Bindestellen der einzelnen Streifen in non-fat milk (5%) blockiert wurden, wurden die einzelnen Antikörper-Blockpeptid Lösungen (1mL) vorbereitet.

Diese sollten im Stoffmengenverhältnis zwischen 1:1 und 1:100.000 angesetzt werden. Dafür wurde zuerst die Stoffmenge des Antikörpers unter der Berücksichtigung der Arbeitsverdünnung von 1:2000, des molaren Gewichts eines IgG-Antikörpers von 150.000 g/mol, der molaren Masse des Blockpeptides von 1873,51 g/mol und der Konzentration des Antikörpers von 0,115 mg/mL berechnet.

$$V = \frac{1}{2000} \text{ mL} = \frac{1}{2} \mu\text{L} = 500 \text{ nL}$$

$$c(\text{AK}) = 0,115 \frac{\text{mg}}{\text{mL}} = 115 \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}} = 115 \frac{\text{pg}}{\text{nL}}$$

$$m(\text{AK im Röhrchen}) = V(\text{AK}) * c(\text{AK}) = 500 \text{ nL} * 112 \frac{\text{pg}}{\text{nL}} = 57500 \text{ pg} = 57,5 \text{ ng}$$

$$n(\text{AK}) = \frac{m(\text{AK})}{M(\text{AK})} = \frac{57,5 \text{ ng}}{150.000 \frac{\text{g}}{\text{mol}}} = 383 \text{ fmol}$$

Da jeder Antikörper zwei Bindestellen besitzt, ergibt sich eine Molarität der Bindestellen von:

$$n(\text{Bindestellen}) = 383 \text{ fmol} * 2 = 766 \text{ fmol}$$

Die entsprechende Menge an „blocking peptide“ ergibt entsprechend:

$$n(\text{blocking peptide}) = n(\text{Bindestellen}) = 766 \text{ fmol}$$

$$m(\text{blocking peptide}) = n(\text{blocking peptide}) * M(\text{blocking peptide})$$

$$m(\text{blocking peptide}) = 766 \text{ fmol} * 1873,51 \frac{\text{g}}{\text{mol}} = 1,436 \text{ ng}$$

Somit ergaben sich folgende Mengen an Blockpeptid für den Assay, welche über eine Verdünnungsreihe realisiert wurden.

Tabelle 4: Blockpeptidmasse für jedes verwendete Verhältnis.

Verhältnis AK:Peptid	Peptidmasse
1:1	1,436 ng
1:10	14,36 ng
1:100	143,6 ng
1:1000	1,436 µg
1:10.000	14,36 µg
1:100.000	143,6 µg

Die angesetzten AK-Peptid Gemische wurden eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, damit das Blockpeptid an den AK binden könnte. Anschließend wurden die blockierten Blotstreifen in die Röhrchen (15 mL, Greiner) mit dem AK-Peptid Gemisch überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Streifen wurden nach der Inkubation wieder zusammengesetzt und auf eine Folie geklebt, zum Zwecke der einheitlichen Inkubation mit dem sekundärem AK. Die anschließende Durchführung entsprach einem gewöhnlichen Western Blot Vorgang.

4.1.6 PIMT-Isoaspartat-Reparatur-Assay

Um die Isoaspartat-Modifikation am ND1-Peptid mittels PIMT aufzudecken, wurden identische Proben je 15 µg vom SDS-freien MR8-Leberlysate mit 1 µL 50x Protease Inhibitor Cocktail (cOmplete, EDTA-frei, Roche) versetzt. Daraufhin wurden verschiedene Chemikalien zu jedem Ansatz dazugegeben (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Pipetierschema der Reaktionsansätze für den Reparaturassay.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Met	-	3,6 mM	3,6 mM	4x3,6 mM	-	-	-	-	3,6 mM
SAM	-	-	-	-	-	36µM	36µM	4x36 µM	36µM
PIMT	-	-	0,8 µg	0,8 µg	-	-	0,8 µg	3,2µg	0,8 µg

Das jeweilige Reaktionsgemisch wurde auf 25 µL mit Reaktionspuffer (50 mM HEPES, 1 mM EGTA) aufgefüllt und die Reaktionsgemische wurden bei 30 °C für vier Stunden unter moderatem Schütteln (550 rpm) inkubiert. Bei den Proben 4 und 8 erfolgte jede Stunde die Zugabe von 3,6 mM Met oder 36 µM SAM und 0,8 µg PIMT. Nach vier Stunden wurden die Proben mit 4x Lämmli-Puffer versetzt und bei 95 °C für sieben Minuten aufgeköcht. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und Immunodetektion mittels Western Blot.

4.2 Bioinformatische Methoden

4.2.1 Datenerfassung publizierter Datensätze

Die Daten der Transkriptom- und Metabolomanalysen wurden aus publizierten Studien entnommen. Im Detail wurden vier zu analysierenden Transkriptomdatensätze zur Methionin-Restriktion aus der Datenbank *Gene Expression Omnibus* (GEO) (Barrett et al., **2013**) (ncbi.nlm.nih.gov/geo) gefunden und heruntergeladen. Die Datensätze sind: GEO117188 (Bárcena et al., **2018**), GEO28482 (Boudreau et al., **2010**), GEO92463 (Forney et al., **2017**), und ein nicht hinterlegter Datensatz, der von den Autoren der Originalstudie erhalten wurde (Perrone et al., **2013**). Mit Ausnahme von GEO92463 (Forney et al., **2017**), das bereits von Autoren statistisch ausgewertet wurde, wurden alle Datensätze mit GEO2R (ncbi.nlm.nih.gov/geo/geo2r) unter Anwendung der Benjamini-Hochberg-Korrektur für Mehrfachtests auf differenziell exprimierte Gene analysiert. Gene, die korrigierte (engl.: *adjusted*) p-Werte unterhalb eines Schwellenwerts von $p > 0,05$ aufwiesen, wurden als differenziell exprimiert definiert. Es wurde keine Mindestschwelle für den Fold Change (FC) angewendet. Relevante Informationen zu den Studien, aus den die Datensätze stammen, sind in der nachfolgenden Tabelle 6 zu finden.

Tabelle 6: Überblick über die vier in dieser Arbeit analysierten Met-Restriktionsstudien.

Acronym	Mouse 3M 86%	Rat 20M 80%	Mouse 3M 80%	Rat 3M 80%
Referenz	Bárcena et al., 2018	Boudreau et al., 2010	Forney et al., 2017	Perrone et al., 2012
GEO-Zugang	117188	28482	92463	n.a.
Organismus	WT Maus (C57BL/6N)	Fischer 344 Ratte	WT Maus (C57BL6/J)	Fischer 344 Ratte
Met-Restriktion in %	86	80	80	80
Diätdauer in Tagen	68	600	70-84	90
Fastungszeit vorm Tod	6	n.a.	n.a.	4
Sequenzierungsmethode	Microarray	Microarray	RNA-Seq	Microarray
Benutzung von GEO2R	Ja	Ja	No	No
Anzahl der DEGs	2041	4456	1768	2262

Zusätzliche Studien zur Transkriptommodulation wurden für den Vergleich mit den Methioninrestriktionsdatensätzen entsprechend zusammengestellt und aufbereitet. Datensätze, die die Auswirkungen eines genetischen Knock-outs von fünf relevanten mitochondrialen Proteinen einschließlich der Mitochondrien-RNA-Polymerase (Polrmt) in der Maus beschreiben, wurden aus GEO96518 (Kühl et al., **2017**) bezogen. Transkriptomdaten, die die Auswirkungen der pharmakologischen Wirkstoffe Metformin (ein Biguanid-Antidiabetikum), Imeglimin (ein Metformin-verwandtes Antidiabetikum) und 5-Aminoimidazol-4-carboxamid-1- β -D-ribofuranosid (AICAR, ein Aktivator der AMP-Kinase und Stoffwechselmodulator) in der Zellkultur darstellen, wurden über GEO208245 (Hozumi et al., **2022**) bezogen.

Darüber hinaus wurde die transkriptomische Landschaft verschiedener zellulärer Stressauslöser untersucht, darunter die des Rotenons, eines prooxidativen Komplex-I-Inhibitors (GEO176305) (Schulz et al., **2022**), die von 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP), einen weiteren Komplex-I-Inhibitors (GSE229460) (Baeken et al., **2023**), von Tunicamycins, einen Inhibitor der N-ständigen Glykosylierung (GEO226549) (Yoon et al., **2023**), von Rapamycin, einen Inhibitor der mTOR-Kinase (GEO48334) (Fok et al., **2014**), und Fenofibrat, einen lipidsenkenden PPAR α -Agonisten (GEO67796) (Fergusson et al., **2015**). Die Daten zu Rapamycin und Fenofibrat stammen aus *in vivo*-Experimenten an Mäusen, die anderen Wirkstoffe wurden in Zellkulturen *in vitro* angewendet. Daten zur transkriptomischen Modulation durch eine aminosäurearme Diät *in vivo* stammten aus GEO241904 (Green et al., **2023**), Daten aus Patientenzellen mit Atmungskettenkomplex I-Mangel *ex vivo* aus GEO65634 (van der Lee et al., **2015**).

Für die Ausarbeitung der von MetR verursachten metabolischen Auswirkungen wurden RNA-Seq-Datensätze aus MPP+-behandelten Neuronen (Baeken et al., **2023**), Metformin-behandelten Hepatocyten (HepG2, Hozumi et al., **2022**) und Met-R Ratten (Perrone et al., **2013**) genommen.

4.2.2 Auswertung der Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie wurde mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Ilka Wittig (Universitätsmedizin Frankfurt) durchgeführt. Für die Vorbereitung der Proben wurden aus jeweiligem Gewebe (Leber oder Herz) die Mitochondrien, wie in Literatur beschrieben, isoliert. Diese isolierten Mitochondrien wurden mittels einer Blue-Native-PAGE aufgetrennt. Aus dieser wurden zwei Banden herausgeschnitten, die den Komplex I und den Superkomplex I+III repräsentieren, siehe Abbildung 6.

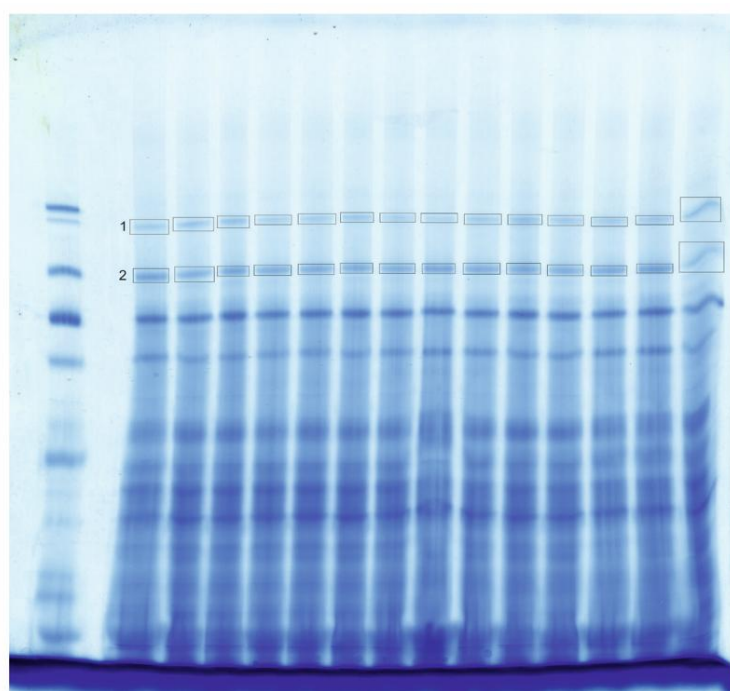


Abbildung 6: Schnittvorlage für die Massenspektrometrie aus einem Blue-Native Gel. Als Marker wurden Mitochondrien aus Rinderherz eingesetzt. Die ersten sieben Banden nach dem Marker entsprechen den sieben kontrollgefütterten Tieren, während die letzten sieben Banden aus den Methionin-restringierten Tieren kommen. Die Bande 1 entspricht dem Superkomplex I+III, und die Bande 2 dem Komplex I. Eigentum von PD. Dr. Ilka Wittig.

Die aus dem Gel geschnittenen Banden wurden mit Iodacetamid inkubiert, um Cysteinreste zu alkylieren, damit eine spontane Oxidation nicht stattfindet. Anschließend fand der tryptische Verdau statt. Die Proben wurden im Q Exactive™ Plus Hybrid Quadrupol-Orbitrap™ Massenspektrometer analysiert.

Die massenspektrometrische Auswertung erfolgte mithilfe des Programms Peaks X Pro bzw. Peaks 11. Zur Quantifizierung der Proteine wurde eine labelfreie Quantifizierungsmethode (eng.: *label free quantification*) benutzt. Der Toleranzfehler für Massenbestimmung wurde auf 8 ppm und der entsprechende Fehler für die Verschiebung (*shift*) der Retentionszeit auf 2 min festgelegt.

Insgesamt ergaben sich 28 Proben, die untersucht wurden: Es wurde sieben Tiere pro Fütterungsmethode verwendet und aus jedem Gewebe wurden zwei Banden isoliert. Als

Referenzprobe wurde die Probe 14 durch automatische Auswahl des Programms bestimmt, ebenfalls wie die Übungsproben (*reference samples*) 24 und 26. Die Fehlertoleranz bei Identifikation des Proteins durch das Auswertungsprogramm betrug fünf Prozent und als Signifikanzmethode wurde PEAKSQ verwendet. Zur Normalisierung wurde die gesamte Anzahl an Ionen (*total ion count*) herangezogen.

4.3 Statistik

Für die statistische Auswertung der Western Blots wurde ein ungepaarter t-Test mit $n=7$ verwendet. Der Fehler der Messgröße war die Standardabweichung. Als Signifikanzgrenze wurde der p-Wert kleiner 0.05 genommen. Die statistische Analyse fand mit dem Programm GraphPad Prism 10 statt. In Analogie wurde auch bei dem PIMT-Isoasparat-Reparaturassay verfahren. Dabei wurden drei technischen Replikate verwendet.

Bei dem Vergleich zwischen den Transkriptomdaten und dem aufgestellten Konsensus-Datensatz wurde eine binomiale Verteilung eingesetzt, um zu überprüfen, ob die Anzahl der gleichregulierten Gene signifikant zur Anzahl der Gene insgesamt ist. Eine Binomialverteilung wurde eingesetzt, es in diesem Vergleich nur zwei Optionen gibt: entweder ist das Gen in beiden Fällen (Konsensus vs. ähnliches Modell) in die gleiche Richtung reguliert oder nicht. Für die Berechnung wurde folgender Code in Programmiersprache python geschrieben:

```
from scipy.stats import binom

def bnm_wahrs(n, k, p=0.5):
    return binom.pmf(k, n, p)

if __name__ == "__main__":
    n =
    k =
    print(bnm_wahrs (n, k))
```

Die Spearman-Korrelation wurde eingesetzt, um zu überprüfen, ob das Ranking der Expressionsänderung eines Gens im Konsensus-Datensatz tendentiell mit dem Ranking desselben Gens in einem anderen untersuchten Modell korreliert. Dabei liegt der Definitionsbereich der Werte zwischen 1 und -1, wobei 1 einer perfekten Korrelation, 0 keiner Korrelation und -1 einer perfekten gegenläufigen Korrelation entspricht. Es wird angenommen, dass Werte zwischen 0.3 und 0.5 für eine moderate Korrelation sprechen, während ein Wert über 0.5 eine starke Korrelation indiziert (Cohen, **1988**). Die Berechnung der Spearman-Korrelation und der zugehörigen p-Werte wurde mit dem Statistikprogramm SPSS27 durchgeführt.

5. Ergebnisse

5.1 Identifizierung neuer möglichen Ursachen des MetR-Phänotyps mittels Analyse von Transkriptomdaten

Zur Klärung der biochemischen Ursachen des MetR-Phänotyps wurden die bereits in der Literatur publizierten Transkriptom-Datensätze gesammelt und analysiert (s. Tabelle 6). Die Analyse begann mit dem Datensatz der 20-monatigen Fütterung, da von der längsten Fütterung die am stärksten ausgeprägten Effekte erwartet wurden. Der Datensatz der Langzeit-Methionin-Restriktion (Boudreau et al., **2010**) wurde manuell mittels Rat Gene 1.0 ST Array – Bibliothek erweitert. Zunächst wurden 2784 differentiell exprimierte Gene (DEG, eng.: *differentially expressed genes*) zu dem bestehenden Datensatz hinzugefügt, was insgesamt 4452 DEGs ergab, von denen 2021 hochreguliert und 2431 herunterreguliert waren. Es wurde eine GO (*Gene Ontology*) - Analyse nach Zellkompartimenten durchgeführt, um einen Einblick in möglicherweise durch MetR besonders betroffene Kompartimente zu erhalten. Das zelluläre Kompartiment mit der höchsten Anreicherung an DEGs war das Mitochondrium. Ebenfalls befanden sich der mitochondriale Teil (GO:0044429) und die mitochondriale Matrix (GO:0005759) unter den am stärksten signifikanten zehn Ergebnissen der GO-Analyse (Abb. 7 a, hervorgehoben in orange). Dieser Effekt war ausschließlich auf hochregulierte Gene zurückzuführen. Bei ausschließlicher Betrachtung auch nur dieser Gene zeigte die Analyse, dass das Mitochondrium und Mitochondrien-verwandte GO-Termini einer massiven Anreicherung an DEGs unterlagen; drei von zehn Kompartimenten waren im Mitochondrium angesiedelt. Dieser Trend war jedoch bei den herunterregulierten Genen nicht zu beobachten. Bemerkenswert ist, dass unter den ersten 10 herunterregulierten Kompartimenten keine mitochondrialen Einträge zu finden waren (Abb. 7 b).

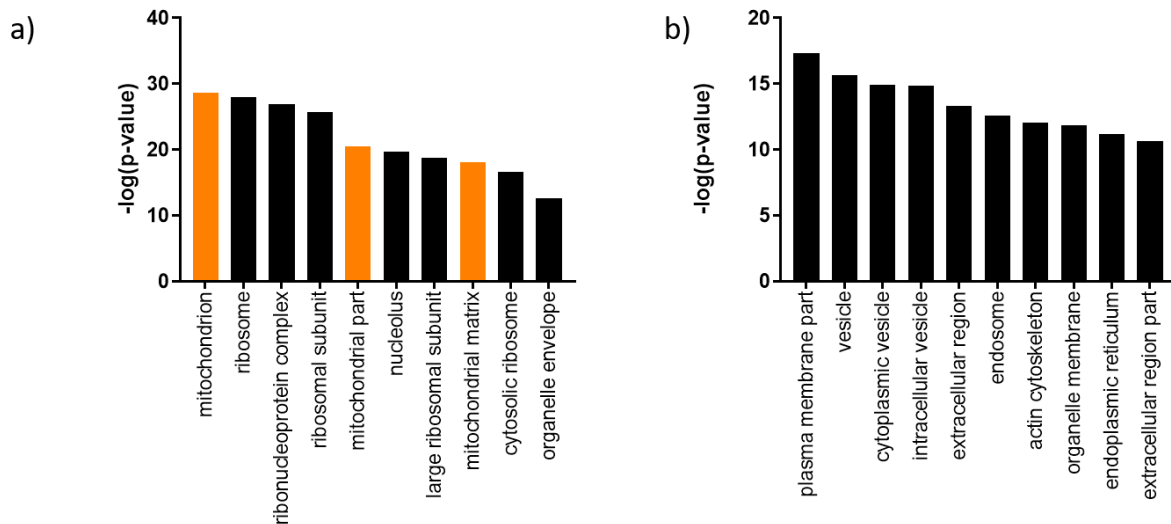


Abbildung 7: Betroffene Kompartimente durch eine Langzeit-MetR. In a) sind alle Kompartimente gezeigt, in b) nur die herunterregulierten. In orange sind die Mitochondrien-verwandte GO-Termini abgebildet. Die Analyse wurde durchgeführt mit Gene Ontology.

Um die Auswirkungen der MetR auf die Mitochondrien näher zu untersuchen, wurde MitoCarta 3.0 angewandt. MitoCarta 3.0 ist eine etablierte Datenbank, die speziell auf die mitochondriale Proteomik der Säugetiere ausgelegt ist, was sie von z.B. GO unterscheidet (Rath et al., 2020). Die Analyse der DEGs mit MitoCarta ergab 349 verschiedene in den Mitochondrien lokalisierte Transkripte, von den 122 herunterreguliert und 227 hochreguliert waren. Die herunterregulierten Transkripte gruppieren vorwiegend um Stoffwechselwege, wie die Pyruvatdehydrogenase (*Pdk1/2*, *Pdha1* und *Dlat*), die Fettsäurebiosynthese (*Acaca*, *Acacb*, *Fasn* und *Acs11*) und den Aminosäurestoffwechsel (*Suox* und *Got2*). Im Gegensatz dazu konzentrierten sich die hochregulierten mitochondrialen Transkripte in den frühen Stadien des Citratzyklus, insbesondere *Aco2*, *Idh3a*, *Dlst* und *Ogdh*. Es wurde eine starke Anreicherung in ATP-abhängigen Prozessen beobachtet, einschließlich der Chaperon-unterstützten Proteinfaltung und Peptidaseaktivität (*Hspe1*, *Hspd1*, *Clpp* und weitere) (Abb. 8a). Darüber hinaus war eine bemerkenswerte Hochregulierung der mitochondrialen Translationsmaschinerie (*Mrpl50*, *Mrpl15*, *Mrpl17* usw.) zu beobachten. Der MitoCarta-Gensatz (bestehend aus 349 mitochondrial lokalisierten Proteinen) wurde anschließend wiederum einer GO-Analyse nach biologischen Prozessen unterzogen. Nach Anwendung strenger Auswahlkriterien ($-\log(p\text{-Wert}) > 20$) wurden die GO-Termini "mitochondriale Translation" und "mitochondriale Genexpression" gefunden, als am stärksten angereichert waren. Darüber hinaus konnten weitere GO-Termini wie "mitochondriale Membranorganisation", "mitochondrialer Transport" und "mitochondriale Organisation" identifiziert werden, die 10-fach oder höher angereichert waren (Abb. 8 b). Somit lässt sich festhalten, dass das Mitochondrium und speziell die mitochondriale Translation unter einer langfristigen MetR erhöht waren.

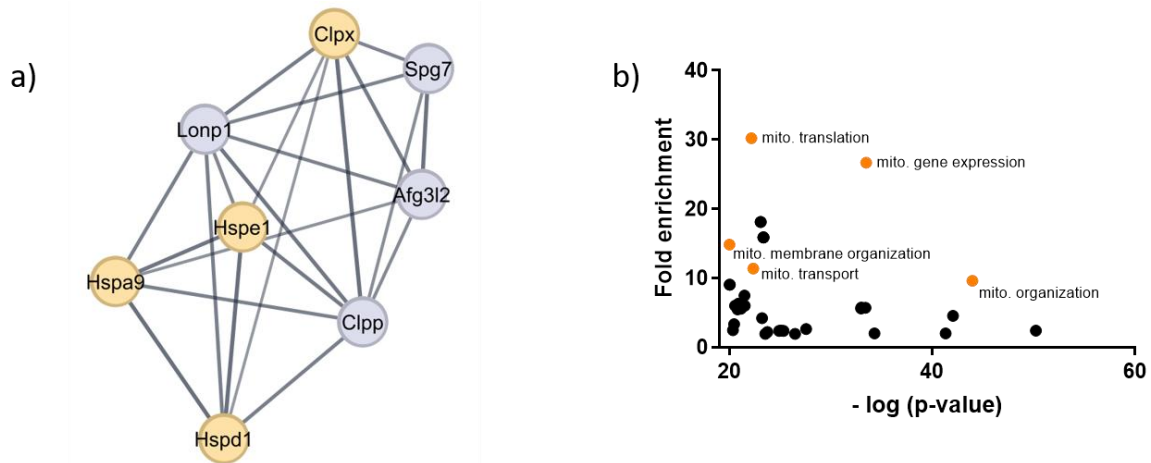


Abbildung 8: a) Ein funktionell prominenter Cluster aus signifikant erhöhten Genen, die zur mitochondrialen Qualitätskontrolle gehören. In gelb sind Chaperone, in blau Proteasen dargestellt. b) GO-Analyse der betroffenen zellulären Mechanismen. Die mit dem Mitochondrium in Verbindung stehenden Prozesse sind in orange markiert.

Nachdem die Analyse der MetR-Langzeitfütterung das Mitochondrium als das Kompartiment mit besonders starken Auswirkungen identifiziert hat, wurden die restlichen (Tabelle 6) publizierten Transkriptom-Datensätze herangezogen, um die Generalisierbarkeit der Befunde zu überprüfen. Die PCA (Hauptkomponentenanalyse, eng.: *principal component analysis*) wurde eingesetzt, um die Dimensionalität der zu analysierenden Daten zu reduzieren. Diese Analyse ergab, dass die Hauptkomponenten 1 und 2 zusammen fast 91 % der Varianz erklärten, was auf eine hohe Konvergenz der Daten hinweist (Abb. 9). Die Microarrays aus der gleichen 3-monatigen Fütterungsperiode (blau und grün), obgleich der unterschiedlichen Spezies, lagen dicht beieinander.

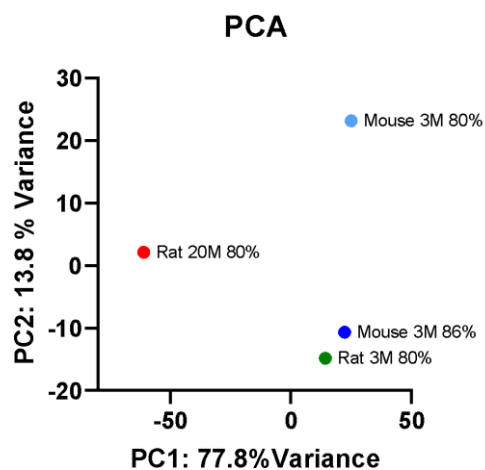


Abbildung 9: Hauptkomponentenanalyse der vier untersuchten Transkriptom-Datensätze (Tabelle 6). Jeder Datensatz trägt eigene Farbe: 3-monatige Behandlung der Mäuse auf 80% MetR ist in hellblau, 3-monatige Behandlung der Mäuse auf 86% MetR in blau, 3-monatige Behandlung der Ratten auf 80% MetR in grün und eine Langzeit-Fütterung der Ratten (20 Monate) in rot gezeigt.

Der Vergleich aller vier hepatischen Transkriptomdaten ergab 71 Gene, deren Expression in allen vier Modellen signifikant verändert war. Davon wiesen 58 eine konkordante Regulierung auf: 35 waren hochreguliert, und 23 herunterreguliert (Abb. 10a). Die zehn Gene mit der höchsten durchschnittlichen Expressionsveränderung (eng.: *Fold Change* (FC)) sind in Abb. 10 dargestellt; sechs von ihnen zeigten den stärksten Effekt bei der Langzeitbehandlung (violett).

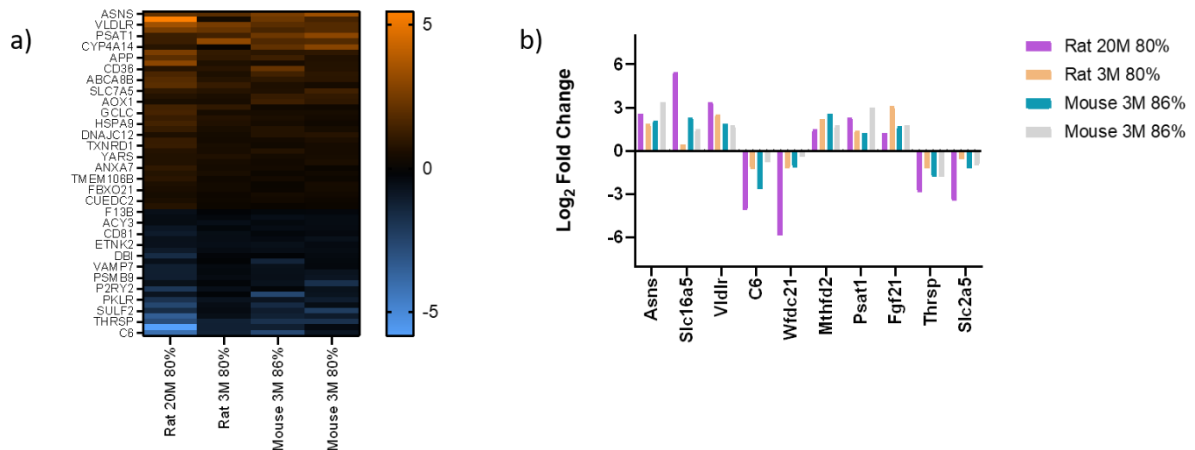


Abbildung 10: Heatmap-Darstellung (a) aller Gene, die in vier von vier Studien signifikant differentiell reguliert waren. Die Farbskala gibt die Expressionsveränderung der Gene in 2-er Potenzen an. In (b) sind die zehn Gene gezeigt, welche die höchste Effektstärke aufwiesen. Log₂FC gibt den Logarithmus der Genexpression zur Basis 2 an.

Darüber hinaus wurden 243 (von 348 insgesamt) signifikant regulierte Gene in drei von vier Datensätzen übereinstimmend hoch- oder herunterreguliert; 141 hochreguliert und 102 herunterreguliert (Abb 11a). Die zehn wichtigsten Gene mit der höchsten durchschnittlichen Änderungsgrad sind in Abb. 11b dargestellt.

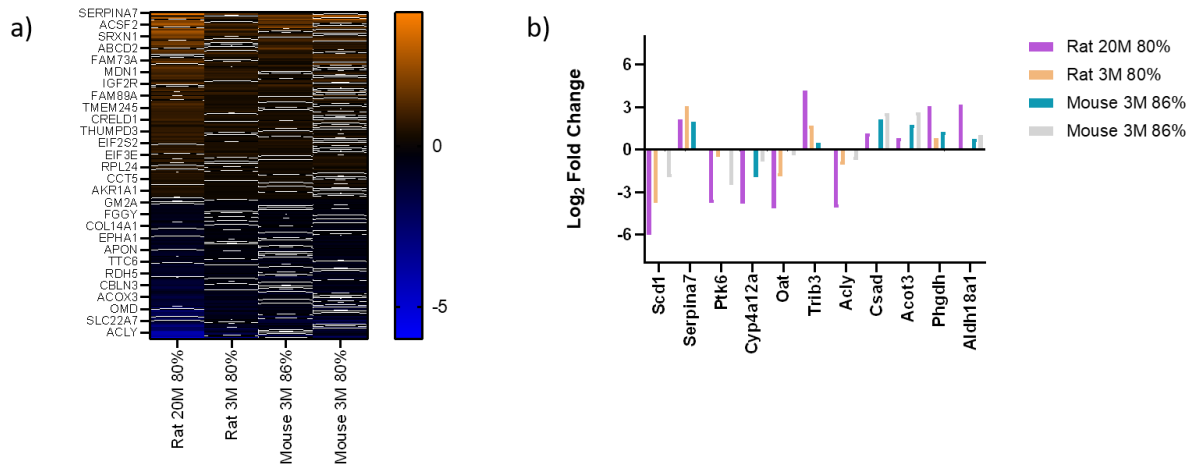


Abbildung 11: Heatmap-Darstellung (a) aller Gene, die in mindestens drei von vier Studien signifikant anders reguliert waren. Die Farbskala gibt die Expressionsveränderung der Gene in 2-er Potenzen an. In b) sind die zehn Gene gezeigt, welche die höchste Effektstärke aufwiesen, unabhängig davon, ob hoch- oder herunterreguliert.

Aus der Summe der 58 (4/4 Modelle) und 243 (3/4 Modelle) Genen ergab sich ein Datensatz, in welchem die vermeintlich wichtigsten Akteure der MetR zusammengefasst sind. Dieser Datensatz wird fortläufig als der Konsensus-Gensatz genannt. Der vollständige Konsensus-Datensatz ist im Anhang zu finden.

Die Summe der oben erwähnten Gene, die in 4/4 oder 3/4 Modellen signifikant und in die gleiche Richtung reguliert waren (Konsensus-Gensatz), wurden zusammen einer Protein-Protein-Interaktionsanalyse (PPI) unterzogen (Abb. 12). Mittels der PPI kann eine Vielzahl der Proteine gleichzeitig auf ihre „Verwandtschaft“ bzgl. der bekannten (experimentell bestimmt oder aus Datenbanken) und vermuteten (Genfusion oder genomische Nachbarschaft) Interaktionen untersucht werden. Falls solche „Verwandtschaften“ bestehen, ergeben sich Mengen der Proteine, welche als Cluster bezeichnet werden.

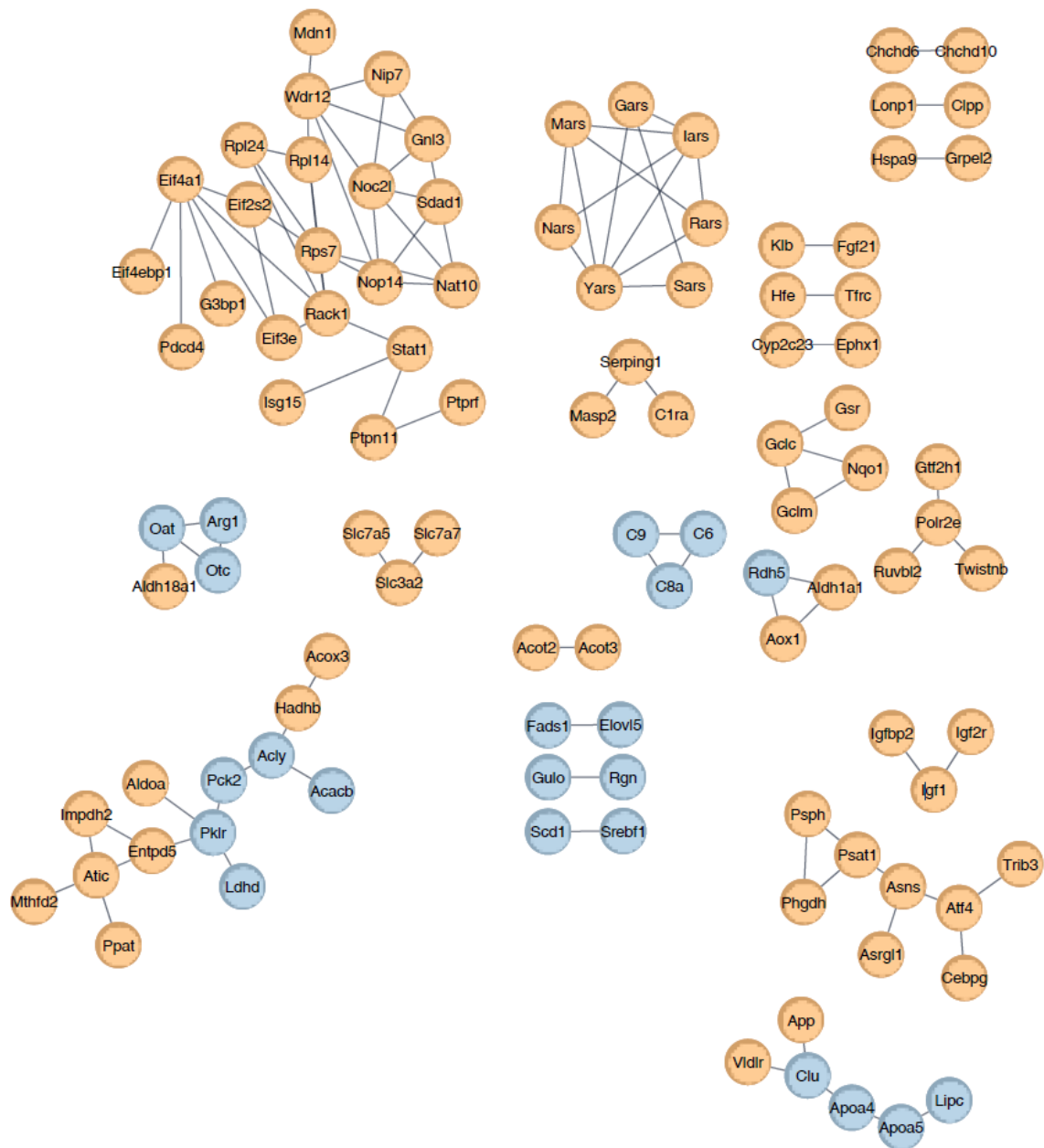


Abbildung 12: STRING-Protein-Protein-Interaktionsnetzwerk-Analyse der MetR-induzierten Veränderungen in der Leber. Es wurden nur Transkripte des Konsensus-Gensatzes berücksichtigt. Der Cut-off-Wert für „Interaktionen“ wurde auf $>0,9$ festgelegt, was dem üblichen Konfidenzniveau entspricht. Hochregulierte Gene sind in orange dargestellt, während herunterregulierte Gene in blau dargestellt sind. Cluster, die mit der Proteinbiosynthese zusammenhängen, sind in der oberen linken Ecke und oben in der Mitte platziert, wie ebenfalls die Gene der mitochondrialen Qualitätskontrolle. Regulatorischen Gene sind eher rechts angesiedelt, während Stoffwechselfene links unten platziert sind.

Ein Cluster mit vier Genen, die sich auf den Aminosäurestoffwechsel beziehen, umfasst das hochregulierte *Aldh18a1*- und herunterregulierte *Oat*-, *Otc*- und *Arg1*-Gene (links mittig). Die Enzyme *Oat* und *Aldh18a1* interagieren mit dem Metaboliten L-Glutamat-5-Semialdehyd (L-Glu-5-SA), einer Zwischenverbindung im Stoffwechsel von Ornithin, Prolin und Arginin. Des Weiteren lässt sich aus der Herabregulierung der mitochondrialen *Otc* ableiten, dass eine Umwandlung von Ornithin in Citrullin nur eingeschränkt stattfindet. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Mitochondrien Ornithin

benötigen oder dass der Harnstoffzyklus beeinträchtigt ist. Im Zusammenhang mit dem Aminosäurestoffwechsel sind die Gene *Psat1*, *Psph* und *Phgdh* zu nennen, welche den vollständigen Weg der Serin-Biogenese abbilden. Die Erhöhung der Expression der Transkripte ist mit dem erhöhten Spiegel an Serin in der Leber und im Serum von MetR-Tieren (Perrone et al., 2013) in Einklang zu bringen.

Eine weitere Gruppe von signifikant regulierten mitochondrialen Stoffwechselgenen bilden die Gene *Acacb*, *Acly*, *Hadhb* und *Pck2*. Die gegenläufige Regulation der Gene *Acacb*, *Acly* (runter) und *Hadhb* (hoch) erscheint sinnvoll, da sie an entgegengesetzten Prozessen innerhalb der Zelle beteiligt sind, nämlich an der Fettsäuresynthese und dem Fettsäureabbau. Diese Richtung der Regulierung deutet darauf hin, dass die Leber bei MetR hungert und daher auf Fettsäuren und die damit verbundene β -Oxidation angewiesen ist.

Ebenfalls konnten einige Akteure des thiolabhängigen Redoxsystems identifiziert werden. Die für die Glutathionbiosynthese verantwortlichen Gene *Gclm* und *Gclc* sind beide hochreguliert. Neben *Gsr*, das für die Reduktion des oxidierten Glutathions im Zytosol verantwortlich ist, sind die Gene *Txnrd1* und *Srxn1* hochreguliert, die für weitere antioxidative *Nrf2*-abhängige Akteure wie Thioredoxin und Peroxiredoxin kodieren. Ein weiteres, *Nrf2*-abhängiges Gen ist das *Nqo1*, welches ebenfalls durch MetR-Behandlungen hochreguliert wurde.

Ein weiteres bemerkenswerteres Gencluster betrifft eine apparent erhöhte Translationsaktivität. Zunächst ist ein Anstieg der Transkription mehrerer Aminosäure-tRNA-Synthasen, wie beispielsweise derjenigen für Arginin, Tryptophan, Glycin, Isoleucin, Asparagin und Methionin zu beobachten. Des Weiteren ist die Expression von Mitgliedern der Familie der eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren (Eif), wie *Eif2s2*, *Eif4a1* und *Eif4bp1*, erhöht. Darüber hinaus sind die Transkripte spezifischer RNAs innerhalb der ribosomalen Untereinheiten (wie *Rps7* für die 40S-, und *Rpl14* und *Rpl24* für die 60S-Untereinheit) hochreguliert. Des Weiteren konnte die Hochregulation verschiedener anderer Faktoren, die mit der ribosomalen Neogenese in Verbindung stehen, wie *Nop14*, *Wdr12*, *Nip7* und *Sdad1*, nachgewiesen werden. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass die Methioninrestriktion zu einer deutlichen Induktion der Translationsmaschinerie führt, möglicherweise als eine kompensatorische Antwort.

Die Gene *Ppat* und *Atic*, die für die Initiation der IMP (Inosinmonophosphat)-Biosynthese entscheidend und für die Biosynthese von Nukleotiden allgemein unerlässlich sind, waren hochreguliert. In ihrer Gesamtheit spielen diese Gene eine entscheidende Rolle bei der IMP-Biosynthese. Dies deutet auf eine potenzielle Begünstigung der GMP-Synthese hin, die durch eine Erhöhung des Gens *Impdh2* in drei Studien ebenfalls gezeigt ist, welche allerdings unter dem angegebenen Schwellenwert von 90 % lag. GMP ist das Folgeprodukt der XMP-Synthese, die wiederum durch MetR gesteuert wird, was in den

Metabolomdaten zu erkennen ist (Perrone et al., **2012**). Das GTP ist unerlässlich für die Translation; somit kann eine vermehrte Synthese von GTP zum Zwecke der erhöhten Translation dienen.

Eine neue und unerwartete Auswirkung der Methioninrestriktion manifestiert sich im Komplementsystem. *C6*, *C8a* und *C9*, die für die Bestandteile des membranangreifenden Komplexes kodieren, wurden im Vergleich zur Kontrolldiät signifikant herunterreguliert. Es ist bemerkenswert, dass *C9* das Protein ist, das in einer Studie im Serum von 1196 langlebigen Männern am stärksten herunterreguliert war (Orwoll et al., **2020**). Diese Tatsache könnte zur Klärung der MetR-induzierten Langlebigkeit beitragen.

Ebenfalls war eine Erhöhung der Transkriptionsfaktoren-RNAs (*Atf4*, *Atf5* und *Cebpg*) zu vernehmen. Obwohl *Atf4* bereits als einer der wichtigsten Regulatoren der Methioninrestriktion bekannt ist (Stone et al., **2021**), blieb die Rolle von *Atf5* bisher verborgen. *Atf5* ist ein bekannter Hauptregulator der sogenannten mtUPR (eng.: *mitochondrial unfolded protein response*) und ist ein Upstream-Aktivator von *Hspd1* und *Lonp1* (Sears et al., **2017**). Bemerkenswerterweise waren auch *Lonp1* und *Clpp* Gegenstand einer Hochregulierung. Im Einklang damit stand die Hochregulierung von *Hspa9* und *Grpel2*, was die Bedeutung der mitochondrialen Qualitätskontrolle unter Methioninrestriktionsbedingungen weiterhin unterstreicht.

Zur ergänzenden Analyse des Konsensus-Gensets wurde ein Text-Mining-Ansatz verwendet, der den PubMed-Publikationsalgorithmus der STRING-Datenbank nutzt (Szklarczyk et al., **2023**). Dieser Algorithmus durchsucht systematisch den gesamten Bestand an PubMed-Publikationen, um Literatur mit denselben Genen zu identifizieren, die dem Algorithmus übermittelt wurden. Dies ist ein üblicher Ansatz der Hypothesenvalidierung.

Nach Übermittlung des Konsensus-Gensatzes fand der Algorithmus eine Reihe von Veröffentlichungen, die Hinweise auf eine mitochondriale Beteiligung enthielten. Die Suche ergab vier Veröffentlichungen mit hoher Anreicherung, die Einblicke in die potenzielle Rolle des Mitochondriums im Zusammenhang mit dem übermittelten Gensatz boten. Zusätzlich zu einer bereits bekannten MetR-Veröffentlichung (Fang et al., **2021**) wurden drei weitere Publikationen gefunden, die Hinweise für die Beteiligung des Mitochondriums am MetR-Phänotyp liefern, da es deutliche, signifikante ($p > 0,01$) Überschneidungen in den berichteten Gensignaturen gab. Diese drei Publikationen tragen die folgenden Titel und sind in der Tabelle 7 zusammengefasst:

1. Mitochondrial dysfunction compromises ciliary homeostasis in astrocytes. (Ignatenko et al., **2023**)
2. Metabolic shift underlies recovery in reversible infantile respiratory chain deficiency. (Hathazi et al., **2020**)

3. Comparative multi-omic analyses of cardiac mitochondrial stress in three mouse models of frataxin deficiency (Sayles et al., 2023)

Tabelle 7: Ergebnisse des Textmining-Ansatzes von StringDB. Dem Textminingprogramm wurde der gesamte Konsensus-Gensatz gegeben, woraufhin drei Publikationen mit sich signifikant überschneidenden Gensätzen identifiziert wurden. In fett sind Gene dargestellt, welche in allen drei Publikationen (und in dem Konsensus-Gensatz) vorkamen.

Publikation	1 (Ignatenko et al.)	2 (Hathazi et al.)	3 (Sayles et al.)
Anreicherung	7.26-fach	6.19-fach	6.07-fach
p-Wert	5.80E-03	6.80E-03	8.40E-03
Überschneidende Gene	7	9	9
Gennamen	Atf5 Phgdh Fgf21 Psat1 Mthfd2 Trib3 Asns	Atf5 Pck2 Slc7a1 Acsf2 Phgdh Fgf21 Psat1 Trib3 Asns	Atf4 Atf5 Trfc Phgdh Fgf21 Psat1 Mthfd2 Trib3 Asns

Ebenfalls ist die Art der gemeinsamen Gene interessant. Die Gensignatur ist sehr ähnlich: Sechs Gene sind in allen drei Publikationen (und MetR) vorhanden: *Asns*, *Trib3*, *Psat1*, *Fgf21*, *Phgdh* und *Atf5*, was ein weiterer Hinweis für eine mögliche Beteiligung der mitochondrialen Qualitätskontrolle während MetR ist, da *Atf5* als ein spezifisches Mito-Stress-Signal interpretiert werden kann.

Es hat sich bereits die Erkenntnis herauskristallisiert, dass die MetR zu einer Erhöhung der mitochondrialen Translation führt. Die mitochondriale Translation ist wiederum an die mitochondriale DNA geknüpft, welche die Komponenten der oxidativen Phosphorylierung kodiert. Im nächsten Schritt soll der Konsensus-Gensatz mit fünf KO-Modellen verglichen werden, welche den mitochondrialen DNA-Haushalt betreffen. Es handelt sich um die mitochondrialen Regulatoren *Lrprrc*, *Mtef4*, *Polrmt*, *Tfam* und *Twinkle* (s. Tabelle 8).

Die Analyse ergab, dass die zelluläre transkriptomische Antwort, die durch Knockouts ausgelöst wurde, eine hohe Übereinstimmung mit aufgestelltem Konsensus-Gendatensatz aufwies. In allen paarweise verglichenen Modellen (MetR vs KO) konnten zwischen 57 und 83 überlappende Gene identifiziert werden (Tabelle 8). Eine weitgehende Übereinstimmung der überlappenden Gene (die sowohl Teil des transkriptomischen Profils von MetR als auch des analysierten Modells waren) konnte festgestellt werden. Diese waren entweder beide hoch-, oder beide herunterreguliert. Darüber hinaus wurde eine rangbasierte Korrelation untersucht, die sogenannte Spearman-Korrelation. Die mitochondrialen Knock-out-Modelle wiesen im Vergleich zum aufgestellten Konsensus-Modell eine starke Korrelation

auf ($p > 0,6$). Diese Resultate stützen die These, dass die Methioninrestriktion einen Einfluss auf das Mitochondrium, insbesondere auf den OXPHOS-Komplex, ausübt. Die mitochondriale DNA ist nämlich in erster Linie an der Biosynthese der Kernkomponenten des OXPHOS beteiligt.

Tabelle 8: Vergleichende Analyse des Konsensus-Datensatzes mit den Knock-out-Genen der mitochondrialen DNA-Machinerye (*Lrpprc*, *Mtef4*, *Polrmt*, *Tfam*, *Twinkle*). Die Tabelle zeigt die Anzahl der gemeinsamen Gene und die Anzahl der übereinstimmenden Regulationen aus dem MetR-Datensatz im Vergleich zu den ausgewählten mitochondrialen Knockout-Genen. Ebenfalls ist die Spearman-Korrelation mit den entsprechenden p-Werten gezeigt.

Knock-out Gen	Funktion	Anzahl der gemeinsamen (mit MetR) Gene	Anzahl der gleichsinnig regulierten Gene	p-Wert binomial	Spearman's rho	p-Wert Spearman
<i>Lrpprc</i>	RNA Stabilität	59	54	8.5E-13	0,688	2,4E-9
<i>Mtef4</i>	Translation	83	75	4.5E-16	0,658	3,7E-8
<i>Polrmt</i>	Transkription	80	77	<1E-22	0,617	7,2E-8
<i>Tfam</i>	Aufrechterhaltung	64	58	4.5E-13	0,694	1,3E-12
<i>Twinkle</i>	Replikation	57	54	1.2E-14	0,579	1,3E-8

Mehr als die Hälfte der von der mtDNA kodierten Proteine stellen die Untereinheiten von Komplex I dar. Basierend auf dieser Tatsache wurde zunächst ein möglicher Zusammenhang zwischen Methionin(mangel) und den Primärstrukturen der Komplexe der Atmungskette untersucht. Methionin ist in den mitochondrial-kodierten Untereinheiten um einen Faktor von etwa 3 bis 5 im Vergleich zu kernkodierten Proteinen angereichert (Tabelle 9). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Verfügbarkeit von Methionin von wesentlicher Bedeutung für die mitochondriale Translation ist.

Tabelle 9: Anteil an Methionin (in Prozent) in mitochondrial-kodierten Untereinheiten der Atmungskette verglichen mit durchschnittlichen Methioninanteil der nukleär-kodierten Proteine in fünf Spezies.

Complex Spezies	I 7 UE ~2100 AAs	III 1 UE ~380 AAs	IV 3 UE ~1000 AAs	V 2 (1) UE ~290 AAs	Durchschnitt in kernkodierten Proteinen
<i>Rattus norvegicus</i>	6.85	3.16	5.19	5.80	2.25
<i>Mus musculus</i>	7.47	4.99	5.59	5.80	2.23
<i>Homo sapiens</i>	5.77	3.97	5.30	6.12	2.14
<i>Drosophila melanogaster</i>	7.86	3.17	4.00	7.22	2.34
<i>C. elegans</i>	6.19	5.14	4.25	5.53	2.62

Nachdem obige Hinweise darauf gefunden worden waren, dass Methionin eine besondere Rolle bei mitochondrial-kodierten Proteinen spielen könnte, sollte das aufgestellte MetR-Konsensus-Modell,

ähnlich wie zuvor, mit anderen verwandten pharmakologischen oder ernährungsbasierten Modellen verglichen werden (Tabelle 10).

Da einer der wichtigsten Phänotypen von MetR eine starke antidiabetische Wirkung ist, wurde zuerst der Fokus auf antidiabetische Komplex-I-Hemmer wie Metformin und Imeglimin gelegt. Beide Modelle zeigten eine signifikante Überschneidung mit MetR in den DEGs. Es wurde eine hochsignifikante Überschneidung bei der Genregulierung beobachtet, wobei 101 bzw. 82 Gene jeweils in die gleiche Richtung reguliert waren. Fenofibrat, ein antidiabetischer Lipidsenker, zeigte ebenfalls eine starke Überschneidung der Gensignatur und der parallelregulierten Gene (142 Überschneidungen und 102 konkordante Gene). Um die Komplex-I-Hypothese weiter zu testen, wurden Transkriptomdaten von bekannten Komplex-I-Inhibitoren wie MPP⁺ und Rotenon sowie von Patienten, die von Komplex-I-Defekten betroffen sind, analysiert. Auch bei diesen Modellen konnten signifikante Überschneidungen mit MetR beobachtet werden, wenngleich etwas schwächer als bei den zuvor genannten Substanzen. Ferner wurde eine Diät mit niedrigem AA-Gehalt untersucht, die die Wirkung von MetR teilweise nachahmen sollte. Auch hier konnte eine signifikante Überschneidung festgestellt werden (Tabelle 10).

Weiterhin soll der Konsensus-Gensatz mit einem Hungersignal-Mimetikum und AMPK-Aktivator AICAR (5-Aminoimidazol-4-carboxamid-Ribonukleotid), dem ER-UPR-Auslöser Tunicamycin und Rapamycin, einem Immunsuppressor, mTOR1-Aktivator und lebensverlängernden Medikament verglichen werden. Dies soll dem Zweck dienen, herauszufinden, ob z.B. die Lebensverlängerung durch MetR evtl. auf ähnliche Mechanismen wie bei Rapamycin zurückzuführen ist.

Eine signifikante Überschneidung zwischen dem AMPK-Aktivator AICAR und dem MetR-Modell konnte nicht festgestellt werden. Dies lässt den Schluss zu, dass MetR vermutlich nicht über einen ATP-Mangel (AMP-Sensing) wirkt. Da das mtUPR-Modell vorgeschlagen wurde, wurde das MetR-Modell mit den Transkriptomdaten des UPR-Auslösers Tunicamycin verglichen. Der Vergleich zwischen dem MetR-Modell und der herkömmlichen UPR im ER (Endoplasmatisches Retikulum) zeigt keine signifikanten Überschneidungen, was darauf hindeutet, dass MetR eine eigene, für Mitochondrien spezifische Form der UPR auslöst. Des Weiteren wurde MetR mit Rapamycin, einem lebensverlängernden Mittel, verglichen, wobei ebenfalls keine signifikante Überschneidung festgestellt wurde. Dies lässt den Schluss zu, dass mTOR1 wahrscheinlich kein Ziel von MetR ist.

Wie schon im Falle der mitochondrialen KO-Modellen, wurde auch hier die Spearman-Korrelation angewandt. Die signifikantesten Korrelationskoeffizienten wurden bei den Behandlungen mit AA-armer Ernährung, Metformin, Imeglimin und Fenofibrat beobachtet ($\rho \approx 0,5-0,4$; Korrelations-p-Wert $< 0,01$). Außerdem wurden signifikante ($p < 0,05$) Korrelationen bei Rotenon und bei Fibroblasten von CI-defizienten Patienten festgestellt. Eine Behandlung (MPP⁺) wies eine Signifikanz bezüglich der Binomialverteilung auf, jedoch nicht bezüglich der Spearman-Korrelation. Umgekehrt zeigte die

Behandlung mit Tunicamycin eine marginale signifikante Spearman-Korrelation, auch wenn sie im Hinblick auf die Binomialverteilung nicht signifikant war. Der Vergleich zwischen MetR, AICAR und Rapamycin zeigte in beiden Analyseverfahren keine Signifikanz.

Tabelle 10: Statistische Analyse des Vergleichs des Konsensus-MetR-Modells mit mutmaßlich verwandten pharmakologischen Phänotypen. Die Sortierung innerhalb der Tabelle erfolgte nach aufsteigendem p-Wert der Binomialverteilung.

	Funktion	Ziellinie / Gewebe	Anzahl der gemeinsamen Gene	Anzahl der gleichsinnig regulierten Gene	p-Wert binomial	Spearman's rho	p-Wert Spearman
<i>Metformin</i>	CI Inhibitor	HepG2	132	101	1.1E-10	0.441	1,2E-7
<i>Fenofibrate</i>	PPAR α Agonist	Mausleber	142	102	3.8E-08	0.384	1,9E-6
<i>Imeglimin</i>	CI Inhibitor	HepG2	112	82	1.7E-07	0.403	1E-5
<i>MPP+</i>	CI Inhibitor	Luhmes	132	79	9.2E-03	0,087	3,3E1
<i>Rotenon</i>	CI Inhibitor	MIA-PaCa2	71	46	4.3E-03	0.296	1,2E-2
<i>CI-defiziente Patienten</i>	NDUFS Mutationen	Fibroblasten	45	31	3.3E-03	0.345	2E-2
<i>Low AA Diät</i>		Mausleber	78	48	1.5E-02	0.480	8,8E-6
<i>Tunicamycin</i>	UPR-Auslöser	HCT116	76	41	2.1E-01	0,259	3E-2
<i>AICAR</i>	AMPK Aktivator	HepG2	142	71	5.3E-01	-0,004	9,6E-1
<i>Rapamycin</i>	mTOR Aktivator	Mausleber	97	47	5.8E-01	-0,079	4,4E1

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die transkriptomischen Veränderungen, die durch MetR hervorgerufen werden, Hinweise auf signifikante Veränderungen innerhalb des Mitochondriums, speziell mitochondriale Translation und mtUPR, liefern. Dadurch, dass die mitochondriale Translation primär den Komplex I der Atmungskette betrifft, wurden die transkriptomischen Auswirkungen verschiedener pharmakologischer Modelle mit den der MetR verglichen. Es ergab sich, dass MetR stark den antidiabetischen Medikamenten, wie Metformin oder Imeglimin und etwas weniger stark Komplex I-Inhibitoren wie MPP+ oder Rotenon ähnelt, und keine Überschneidungen mit Autophagie-Aktivatoren (Rapamycin), Hungersignal-Mimetika (AICAR) oder ER-UPR-Aktivatoren (Tunicamycin) aufweist. Letzteres betont einmal mehr die Einzigartigkeit des MetR-Phänotyps in Bezug auf die mitochondriale UPR.

Der folgende Teil dieser Arbeit entstand aus einer bereits veröffentlichten Publikation „*Mitochondrial complex I inhibition triggers NAD⁺-independent glucose oxidation via successive NADPH formation, “futile” fatty acid cycling, and FADH₂ oxidation*“ im Fachjournal *Geroscience* am 25.1.2024. Einsehbar unter <https://doi.org/10.1007/s11357-023-01059-y>. Es handelt sich dabei um theoretische Überlegungen auf Basis von bereits von anderen Arbeitsgruppen publizierten Transkriptom- und Metabolomdaten.

5.2 Inhibition des Komplex I als mögliche Ursache der metabolischen Insuffizienz bei MetR

Eine Inhibition des Komplex I der Atmungskette ist ein weitverbreitetes Phänomen, welches u.a. durch verschiedene, miteinander nicht verwandte Sekundärmetaboliten aus Pflanzen (Rotenon, Piericidin A oder Bullatacin) oder Arzneistoffe, wie z.B. Metformin hervorgerufen werden kann. Interessanterweise korreliert die Inhibition des Komplex I in der Leber oft mit einer anti-diabetischen Wirkung. Dies ist bei Metformin (Wheaton WW et al., **2014**), Glitazonen wie z.B. Pioglitazon (Garcia-Ruiz et al., **2013**) oder Fibraten (Fenofibrat, Miller et al., **1998**) zu beobachten. Dieses Phänomen der Antidiabese ist auch bei MetR-behandelten Tieren zu beobachten.

Gleichzeitig führen einige Komplex I-Hemmer zu einem „Fettsäure-Cycling“, also dem gleichzeitigen Auf- und Abbau von Fettsäuren in einer Zelle oder einem Organismus. Dieses Cycling hat eine negative Energiebilanz zufolge, weswegen es mutmaßlich einer regulatorischen Aufgabe dient. Die Verknüpfung zwischen Komplex I-Inhibition, Antidiabese und dem Fettsäure-Cycling ist ungeklärt und könnte einen möglichen Lösungsansatz zur Aufklärung des Phänotyps der MetR darstellen.

Das Fettsäure-Cycling wird als eine Abfolge von vier getrennten Schritten betrachtet

- **Fettsäuresynthese:** pro Addition einer C₂-Einheit wird ein Äquivalent ATP zur Aktivierung von Acetyl-CoA, und zwei Äquivalente NADPH zum reduktiven Koppeln verbraucht.
- Um zum Abbauort der Fettsäure, dem Mitochondrium, zu gelangen, muss die Fettsäure über den **Carnitin-Shuttle** transferiert werden; dies erfolgt keine Kofaktoren oder Energie.
- **β-Oxidation:** pro eine abgebaute C₂-Einheit entsteht ein Äquivalent NADH und ein Äquivalent FADH₂.
- **Citrat-Shuttle:** Das entstandene Acetyl-CoA wird wieder ins Cytosol transportiert. Dafür wird üblicherweise ein Äquivalent NADH und zwei Äquivalente ATP verbraucht, während ein Äquivalent NADPH gewonnen wird.

Diese Überlegungen haben zufolge, dass im Rahmen eines Fettsäure-Cyclings netto 3 ATP und ein NADPH pro C₂-Einheit verbraucht, und ein FADH₂-Äquivalent gewonnen wird. Damit verbraucht das Fettsäure-Cycling nicht nur drei ATP Äquivalente, sondern wandelt auch ein nicht respirables NADPH in ein veratembares FADH₂ um. Dieses kann die transportierten Elektronen auf ein Elektron-transferierendes Protein (ETF) übertragen, welches diese unabhängig von inhibiertem Komplex I in die Atmungskette einschleust. Die formale eins-zu-eins Umwandlung von NADPH in FADH₂ erlaubt theoretisch eine vollständig NAD⁺-unabhängige Glukoseoxidation durch das Verknüpfen des NADPH-produzierenden Pentosephosphatwegs mit der FADH₂-Atmung.

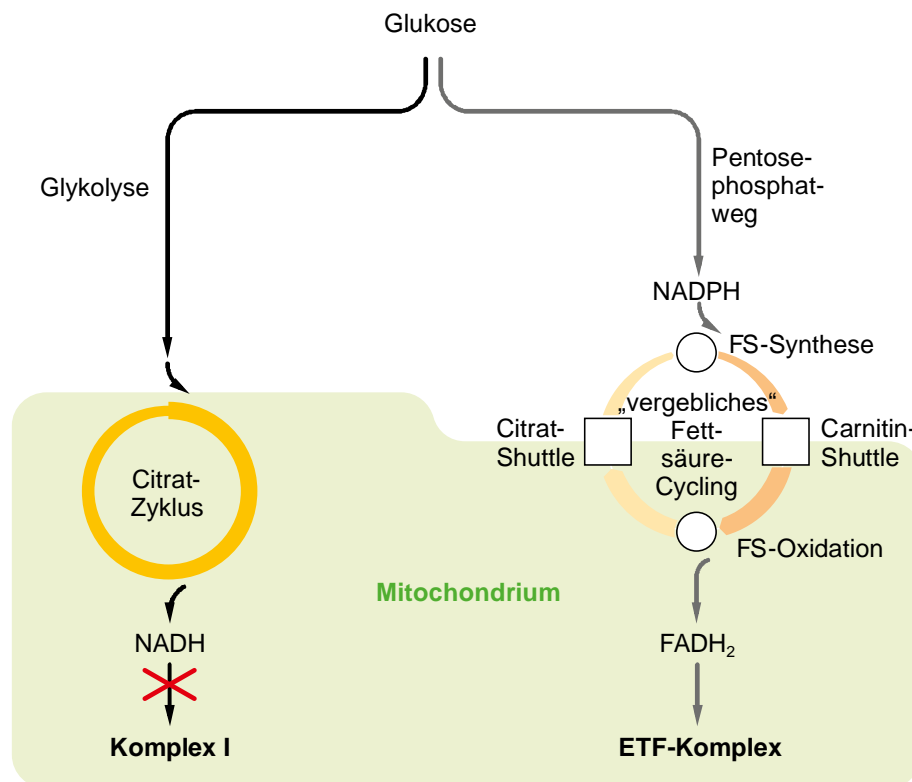


Abbildung 13: NAD⁺-unabhängiger Glukoseabbau. Eine Inhibition des Komplex I blockiert den üblichen Weg über die Glykolyse und den Zitratzyklus. Es erfolgt eine Umnutzung des cytosolischen Intermediates Glukose-6-Phosphat in Richtung des Pentosephosphatweg; das dadurch gewonnene NADPH wird über den „zwecklosen“ Fettsäurezyklus in das veratembare FADH₂ umgewandelt, welches über den ETF-Komplex die Atmungskette reduzieren kann.

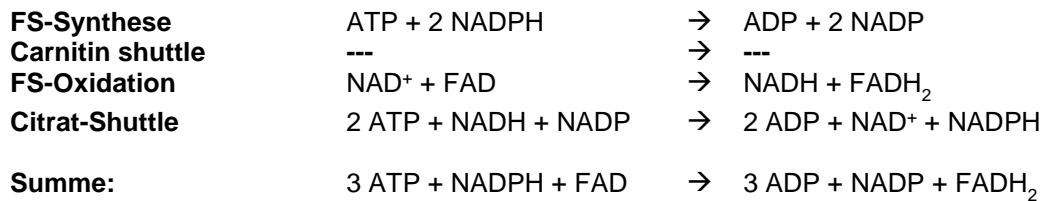
Die energetische Bilanz der Verknüpfung von Pentosephosphatweg und dem Fettsäurezyklus ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt. Wird ein Molekül Glukose vollständig über den Pentosephosphatweg zu CO₂ oxidiert, so wird dafür ein Molekül ATP (zur Aktivierung zu Glukose-6-Phosphat) verbraucht, und es entstehen zwölf Äquivalente NADPH. Diese zwölf Äquivalente NADPH können zu zwölf veratembaren Äquivalenten FADH₂ umgewandelt werden, indem dafür zwölf C₂-Einheiten zirkuliert werden, was wiederum 36 Einheiten ATP verbraucht. Die Reoxidation von FADH₂ zu FAD liefert ca. 18 ATP, was nicht einmal die Hälfte des verbrauchten ATP regeneriert und zu einem Defizit von formal 19 ATP führt. Im Vergleich dazu führt eine vollständige Oxidation der Glukose über

die kanonische Glykolyse, den Citratzyklus und die Atmungskette zur einem Nettogewinn von 32 ATP pro Glukose.

I - Pentosephosphatweg
Ausbeute pro Glukose:



II - Fettsäurezyklus
Ausbeute pro Acetyl-CoA:

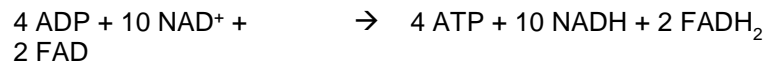


III - Total von I + II
Ausbeute pro Glukose (1x Pentosephosphatweg + 12x Fettsäurezyklus):



Energetische Gesamtbilanz: -19 ATP pro Glukose*

IV - Vergleich mit Glykolyse / Citratzyklus
Ausbeute pro Glukose (ATP ~ GTP):



Energetische Gesamtbilanz: +32 ATP pro Glukose*

*Basierend auf der Annahme, dass die NADH-Oxidation 2.5 ATP und FADH₂-Oxidation 1.5 ATP liefert

Physiologisch gesehen kann dieser postulierte Stoffwechselweg die Energieaufrechterhaltung in einem Organismus nicht gewährleisten. Somit ist davon auszugehen, dass diese in Folgendem NADPH-FADH₂-Achse genannte Verknüpfung nur als Antwort auf Stress aktiviert wird. Im Kontext der Komplex I-Inhibition erscheint das Auftreten der NADPH-FADH₂-Achse nachvollziehbar: durch eine Komplex I-Inhibition steigt das NADH/NAD⁺-Verhältnis, was wiederum den Citratzyklus und die Glykolyse hemmt. Die Aktivierung der NADPH-FADH₂-Achse wäre somit eine vorteilhafte und ggf. zytoprotektive Antwort auf eine mögliche zelluläre Glukose-Überflutung, welche als Ursache für z.B. Kardiomyopathien diskutiert wird (Joubert et al., 2019). Somit könnte das mitochondriale Membranpotential und der ATP-Spiegel auch in von Komplex I-Inhibition betroffenen Organen, z.B. der Leber, aufrechterhalten bleiben.

Im Folgenden seien die zentralen Hinweise auf das Auftreten der NADPH-FADH₂-Achse bei Methioninrestituierten Ratten zusammengefasst. Diese Analyse erstreckt sich auf die Transkriptom- (Anhang Tabelle 13) und Metabolomebene (Anhang Tabelle 14).

In den Transkriptomdaten finden sich diverse Hinweise auf das Vorhandensein der NADPH-FADH₂-Achse, welche auf mehrere Gewebe verteilt zu sein scheinen: während die Fettsäuresynthese im Fettgewebe stimuliert wird, verläuft die β -Oxidation in der Leber: das Fettgewebe weist einen signifikanten Anstieg der Gene, wie z.B. *Acaca* (Anstieg um Faktor 3.35), *Evovl6* (4.04) und *Scd* (2.66) auf. Parallel mit der Hochregulation der Genexpression verändert sich auch der Spiegel der Metaboliten im Fettgewebe (Tabelle 14). Die freien Fettsäuren im Fettgewebe waren erhöht, wobei Palmitoleinsäure (16:1 (ω -7)) und Oleinsäure (18:1 (ω -9)) am stärksten und signifikant erhöht waren. Dagegen fiel der Fettsäurespiegel in der Leber signifikant ab, was dafürspricht, dass die Leber nun auf Fettsäuren und somit β -Oxidation als energiebringenden Prozess umgestiegen war. Dies wird auch durch die signifikant erhöhte Genexpression der Fettsäuretranslocase *Cd36* (1,8-fach) und des Very low density lipoprotein Rezeptors (*Vldlr*) (5,8-fach) ersichtlich.

Als Kennzeichen der erhöhten hepatischen β -Oxidation können die mRNA-Expressionen der Acyl-CoA-Thioesterase 2 (*Acot2*; Faktor: 1,8), der 3-Ketoacyl-CoA-thiolase (*Hadhb*, Faktor: 1,6) und die Verringerung der transkriptionellen Expression der Acetyl-CoA-Carboxylase β (*Acacb*, Faktor: 0,46) herangezogen werden. Die Acetyl-CoA-Carboxylase β ist bekannterweise ein zentraler negativer Regulator der β -Oxidation (Abu-Elheiga L et al., **2000**). Der erhöhte Abbau von Fettsäuren, welcher in erhöhten Acetyl-CoA-Konzentration resultiert, kann auch durch den Anstieg des Ketonkörpers β -Hydroxybutyrat im Plasma (Faktor: 2,4) und die erhöhte Expression des Ketonkörpertransporters *Slc16a5* (Faktor: 1,3) abgelesen werden. Weitere Indizien für die Hypothese des Fettsäure-Cyclings ist die reziproke Regulation der Transkripte für die ATP-Citrat-Lyase (*Acly*) und die Stearoyl-CoA-Desaturase (*Scd*) in der Leber und dem Fettgewebe; während die hepatische Expression der mRNA für diese Enzyme supprimiert wurde (Faktor jeweils: 0,48 und 0,07) wurden diese Transkripte im Fettgewebe induziert (Faktor jeweils: 1,7 und 2,7).

Ferner ergaben sich in der Leber signifikante Anzeichen einer Induktion des Carnitin-Shuttles, nämlich eine signifikante Induktion der Transkripte der verschiedenen Isoformen der Carnitin-Palmitoyl-Transferase, konkret *Cpt1a* (Faktor: 1,35), *Cpt1b* (Faktor: 1,31) und *Cpt2* (Faktor: 1,42). Von besonderem Interesse ist *Cpt1a*, da dieses für ein leberspezifisches Enzym kodiert (Sun et al., **2022**). Somit waren beide Arme des Carnitin-Shuttles, also sowohl das Assemblieren des Fettsäure-CoAs aus Carnitin in der äußeren mitochondrialen Matrix durch das *Cpt1a*, als auch das Freisetzen des Carnitins und des Fettsäure-CoAs in der inneren mitochondrialen Membran durch das *Cpt2*, signifikant induziert. Weiterhin war auch der Carnitin/Acylcarnitin-Antiporter (*Slc25a20*, *Cact*) ebenfalls hochreguliert

(Faktor: 1,16). Somit wären alle drei Elemente des hepatischen Carnitin-Zyklus entsprechend einer erhöhten Funktionsausübung verändert.

Der NADPH-Teil der vorgestellten NADPH-FADH₂-Achse ist bei den MetR-Tieren durch das Malatenzym 1 (*Me1*, Faktor: 1.7), die Methylenetetrahydrofolat-Dehydrogenase 2 (*Mthfd2*, Faktor: 4,5) und die mitochondriale Isocitratdehydrogenase (*Idh2*; Faktor: 1,33) repräsentiert. Die Enzyme des Pentosephosphatwegs waren nicht signifikant reguliert; hingegen wurde eine Anreicherung des Schlüsselmetaboliten 6-Phosphoglukonat sowohl in der Leber als auch im Fettgewebe festgestellt, während die Glukosespiegel gleichzeitig sanken. Diese Veränderung deutet darauf hin, dass es eine Verschiebung von der Glykolyse in Richtung des Pentosephosphatwegs gegeben haben könnte, obgleich hier keine nennenswerte transkriptomische Veränderung zu beobachten war. Im Einklang damit steht die signifikante Verringerung der Genexpression der Glukokinase (*Gck*, Faktor: 0,55) und der Pyruvatkinase (*Pklr*, Faktor: 0,62), welche beide eine starke Kontrolle über den Flux in der Glykolyse ausüben. Insgesamt lassen diese Erkenntnisse darauf schließen, dass es in der Leber eine Veränderung von der Glykolyse hin zur Fettsäureaufnahme und β -Oxidation stattfindet, während im Fettgewebe eine verstärkte Glukoseaufnahme (signalisiert durch die Induktion des Glukose-Transporters *Slc2a4* um den Faktor 1,9) stattfindet.

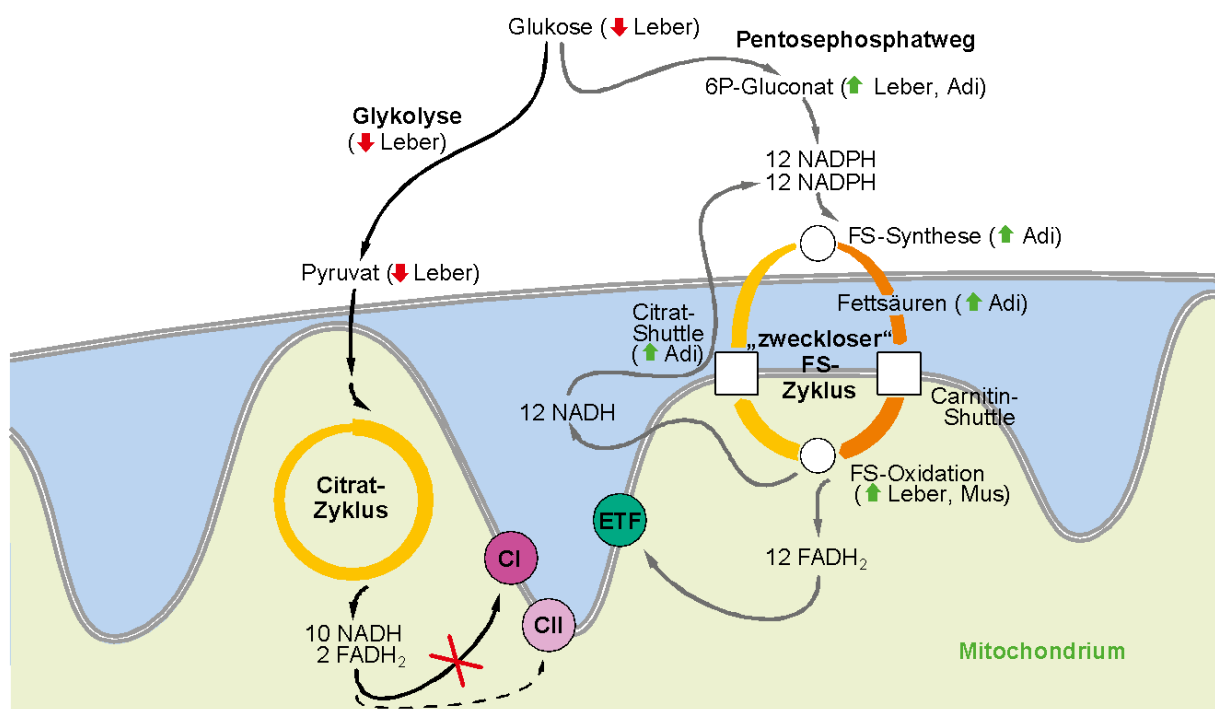


Abbildung 14: Repräsentation der zentralen Veränderungen in der Genexpression und Metabolitenkonzentration, induziert durch Methioninrestriktion in vivo. Methioninrestriktion führt durch Komplex I-Inhibition apparent zu einer Abkehr von der kanonischen Glykolyse in Richtung der Fettsäuresynthese im Fettgewebe und der β -Oxidation in der Leber. Im Falle einer unvollständigen Komplex I- Inhibition sind beide Wege (links und rechts) gleichzeitig möglich.

Somit lässt sich entsprechend des Modells in Abb. 13 annehmen, dass *in vivo* bei MetR-Tieren das Fettgewebe die Glukose in Fettsäuren umwandelt, welche in die Leber transportiert und dort via β -Oxidation, $FADH_2$ und ETF die Atmungskette antreiben.

Somit konnte aufbauend auf der Transkriptom-Metaanalyse der veröffentlichten MetR-Studien einige phänotypischen Effekte der MetR, wie z.B. Schlankheit trotz Hyperphagie oder der antidiabetische Phänotyp durch die NADPH- $FADH_2$ -Achse und das Fettsäure-Cycling erklärt werden. Diese Ergebnisse der theoretischen Untersuchungen stützen die These, dass die MetR zu einer Komplex I-Inhibition führen könnte. Die Überprüfung dieser Hypothese und die Untersuchung der möglichen molekularen Ursachen ist der Gegenstand des nachfolgenden Teiles der Arbeit.

5.3 Nass-chemische Analytik des Komplex I als primäre Ursache für den Phänotyp von Methionin-Restriktion

Aus den vorangegangenen Untersuchungen hatte sich die Erkenntnis kristallisiert, dass ein Defekt oder eine vorliegende Inhibition des Komplex I der Atmungskette möglicherweise für den Phänotyp der Methionin-Restriktion verantwortlich sein könnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden zuerst mittels Western Blots einige Untereinheiten der Atmungskette im Herzen und in der Leber der auf 80%-MetR gehaltenen Fischer-344 Ratten untersucht. Jeweils sieben Tiere erhielten die MetR-Diät (AIN-76 mit 0,17% Met, 0% Cys) und die Kontrolldiät (AIN-76 mit 0,8% Met, 0.05% Cys). Im Folgenden werden die Tiere, welche auf der MetR gehalten wurden als MR-Tiere genannt, während die Tiere auf der Kontrolldiät als CF (engl.: *control fed*) referiert werden.

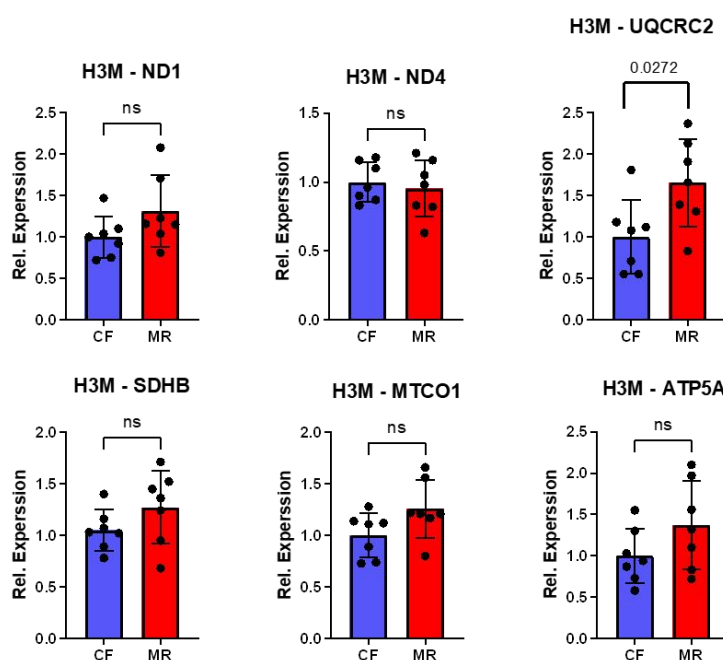
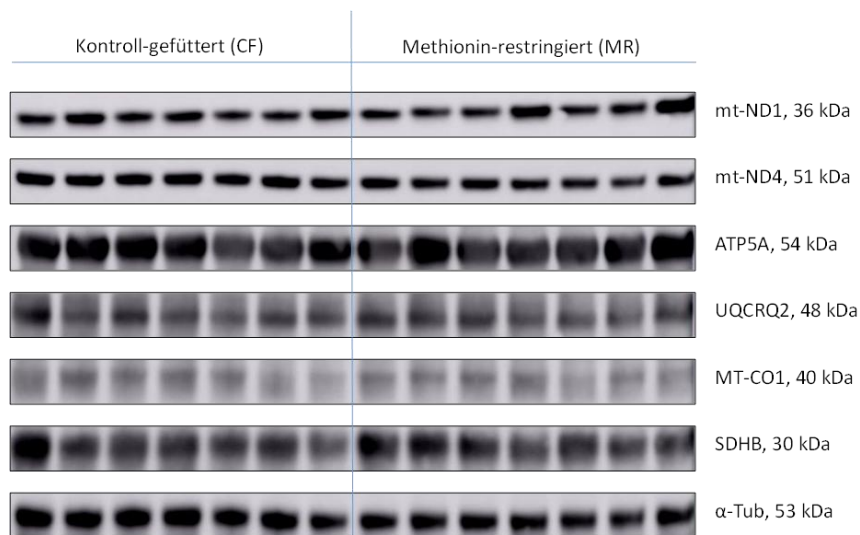


Abbildung 15: Western Blots verschiedener Untereinheiten der Atmungskette. Hierbei wurde ein Gesamtlysate des Herzens der Tiere untersucht. mt-ND1 und mt-ND4 gehören Komplex I, SDHB Komplex II, UQCRC2 Komplex III, MT-CO1 Komplex IV und ATP5A Komplex V an. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Auswertungen des Proteinexpressionsunterschieds der einzelnen Untereinheiten zwischen CF und MR wurden auf den Mittelwert der CF-Gruppe bezogen. Der blaue Balken bezieht sich auf die CF-Gruppe, während der rote Balken die MR-Gruppe repräsentiert. Die schwarzen Punkte innerhalb des Balken sind die einzelnen Werte der Tiere innerhalb einer Gruppe. H3M steht für Herz 3 Monate (Alter der Tiere).

Wie aus Abbildung 15 zu erkennen ist, waren nahezu keine Effekte in den ausgewählten Untereinheiten der Atmungskette des Herzens zu erkennen. Die statistische Auswertung ergab ebenfalls keine signifikante Veränderung, mit Ausnahme von Untereinheit Uqcrc2, welche dem Komplex III angehört. Hier war ein Anstieg um einen Faktor 1,69 (p-Wert: 0.03) zu beobachten. Anschließend wurde eine ähnliche Prozedur auf die Leberproben angewandt.

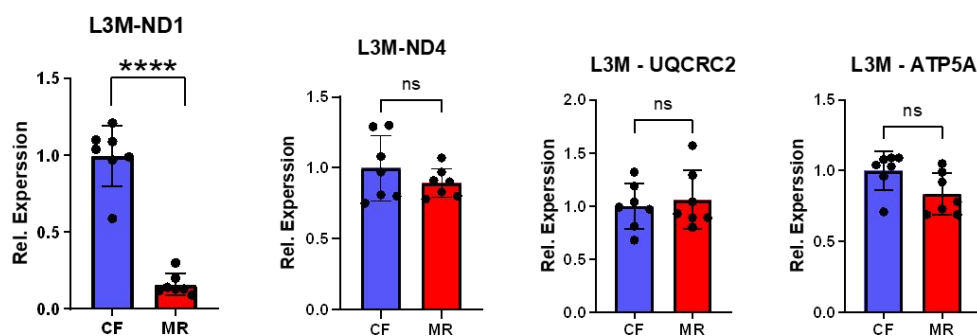
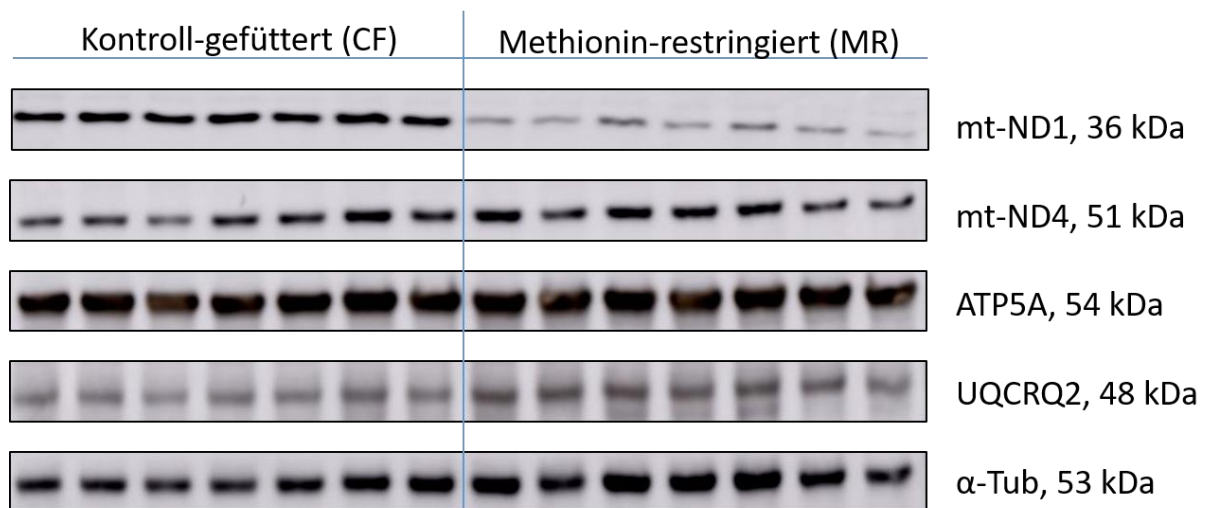


Abbildung 16: Western Blots verschiedener Untereinheiten der Atmungskette. Hierbei wurde ein Gesamtlysate der Leber der Tiere untersucht. mt-ND1 und mt-ND4 gehören Komplex I, UQCRC2 Komplex III, und ATP5A Komplex V an. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet. Die Auswertungen des Proteinexpressionsunterschieds der einzelnen Untereinheiten zwischen CF und MR wurden auf den Mittelwert der CF-Gruppe bezogen. Der blaue Balken bezieht sich auf die CF-Gruppe, während der rote Balken die MR-Gruppe repräsentiert. Die schwarzen Punkte innerhalb des Balken sind die einzelnen Werte der Tiere innerhalb einer Gruppe. L3M steht für Leber 3 Monate (Alter der Tiere).

Die Analyse der Leberproben (Abb.16) ergab, dass sich die Untereinheit mt-ND1 besonders vom Quervergleich der Proteine der Atmungskette abhob, da ihr Signal stark verringert war. Die mt-ND1-Untereinheit ist ein mitochondrial-kodiertes, membranständiges Protein aus 318 Aminosäuren, welches sich zwischen dem N- und P-Modul des Komplexes befindet und strukturell wie funktional eine zentrale Rolle im Protein einnimmt (Abb. 17).



Abbildung 17: Die zentrale Lage der mt-ND1 Untereinheit (cyan) im Komplex I (gelb). Die Abbildung wurde erstellt nach der Kristallstruktur 7V2C aus der Protein Data Bank (PDB) unter Verwendung des Programms PyMOL. Für die Strukturaufklärung wurden die Mitochondrien aus dem Herz eines Schweins verwendet. Über einen Sucrosegradienten wurden anschließend Komplexe und Superkomplexe der Atmungskette isoliert (Gu et al., 2022).

Der hier verwendete monoklonale Antikörper (ab181848, s. Mat/Met-Teil) erkennt eine einzige scharfe Bande zwischen 30 und 40 kDa, wobei das rechnerische Molgewicht von mt-ND1 36 kDa beträgt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der verwendete Antikörper spezifisch das gewünschte Protein erkennt. Es ist zu erkennen, dass das immunologische Signal des Antikörpers in der MetR-Gruppe wesentlich schwächer ist, als in der Kontrollgruppe. Die Ladekontrolle ist weitestgehend einheitlich, sodass der Effekt nicht auf die Ladekontrolle zurückzuführen ist. Der singuläre Unterschied zwischen der Kontroll- und MR-Gruppe im immunologischen Signal betrug $85 \pm 2\%$ und hatte eine Signifikanz $p < 0.0001$. Dafür sind prinzipiell zwei Erklärungen möglich:

- Das fehlende Signal bedeutet, dass das Protein nicht in derselben Menge vorhanden ist
- Das fehlende Signal bedeutet, dass der Antikörper das Epitop mangelhaft erkennt, z.B. wegen einer posttranslationalen Modifikation (PTM)

Um der ersten Hypothese nachzugehen, wurde ein weiterer Antikörper (Abclonal 18316, s. Mat/Met-Teil), welcher ebenfalls gegen mt-ND1 gerichtet ist, eingesetzt. Dieser polyklonale Antikörper ist gegen eine andere Sequenz gerichtet als der zuvor gezeigte Antikörper, nämlich wurde zur Immunisierung ein Peptid aus Aminosäuren 150-250 des humanen ND-1 verwendet. Das Ergebnis ist in der Abbildung 17 zu sehen.

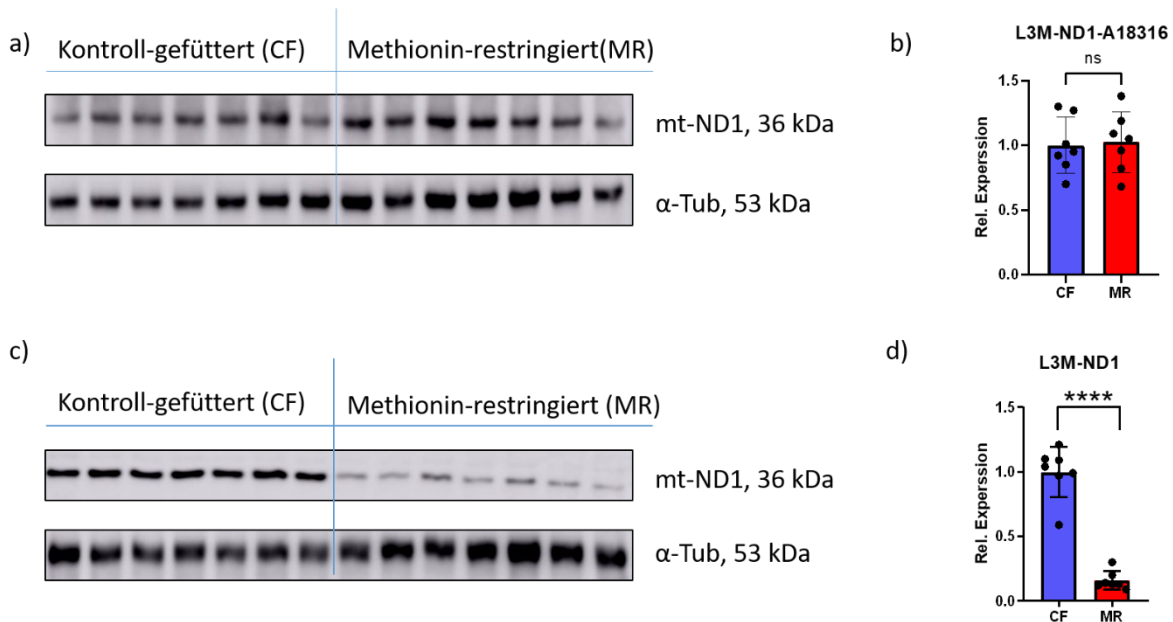


Abbildung 18: Western Blots der mt-ND1-Untereinheit mit zwei verschiedenen Antikörpern und die statistische Auswertung. In a) und c) sind die Western Blots gezeigt, in a) mit ab181848- und in c) mit Abclonal18316-Antikörper. In b) und d) ist die statistische Auswertung der beiden Blots zu finden.

Der neu verwendete Antikörper (Abclonal A18316) erkannte drei Banden, wobei eine aufgrund des passenden Molekulargewichts als die zutreffende erkannt wurde. Die Auswertung zeigt, dass das Protein in der MR-Kohorte unverändert exprimiert war. Daraus wurde gefolgert, dass Annahme eins (s. oben) nichtzutreffend ist und somit die zweite Erklärung weiterverfolgt werden sollte. Das zur Immunisierung verwendete Peptid des monoklonalen ab181848-AK (Abb. 17 c+d) ist laut dem Hersteller:

V V G P Y G L L Q P F A D A M K L F T K

was den Aminosäuren 39-58 des humanen mt-ND1 entspricht. Dieser Abschnitt beinhaltet einige hochkonservierte Aminosäuren. Die Analyse der entsprechenden Sequenz in einigen, zum Teil wenig miteinander verwandten Spezies lieferte folgendes Ergebnis:

```

sp|Q01148|T.aestivum..... VVGSFGLLQPLADGLKLLK
sp|P92558|A.thaliana..... VVGSFGLLQPLADGLKLLK
sp|P24887|C.elegans..... KVTFMGLAQALLDGVKLLK
sp|Q9B6E8|Y.lipolytica... FVGYYGLLQAFADAVKLLK
sp|P77858|P.marinus..... YAGALGVLQPIADGLKLLK

```

```

sp|P77858|E.coli..... -----GIWQDYRDIHKLFKR
sp|P18929|D.melanogaster. KVGLMGIPQPFCDAIKLITK
sp|Q9MIZ0|D. rerio..... VMGPRGLLQSVADGVKLFK
sp|Q37676|S.salar..... IVGPYGLLQPIADGLKLFK
sp|P18936|G.gallus..... IVGPFGLLQPVADGVKLFK
sp|P03887|B.taurus..... VVGPYGLLQPIADAIKLFK
sp|P03888|M.musculus.... IVGPYGILQPFADAMKLFMK
sp|P03889|R.norwegicus... IVGPYGILQPFADAMKLFMK
sp|P03886|H.sapiens..... VVGPYGLLQPFADAMKLFK

```

Somit sind sowohl unpolare (Gly und Leu), polare (Gln), saure (Asp) und basische (Lys) Aminosäuren identisch, wobei sich das GxxQxxxDxxKL-Muster in allen Proteinen finden lässt. Die fettgedruckten Sequenzen von Mensch und Ratte (Antikörper-Antigen-Paar) haben eine hohe Ähnlichkeit: die einzigen Aminosäuren, die sich zwischen den beiden Spezies unterscheiden, sind synonym, wie z.B. I-->V. Dies könnte die Antikörperbindung im Gewebe der Ratte erklären. Eine posttranslationale Modifikation (PTM) wie Phosphorylierung des Tyrosins, Methylierung oder Acetylierung des Lysins oder die Sulfoxidierung des Methions könnte die Modifizierung der Peptidkette bewirken und somit die Bindung des Antikörpers an das Epitop abschwächen.

Um diese Theorie zu überprüfen, wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Ilka Wittig (Universitätsmedizin Frankfurt) eine erste massenspektrometrische Analyse durchgeführt, um mögliche PTMs an der mt-ND1 Untereinheit zu identifizieren. Aufgrund der Beschaffenheit des zu untersuchenden Bereiches, nämlich des Reichtums an basischen Aminosäuren, konnte das trypsinylierte Peptid in der Masspektrometrie gefunden werden.



Abbildung 19: Massenspektrometrie des mt-ND1-Proteins. Es konnten keine Modifikation bis auf die Sulfoxidierung des Met53 gefunden werden. In blau sind die durch das Massenspektrometer entdeckten Peptide gezeigt.

Im Bereich des Proteins, wo auch das immunisierende Peptid liegt, war lediglich eine signifikante Modifikation zu finden, nämlich die Oxidation von Met53. Diese war in allen untersuchten Proben zu finden, sowohl in KF- als auch in MR-Proben. Der Anteil des modifizierten Peptids betrug ferner lediglich 5%, was nicht den Abfall des immunologischen Signals um 85% erklären kann. Der strukturelle Unterschied zwischen Methionin und Methioninsulfoxid ist geringfügig und kann ebenfalls nicht die fehlende Bindung des Antikörpers erklären.

Da die Suche nach strukturell-relevanten PTMs innerhalb des zur Immunisierung verwendeten Peptides, wie z.B. Methylierung/Acetylierung des Lysins nicht erfolgreich war, hat es zufolge, dass eine Abnahme des Signals in Western Blot möglicherweise auf eine massenneutrale Modifikation innerhalb des Peptids zurückzuführen ist.

Eine Möglichkeit einer massenneutralen Modifikation an einem Peptid mit besagten Aminosäuren ist die Isomerisierung des Aspartats (Asp, D). Infolge dieser nicht-enzymatischen Umwandlung entsteht das enantiomere D-Aspartat oder das Iso- (oder auch β -) Aspartat. Diese Proteinmodifikationen wurden bereits bei einer Vielzahl von Proteinen gefunden, wie z.B. Tubulin, Calmodulin oder im langlebigen Protein der Augenlinse Crystallin, wo der Gehalt an isomeren Aspartat an bestimmten Aspartaten im Alter bis zu 50% betragen kann (Lyon et al., **2018**). Es ist bekannt, dass diese Isomerisierungen stark die 3D-Konformation des Proteins beeinflussen können. Diese Tatsache könnte die Erklärung für die mangelnde Bindung des Antikörpers bei MetR sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden drei Peptide über kommerzielle Auftragssynthese hergestellt.

L-Asp-Blockpeptid YGILQPFA(L-Asp)AMKLFMK
D-Asp-Blockpeptid YGILQPFA(D-Asp)AMKLFMK
Iso-Asp-Blockpeptid YGILQPFA(β -Asp)AMKLFMK
AK-Immunisierungspeptid IVGPYGILQPFA(L-Asp)AMKLFMK

Anschließend wurde der kompetitive Bindeassay der Peptide mit dem Antikörper (ab181848) durchgeführt. Das Ziel dieses Assays war es zu überprüfen, ob der Antikörper in der Lage ist, zwischen verschiedenen Modifikationen am Aspartat im Epitop zu unterscheiden und, falls dies der Fall sein sollte, eine quantitative Abschätzung darüber erhalten, im welchen Maße der Antikörper einer Modifikation sensitiv gegenüber ist. Das Ergebnis ist in Abbildung 20 zu sehen.

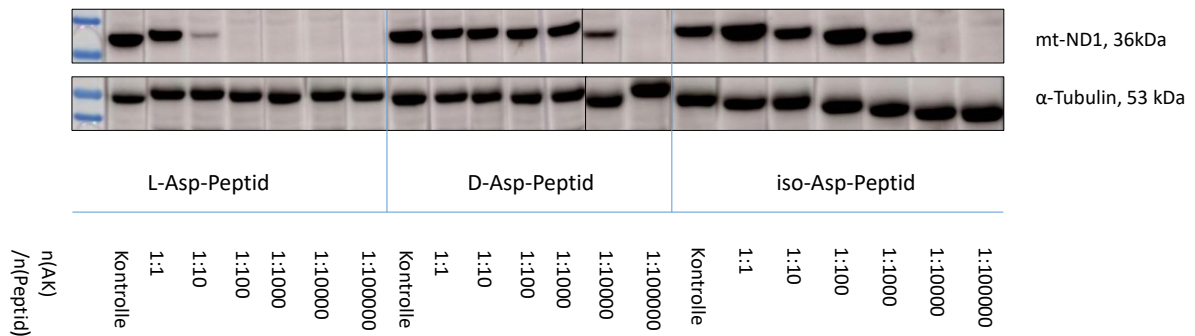


Abbildung 20: Blockpeptid-Assay mit dem kommerziellen Komplex-I Antikörper ab181848 von abcam. Es wurde das Leberlysat einer Kontrollratte verwendet. Es ist zu erkennen, dass der Antikörper sensitiv auf das L-Asp-haltige Peptid reagiert, während D-Asp- oder iso-Asp- Peptid nur etwa um einen Faktor ~1000 schwächer wirken. Für jedes Peptid wurde eine Titrationsreihe mit jeweils sechs Konzentration erstellt. Die Blotmembran wurde in Streifen geschnitten und jeder Streifen wurde über Nacht mit dem jeweiligen Peptid-AK-Gemisch geschüttet. Eine einstündige Inkubation des Peptids mit dem Antikörper erfolgte im Voraus. Die Zahl 1:1 bezieht sich jeweils auf das Stoffmengenverhältnis zwischen dem Peptid und Antikörper.

In der Abbildung 20 ist die Stärke des mt-ND1 Signals nach vorheriger Behandlung des Antikörpers mit verschiedenen Blockpeptiden zu erkennen. Ein starkes Signal hierbei bedeutet, dass der Antikörper wenig Interaktion mit dem Blockpeptid eingegangen ist und an sein eigentliches Target erfolgreich binden konnte. Ein schwaches oder nicht vorhandenes Signal zeigt eine starke oder vollständige Bindung des Peptids an den Antikörper an, wodurch der Antikörper nicht mehr an das Target binden kann.

In der Behandlung mit L-Asp-Peptid sind neben der Kontrollbande (ohne Peptid) eine schwächere Bande bei einer 1:1 Konzentration und eine noch schwächere Bande bei der 1:10 Konzentration zu erkennen. Hierdurch wurde das Epitop schärfer definiert, da das Blockpeptid die ersten vier Aminosäuren des zu Immunisierung verwendeten Peptids nicht aufweist (s. obere Peptidübersicht). Bei höheren Konzentrationen sind keine Banden erkennbar.

Die Behandlung des Antikörpers mit dem D-Asp-Peptid lieferte Banden in allen Gruppen zum 10.000-fachen Überschuss; die Bande mit dem 10.000-fachen Überschuss war jedoch schon weniger ausgeprägt. Beim iso-Asp-Peptid war ein ähnliches Schema zu beobachten: die ersten fünf Banden wiesen vergleichbare Intensitäten auf, während bei den beiden höchsten zwei Konzentrationen kein Signal vorlag.

Somit lässt sich der Schluss ziehen, dass der untersuchte Antikörper eine klare Präferenz für das Substrat mit L-Asp aufweist und Substrate mit D- oder iso-Asp deutlich (um einen Faktor 1000) schlechter bindet. Die Bildung von D- und iso-Asp könnten also beide das Fehlen eines Signals in Western Blot (Abb. 16) erklären. Diese Erklärung ist attraktiv, da die Reparatur der Iso-/D-Aspartats *in vivo* mittels einer SAM-abhängigen Methyltransferase (PIMT, Protein-Isoaspartyl-Methyltransferase;

EC: 2.1.1.77) abläuft (Vigneswara et al., **2006**). Diese Tatsache könnte eine Verknüpfung zwischen der MetR und möglicher Bildung von Iso-/D-Aspartats in den untersuchten Tieren darstellen.

Um zu überprüfen, ob in den MR-Tieren tatsächlich im Epitop vermehrt Iso- oder D-Aspartat vorliegt, wurde frisches MR-Leberlysat mit Methionin, SAM und PIMT versetzt, und analysiert, ob das immunologische Signal zurückkehren würde. Die Zugabe von Methionin erfolgte, da unter Umständen eine endogene Aktivität von Mat1a/Mat3a dafür sorgen könnte, dass Methionin *in situ* in SAM umgewandelt wird.

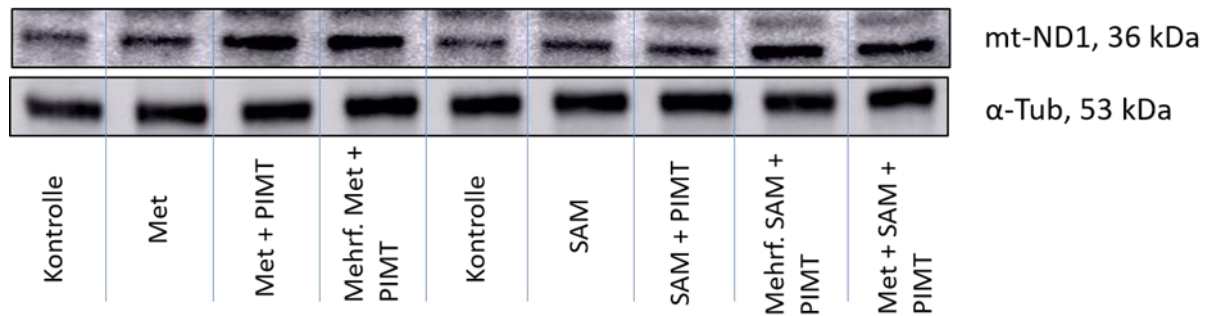


Abbildung 21: Western Blot des Reparatur-Assays mit gezeigter mt-ND1-Untereinheit und Tubulin als Ladekontrolle. Der Reparaturassay wurde in einer dreifachen Ausführung durchgeführt. Das Leberlysate einer MR-Ratte wurde für 4 Stunden bei 30 Grad unter Zugabe von in Mat/Met-Teil aufgeführten Chemikalien inkubiert.

Aus einem technischen Replikat des Reparatur-Assays, dargestellt in Abb. 21, ist zu erkennen, dass die Reparatur der iso-/epimeren Asp-Reste auch *in vitro* erfolgen konnte. Es wurden signifikante Mengen der Reparatur des Iso-/D-Aspartats *ex vivo* festgestellt, wobei der Read-Out das immunologische Signal des Antikörpers war, welcher wie zuvor etabliert an das L-Asp-Epitop deutlich stärker bindet. Ein geringes Maß an Reparatur fand auch in der Met-PIMT-Behandlung statt (Faktor 1,78; $p = 0,04$), während die mehrfache Behandlung mit denselben Agenzien ein nur etwas stärkeres Maß an Reparatur bedingte (Faktor 2,00; $p=0,006$). Erwartungsgemäß bewirkte die Zugabe von SAM ohne PIMT keine Veränderung des immunologischen Signals (Faktor 1,06; $p=0,99$). Die gleichzeitige Zugabe von PIMT und SAM verfehlte knapp die Signifikanz (Faktor 1,62; $p=0,13$), eine mehrfache Zugabe von PIMT und SAM hatte jedoch einen signifikanten zweitstärksten Effekt (Faktor 2,56; $p < 0,0001$) und wurde nur von der Zugabe von Met + SAM + PIMT übertroffen (Faktor 2,89; $p < 0,0001$) (Abb. 22).

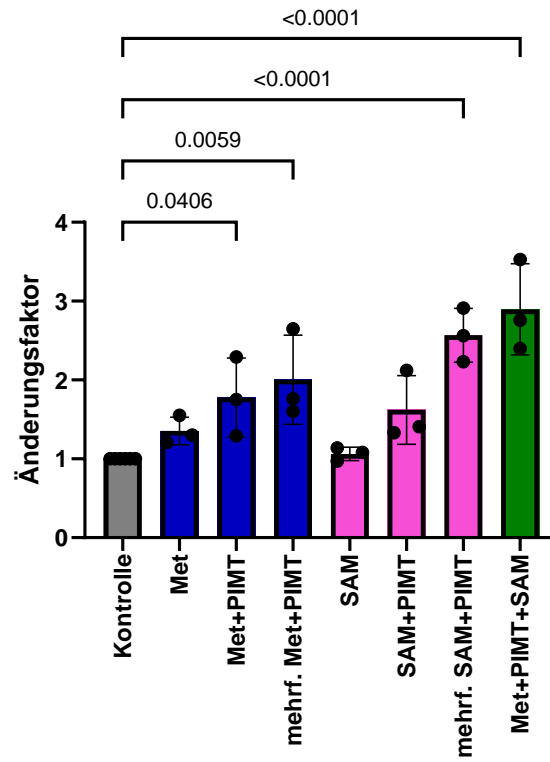


Abbildung 22: Quantitative Ergebnisse des Reparaturassays der mt-ND1 Untereinheit durch PIMT. Es wurden drei technische Replikate durchgeführt, welche durch einen schwarzen Punkt dargestellt sind.

5.4 Massenspektrometrie

5.4.1 Nachweis der Modifikation am D51 des ND1-Peptids

Die vorigen nass-chemischen Analysen hatten Hinweise darauf geliefert, dass der Rest D51 der mt-ND1 Untereinheit eine zentrale Rolle bei der Methionin-Restriktion spielen soll. Nun sollte der Nachweis der Isoaspartat-Modifikation mittels Massenspektrometrie erfolgen. Hierzu wurden zuerst drei Referenzpeptide untersucht, die aus einem Trypsinverdau von ND1 entstehen, in der Variation mit L, D und β -Aspartat. Die Sequenzen der Peptide sind nachfolgend gezeigt.

L-Asp: GPNIVGPYGILQPFA-**L-Asp**-AMK

D-Asp: GPNIVGPYGILQPFA-**D-Asp**-AMK

β -Asp: GPNIVGPYGILQPFA- **β -Asp**-AMK

Die oben gezeigten Peptide weisen exakt dieselbe Masse auf, nämlich 1987,013 Da (monoisotopisch). Mittels einer geeigneten hochauflösenden HPLC-Säule konnten die Peptide nach ihrer Retentionszeit aufgetrennt werden und durch ein Massenspektrometer detektiert werden. Dabei wies jedes Peptid seine eigene, basisliniengetrennte Retentionszeit auf. Diese betrug für das β -Asp-Peptid 24.3 Minuten, 24.7 Minuten für das D-Asp-Peptid und 25.5 Minuten für das L-Asp-Peptid.

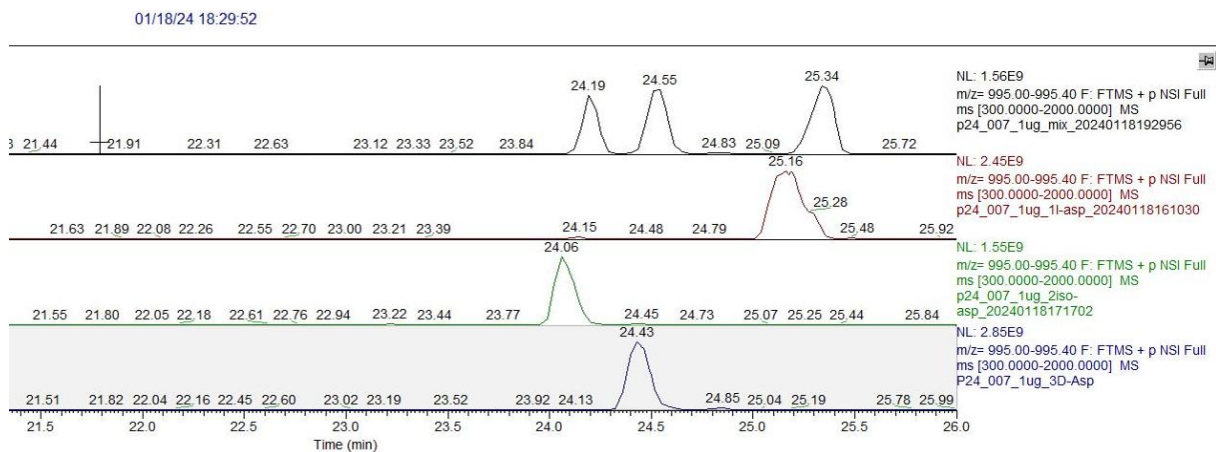


Abbildung 23: Extracted Ion Chromatogram der Referenzpeptide. Oben (in schwarz) ist das Gemisch der drei Peptide, in rot das L-Asp-Peptid, in grün das iso-Asp und in blau das D-Asp-Peptid gezeigt.

Dieser Versuch zeigt auf, dass mittels einer geeigneten HPLC-Säule und anschließendem Nachweis über Massenspektrometrie verschiedene massengleiche Peptide mit einer Aspartat-Modifikation basisliniengetrennt werden können. Nachfolgend wurden die trypsinierten Proben einer MR-Ratte auf ähnliche Weise untersucht. Das Ergebnis ist in Abb. 24 zu sehen.

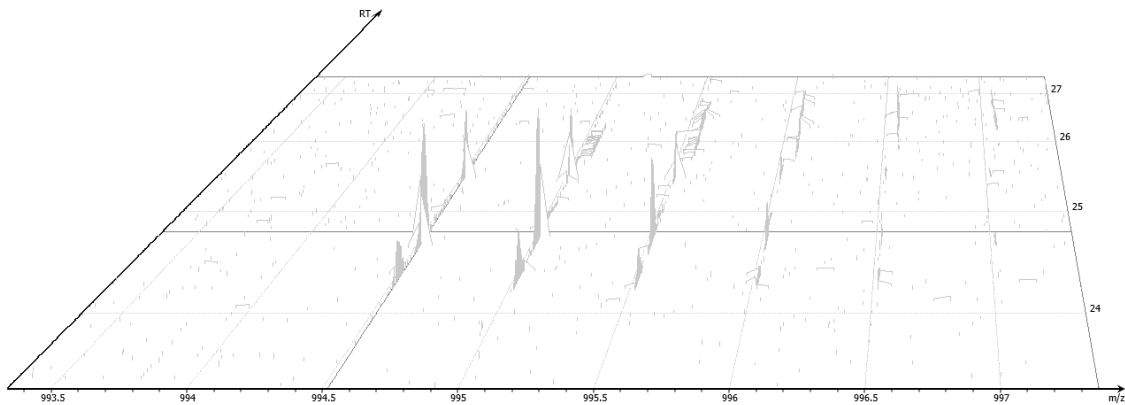


Abbildung 24: Detektion der verschiedenen Aspartatspezies des Peptides GPNIVGPYIGILQPFADAMK aus einer MR-Ratte. Auf die HPLC-Säule wurde die isolierte Komplex I-Bande aus der Leber aufgetragen nach dem Methodenteil 4.2.2. Auf der x-Achse ist das Masse-zu-Ladungsverhältnis m/z , auf der y-Achse die Retentionszeit RT abgebildet. Erstellt mit PeaksPro11.

Aus der Abbildung 24 ist zu erkennen, dass in dem hepatischen Komplex I einer MR-Ratte drei Peaks bei gleicher m/z (994,51) zu finden waren, was exakt der Masse des zu untersuchenden Peptides entspricht. Die Retentionszeit der drei gezeigten Peaks entspricht genau der Retentionszeit der Referenzpeptide, was die Grundlage der Zuordnung der Peptide zu jeweiligen Aspartat-Spezies war. Weitere, jeweils um 0,5 Da verschobene, Peaks sind auf Isotope zurückzuführen. Über die Intensität der jeweiligen Peaks aus der Abb. 24 kann eine statistische Aussage getroffen werden.

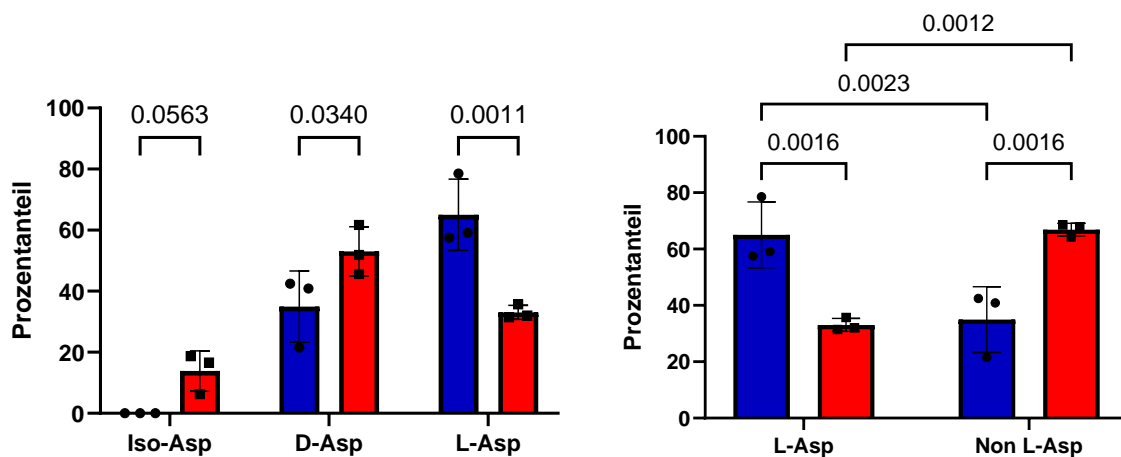


Abbildung 25: Quantifizierung der untersuchten Peptide im isolierten Komplex I der Leber. Es wurden drei Tiere aus jeder Kohorte massenspektrometrisch untersucht. Die Quantifizierung erfolgte über die Intensitäten der jeweiligen Peaks. In blau ist die Kontrolldiät, in rot die MetR-Diät. Die Werte über den Balken beziehen sich auf die p-Werte im Vergleich zweier Gruppe. In non L-Asp sind D-Asp und β -Asp zusammengefasst.

Aus der Abb. 25 ist zu erkennen, dass der Gehalt an L-Asp-haltigem Peptid, was die eigentliche Form des Peptids darstellt, durch die Fütterung halbiert wurde. Ferner ist anzumerken, dass in den kontrollgefütterten Tieren das L-Asp-Peptid nicht ausschließlich vorkommt: mehr als 30% des untersuchten Peptides beherbergt D-Asp. Die Verteilung der Peptide in MR-Tieren unterscheidet sich

stark davon: der Anteil an L-Asp-Peptid sank von 65% auf 33%, während eine Zunahme an D-Asp-Peptid stattfand – dieses betrug 53% in der MR- und 35% in der CF-Gruppe. Nur in den MR-, aber nicht in den CF-Tieren wurde das β -Asp detektiert, wobei der Anteil an dieser Modifikation etwa 14% betrug. Wenn die D- und β -Asp in nicht-L-Asp zusammengefasst wurden, ergab sich eine Invertierung der Verhältnisse (Abb. 25 rechts).

In der gezeigten Analyse des hepatischen Komplex I von 7 CF- und 7 MR-Tieren wurden insgesamt 6647 Peptide identifiziert. Von diesen enthielten 3300 Peptide mindestens ein Aspartat (Asp). Innerhalb dieser Gruppe stammten 473 Peptide spezifisch von Komplex I, wobei 255 davon mindestens ein Asp enthielten. Für eine technische Qualitätskontrolle wurden von diesen nun die Peptide gefiltert, welche entweder in der CF- oder MR-Kohorte in keinem Tier detektiert wurden. Nach dieser Filterung blieben 199 Peptide übrig. Diese 199 Peptide sind Asp-haltige Peptide aus Komplex I, die mindestens ein „Feature“ in den CF und MR-Kohorten aufwiesen. Bei der Zählung wurden also beispielsweise AAALPVLDAQ(+0.98)R und AAALPVLDAQR als separate Peptide betrachtet. Nun wurden die Features aus allen sieben CF und sieben MR Proben zusammengezählt: theoretisch würden die Isoaspartat-neigende Peptide insgesamt 7 Features in 7 CF-Proben aufweisen und vermutlich 21 Features in MR-Tieren. Anschließend wurde die Summe aller Features eines Peptides in den CF-Tieren und MR-Tieren zusammengezählt und gegeneinander aufgetragen. Die Abbildung 26 zeigt den Auftrag:

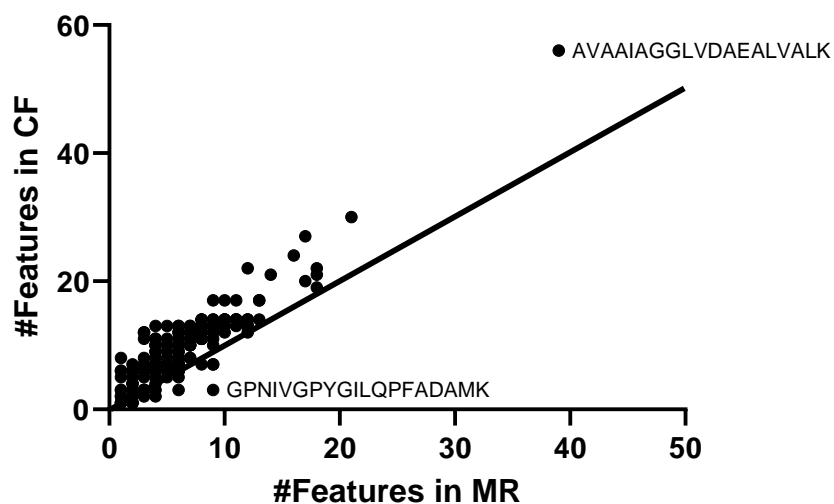


Abbildung 26: Massenspektrometrisch nachweisbare Asp-haltige Peptide im Komplex I, aufgetragen nach der Anzahl der Features in der jeweiligen Kohorte. Bei der eingezeichneten Linie handelt es sich um eine Winkelhalbierende. Peptide, welche besonders weit von der Winkelhalbierenden liegen, sind markiert.

Allgemein können viele (>7 in CF und MR) Features bei einem Peptid auf zweierlei Tatsachen basieren:

- Das Peptid wurde in vielen Protonierungsstufen ($z=2,3,4,5\dots$) gefunden
- Bei dem Peptid handelt es sich um Isomere, speziell D-/ β -Asp

Das Peptid mit den meisten Features (in beiden Kohorten) war das AVAAIAGGLVDAEALVALK aus NDUFS1 mit 56 in CF und 39 in MR. Ebenfalls sticht das bereits bekannte Peptid GPNIVGPYGILQPFADAMK aus mt-ND1 hervor. Dieses Peptid befindet sich unterhalb der Winkelhalbierenden, was anzeigt, dass hier mehr Features in der MR- als in der CF-Kohorte gefunden wurden. Weiterhin wurde der Abstand eines Peptides von der Winkelhalbierenden als ein Maß für die Veränderung des Peptids durch die Fütterung definiert. Je größer dieser Abstand (genauer der Betrag des Abstandes), desto größer scheint die Auswirkung die Fütterung auf das jeweilige Peptid zu sein. Vom besonderen Interesse waren im Rahmen dieser Arbeit diejenigen Datenpunkte (Peptide), welche einen positiven Abstand von der Winkelhalbierenden hatten, da in diesen die Anzahl der Features in MR-Tieren größer war, was ein Hinweis auf eine mögliche Isomerisierung ist.

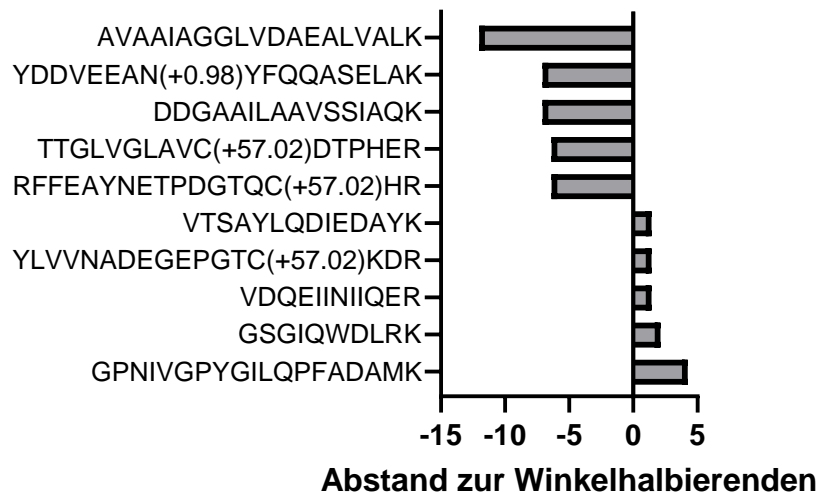


Abbildung 27: Abstand der Punkte aus Abb. 26 zur Winkelhalbierenden. Zu Zwecken der Übersichtlichkeit wurden nur die Top-5-Peptide mit dem niedrigsten und höchsten Abstand dargestellt.

Wie bereits aus Abb. 27 abzulesen war, ist das Peptid mit dem größten Abstand zur Winkelhalbierenden das Peptid AVAAIAGGLVDAEALVALK. Von den Werten mit positivem Abstand zur Winkelhalbierenden (unterhalb von ihr = mehr Features in MR als CF) sticht insbesondere das bereits bekannte Peptid GPNIVGPYGILQPFADAMK.

Unter den 199 bereits erwähnten, Asp-haltigen, Komplex I-zugehörigen Peptiden wurden nun acht Peptide gefunden, in welchen Peaks mit gleicher m/z , aber unterschiedlicher Retentionszeit vorkommen, womit es sich um Isobare handelt. Diese acht Peptide, unbeachtet ihrer Intensität, waren:

337-AVAAIAGGLVDAEALVALK-355 – NDUFS1

484-DDGAAILAAVSSIAQK-499 – NDUFS1

563-DC(+57.02)FIVYQGHGHDVGIADVILPGAAYTEK-592 – *NDUFS1*

656-YDDVEEAN(+0.98)YFQQASELAK-673 – *NDUFS1*

37-IVGPYGILQPFADAMK-54 – *mt-ND1*

72-DSFPNFVAC(+57.02)K-81 – *NDUFB7*

137-N(+0.98)FDFEDVFNIPR-150 – *NDUFA9*

238-QPVYVADVSK-246 – *NDUFA9*

Die fettgedruckten Zahlen am Anfang und Ende des Peptides geben die Position der ersten und letzten Aminosäure des Peptids an in der Untereinheit, die kursiv gedruckt dargestellt ist. Interessanterweise stammten vier von diesen acht Peptiden aus der gleichen Untereinheit, nämlich *NDUFS1*. Als Ursache hierfür käme eventuell die große Dynamik des Proteins infrage (Parey et al., 2021). Ferner wurden membranständige Untereinheiten des Komplexes weniger detektiert, da es sich um hydrophobe Peptide handelt, welche schwerer von Massenspektrometer zu erfassen sind.

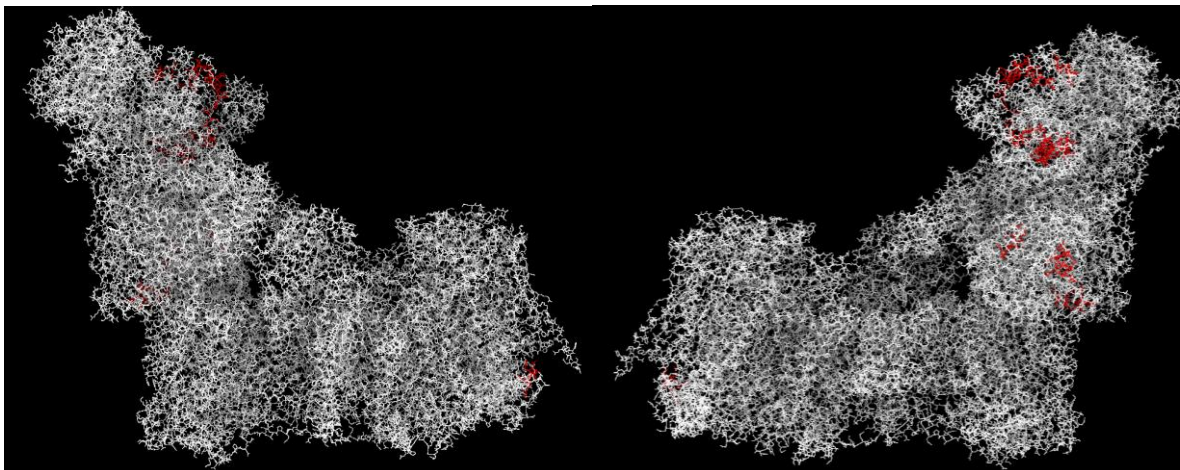


Abbildung 28: D-/iso-Asp-haltige Peptide, in Komplex I. In weiß ist der Komplex dargestellt, während in rot die einzelnen gefundenen Peptide markiert sind. Die Abbildung rechts eine die 180°-Drehung der linken Abbildung um die y-Achse.

In Abbildung 28 sind die gefundenen Peptide auf die Komplex I-Kristallstruktur 7V2C aus der ProteinDataBank gemappt. Es ist zu erkennen, dass die Mehrheit der Peptide im oberen Teil des N-Moduls (peripherer Arm des Komplexes) angesiedelt ist, während sich drei weitere Peptide im Q-Modul des Komplexes befinden. Das Peptid aus der *NDUFB7*-Untereinheit ist am weitesten distal im Membranarm des Komplexes zu finden. Die Gemeinsamkeit dieser Peptide liegt möglicherweise darin, dass sie im äußeren Bereich des Proteins liegen und somit exponiert sind. Dies könnte ihre prinzipielle Neigung zur Isomerisierung erklären.

Unter der Annahme, dass das häufigste Peptid auch das L-Asp-Peptid war, ist zu vermerken, dass die so gefundenen isomerisierten-Asp-Spezies meistens nur eine kleine einstellige Prozentzahl an der Gesamtmenge des Peptids ausmachten. Somit sticht das bereits analysierte IVGPYGILQPFADAMK-Peptid mit über 65% Epi-/Isomergehalt in den MR-Tieren besonders hervor. Das ND1-Peptid war auch das einzige Peptid, welches sichtbar sensitiv auf die Fütterung reagiert hatte (Abb. 29).

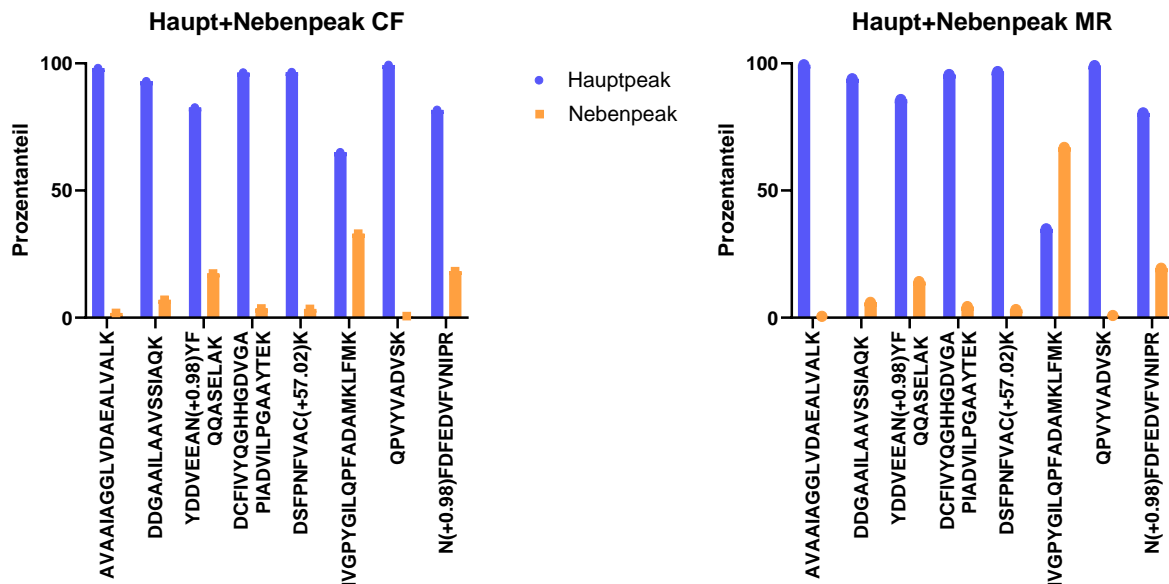


Abbildung 29: Verteilung des Haupt- und Nebenpeaks in den Peptiden mit Isoasparat aus Komplex I. Links sind die Peptide aus den Tieren der CF-Kohorte, rechts aus der MR-Kohorte gezeigt. In blau ist der prozentuale Anteil des Hauptpeaks, in orange der Anteil des Nebenpeaks gezeigt.

Neben dem bereits erwähnten GPNIVGPYGILQPFADAMK-Peptid der ND-1 Untereinheit, sind zwei weitere Peptide vom Interesse, welche eine signifikante Menge an Nebenpeak aufwiesen. Es handelt sich um die Peptide YDDVEEAN(+0.98)YFQQASELAK und N(+0.98)DFEDVFVNIPR aus der NDUFS1- und NDUF9-Untereinheiten. Hierbei ist interessant, dass bei diesen Peptiden eine Deamidierung des Asparagins massenspektrometrisch detektiert wurde. Dies ist insofern interessant, da die Deamidierung von Asparaginen ebenfalls zu Isoaspartatbildung führt. Somit ist das ND1-Peptid das einzige Peptid mit einer signifikanten Menge an nicht-L-Asp, welches sich von Aspartat und nicht Asparagin ableitet und gleichzeitig sensitiv auf die Fütterung reagiert.

5.4.2 Allgemeine Expressionsunterschiede im Proteom durch Methionin-Restriktion

Durch die masspektrometrische Analyse der isolierten mitochondrialen Partikel (engl. *patches*) kann auch ein Einblick in allgemeine Veränderungen des Proteoms gewonnen werden. Dies sollte durch Analyse der Blue Native-Aufreinigungen des Komplex I und des Superkomplexes I+III erreicht werden. Primär von Interesse waren mitochondriale Proteine, da sie Informationen über die mitochondriale

Stressantwort liefern könnten. Im selben Zuge könnte gegebenenfalls auch die damit zusammenhängende mitochondriale Translation untersucht werden.

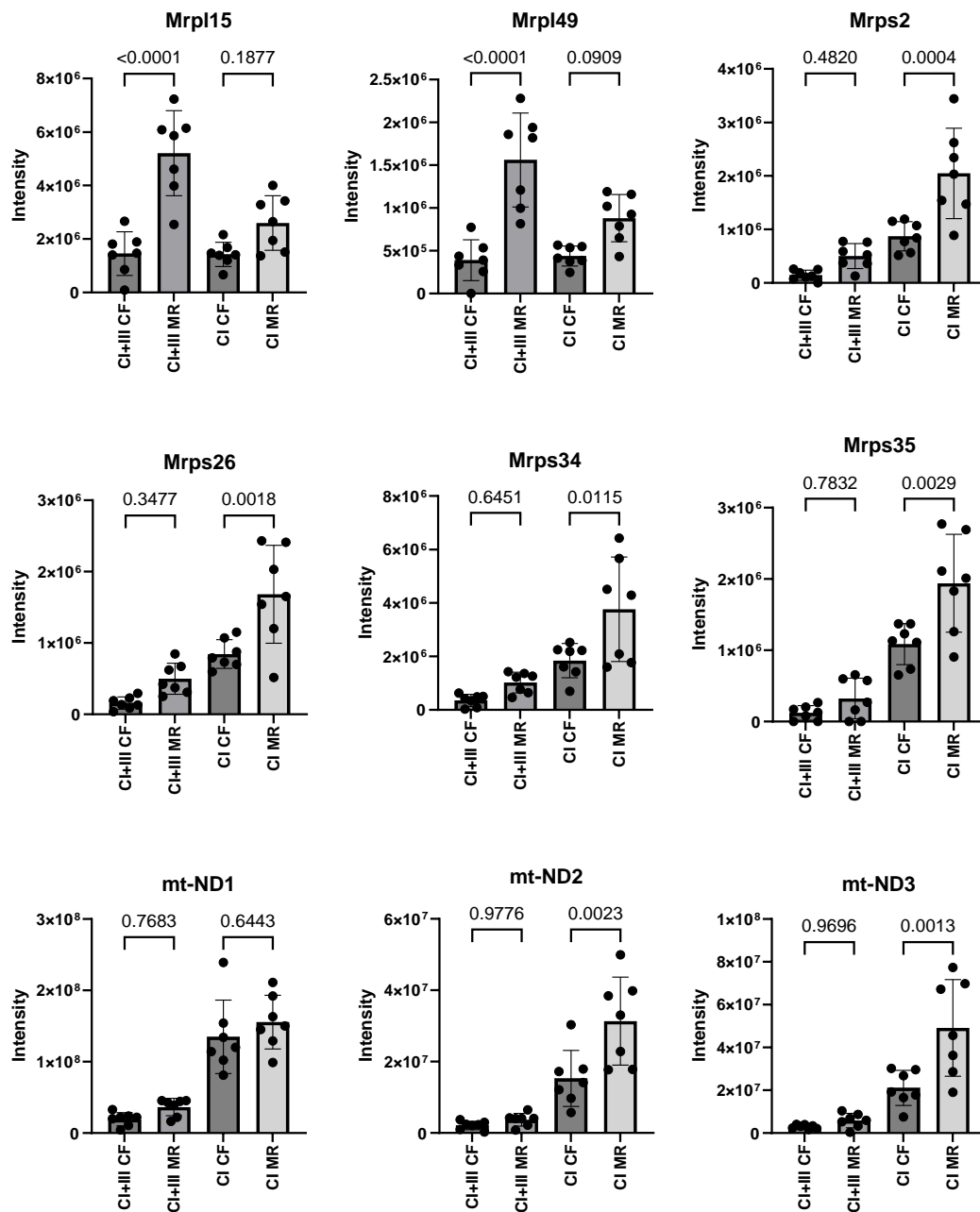


Abbildung 30: Auswertung der Proteinexpression im hepatischen Komplex I (CI) und Superkomplex I+III (CI+III). Untersucht wurden beide Fütterungen, sowohl Kontrolle (CF) als auch Methionin-Restriktion (MR). Der Versuchsaufbau ist im Material- und Methodenteil 4.2.2 dargestellt. Die Zahlen über den Balken geben die p-Werte zwischen zwei Gruppen an.

Aus der Abbildung 30 ist zu erkennen, dass Proteine der mitochondrialen Translation wie die mitochondrialen ribosomalen Proteine Mrps (*mitochondrial small ribosomal subunit protein*) und Mrpl (*mitochondrial large ribosomal subunit protein*) (zwei obere Reihen) in der Methionin-Restriktion hochreguliert waren. Dementsprechend wurde auch der Spiegel an mitochondrial-condierten Untereinheit untersucht. Interessanterweise, während der Spiegel an mt-ND2 und mt-ND3 durch die

MR erhöht wurde, blieb der Spiegel an mt-ND1 konstant. Dies könnte auf eine Bereitstellung der mitokodierten Untereinheiten zur Assemblierungszwecken zurückzuführen sein, da ND1 im Gegensatz zu ND2 und ND3 zum ND1-Modul und nicht zu ND2-Modul angehört (Formosa et al., 2018). Es ist ebenfalls zu beobachten, dass der signifikante Unterschied in den großen ribosomalen Untereinheiten in den Superkomplex-Banden des Blue-Native Gels zu finden war, während bei den kleinen ribosomalen Untereinheiten der signifikante Unterschied in den Komplex I – Banden wahrzunehmen war. Dies liegt am Migrationsverhalten der Proteine in der Blue Native PAGE – offenbar zeigen die Mrpl-Proteine ein ähnliches Wanderungsverhalten wie der Superkomplex I+III, während die Mrps-Proteine vergleichbare Migrationseigenschaften zum Komplex I aufweisen.

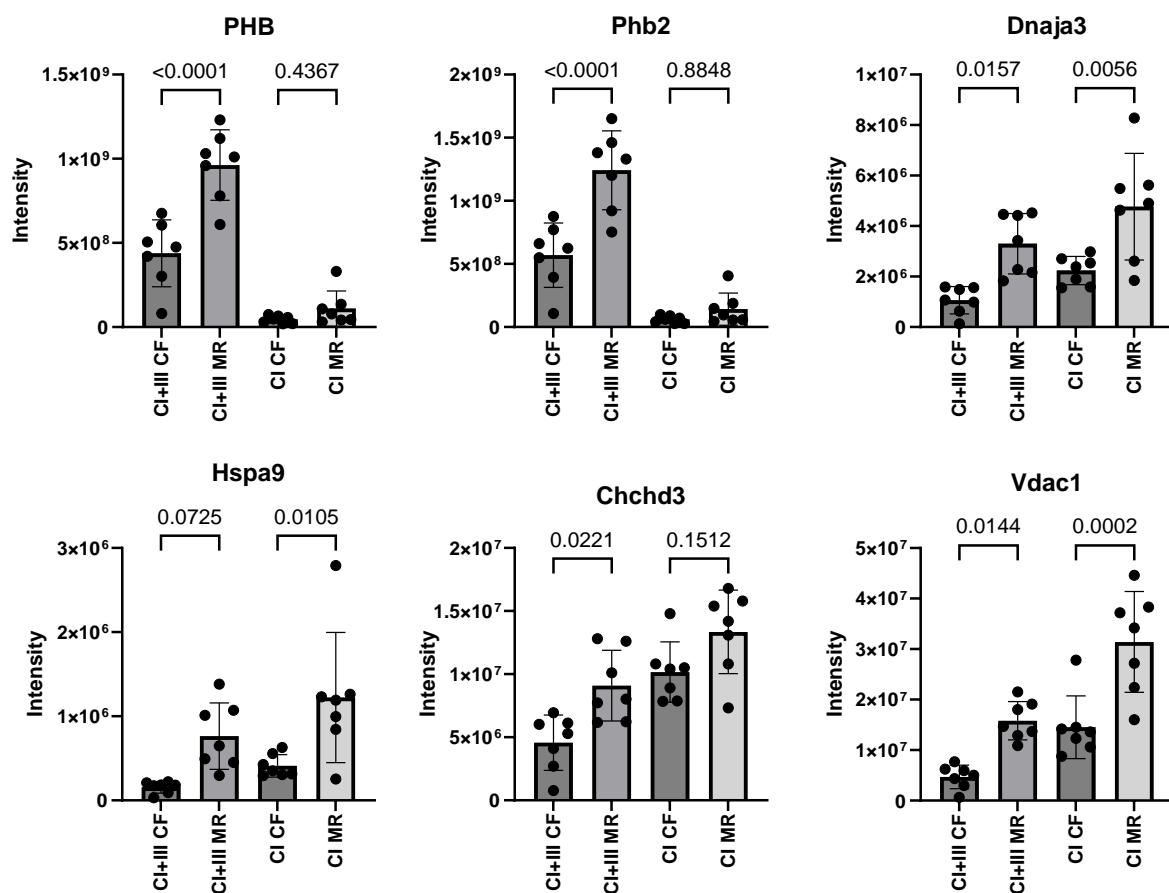


Abbildung 31: Auswertung der Proteinexpression des mitochondrialen Qualitätskontrollsystems im hepatischen Komplex I (CI) und Superkomplex I+III (CI+III). Untersucht wurden beide Fütterungen, sowohl Kontrolle (CF) als auch Methionin-Restriktion (MR). Der Versuchsaufbau ist im Material- und Methodenteil 4.2.2 dargestellt. Die Zahlen über den Balken geben die p-Werte zwischen zwei Gruppen an.

Aus der Transkriptomanalyse (Kapitel 5.1) wurde festgehalten, dass die Methionin-Restriktion eine Induktion der mitochondrialen Qualitätskontrolle (Abb.31) verursacht. Dieses soll durch tatsächliche Proteinniveaus bestätigt werden. Auffällig war eine stark erhöhte Expression der Prohibitine 1 und 2 (Phb und Phb2) durch die Methionin-Restriktion. Prohibitine sind spezielle Chaperone der Atmungskette und ihre erhöhte Expression ist als Antwort auf Schäden der Atmungskette zu werten

(Hernando-Rodríguez et al., **2018**). Ebenfalls auffällig ist, dass beide Proteine hauptsächlich in den Superkomplex-Banden gefunden wurden. Dies ist womöglich auf eine molekulare Assoziation des Prohibitins an den Komplex I oder das Eigengewicht des Prohibitins, was ca. 1MD beträgt (Peng et al., **2015**) Weitere mitochondriale Chaperone, wie Dnaja3 (*DnaJ homolog subfamily A member 3, mitochondrial*) und das bereits erwähnte Hitzeschock-Protein Hspa9 (*Stress-70 protein, mitochondrial*) wurden ebenfalls hochreguliert. Weiterhin war auch das Protein Chchd3 (*MICOS complex subunit MIC19*) und Vdac1 (*Non-selective voltage-gated ion channel VDAC1*) hochreguliert.

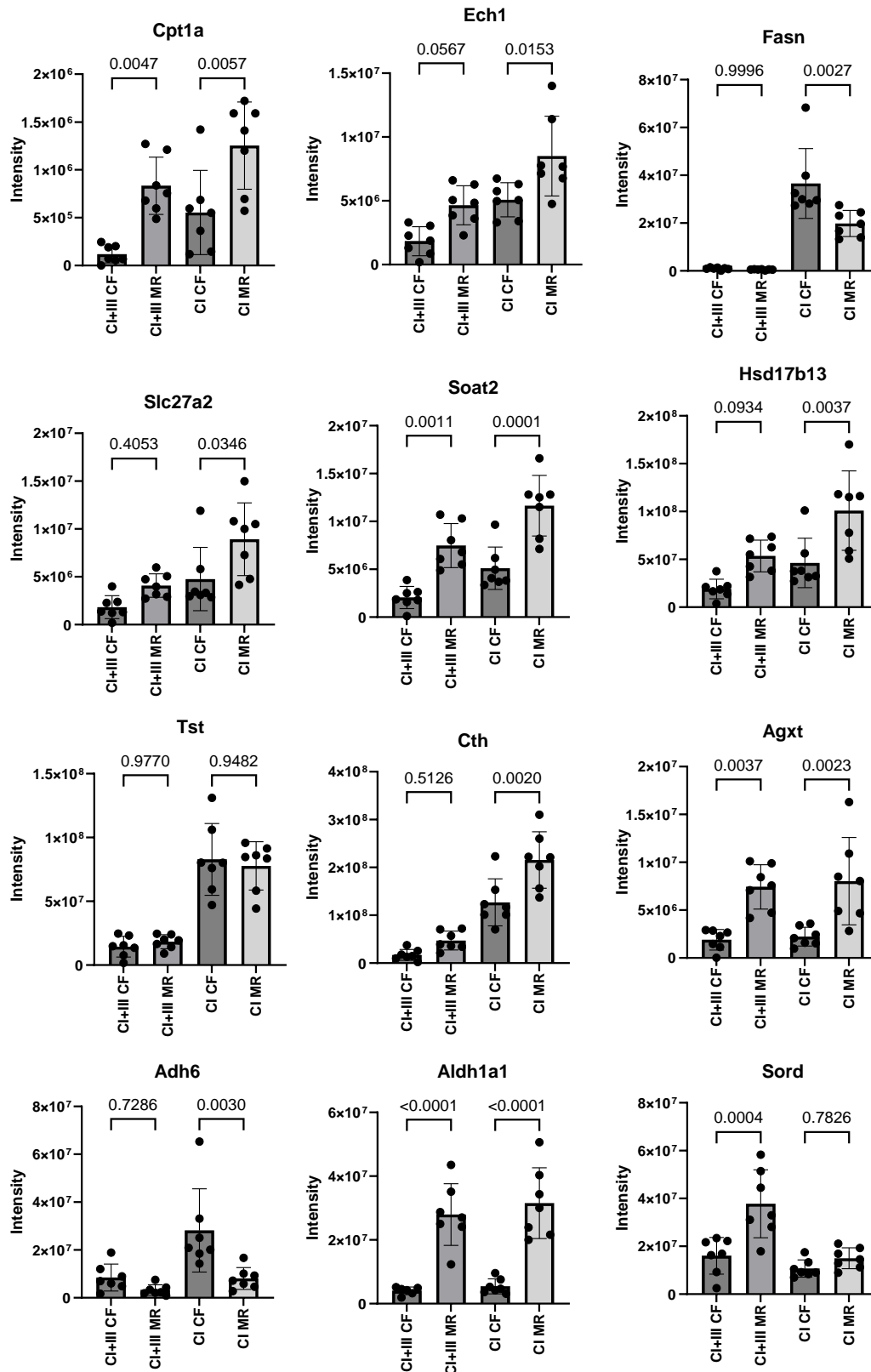


Abbildung 32: Auswertung der Proteinexpression von an Stoffwechsel beteiligten Proteinen in Komplex I (CI) und Superkomplex I+III (CI+III). Untersucht wurden beide Fütterungen, sowohl Kontrolle (CF) als auch Methionin-Restriktion (MR). Der Versuchsaufbau ist im Material- und Methodenteil 4.2.2 dargestellt. Die Zahlen über den Balken geben die p-Werte zwischen zwei Gruppen an.

Da die Methionin-Restriktion einen erheblichen Einfluss auf den Stoffwechsel der Tiere hatte (Kapitel 5.2) wurden hier ebenfalls ausgewählte Proteine quantifiziert (Abb. 32). Die Hochregulation der leberspezifischen Cpt1a (Bestandteil des Carnitinshuttles) und ebenfalls mitochondrialen Ech1 (Enzym der β -Oxidation) wiesen auf eine Umstellung der Leber auf Fettsäureatmung um. Damit ebenfalls im Einklang stand die Herunterregulation der Fettsäuresynthase Fasn. Ferner waren im Zusammenhang mit dem Stoffwechsel der Fettsäuren und Lipiden die Acetylasen Slc27a2, Soat2 und Hsd17b13 erhöht.

Im Zusammenhang mit dem Schwefelstoffwechsel stand eine Hochregulation der Cth (Cystathionin gamma-lyase), was auf eine verstärkte Synthese von Cystein und den Abzug von Methionin aus dem ohnehin verringerten Pool hindeutet. Die ebenfalls mit dem Schwefelstoffwechsel in Verbindung stehende Tst (Thiosulfat-sulfurtransferase) war aber nicht reguliert. Dies ist vom Interesse, da dieses Enzym an der Bildung der Eisen-Schwefel-Cluster beteiligt ist.

Die teils mitochondriale Transaminase Agxt (Alanin-Glyoxylat Aminotransferase) war ebenfalls hochreguliert, was auf eine Induktion der Entgiftungsenzyme hindeuteten könnte. Im Zusammenhang mit der Detoxifikation war die Induktion der Alkoholdehydrogenase Adh6 und der Aldehyddehydrogenase Aldh1a1 zu vermerken.

5.4.3 Das Deamidierungsmuster am Complex I

Es ist beschrieben, dass nicht nur Aspartate, sondern vor allem Asparagine (Asn, N) zur Isoaspartatbildung neigen (Geiger et al., 1987). Das Endprodukt nach der Deamidierung und anschließender Reparatur ist allerdings kein Asparagin mehr, sondern ein Aspartat – es erfolgt somit eine strukturelle und eine ladungsabhängige Veränderung im Protein, da eine neutrale (polare) Aminosäure durch eine geladene ausgetauscht wird. Die Umwandlung von Asn zu Asp ist nicht massenneutral; eine Verschiebung von + 0.98 Da ist leicht mittels Massenspektrometrie zu detektieren.

Zur Eingrenzung der relevantesten Ergebnisse wurde das technische Ausschlusskriterium gesetzt, dass nur diejenigen deamidierten Reste näher untersucht wurden, die in fünf oder mehr Tieren einer Kohorte (MR oder KF) vorkamen. Insgesamt wurden damit zwanzig deamidierten Reste gefunden, darunter 19 Asparagine und ein Glutamin.

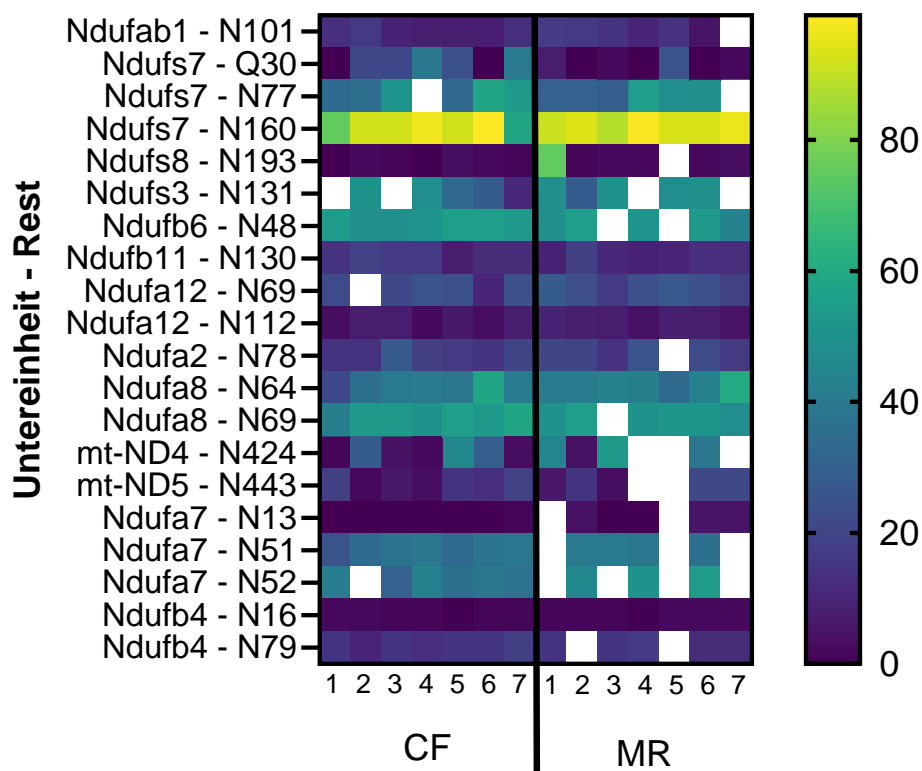


Abbildung 33: Heatmap der deamidierten Aminosäuren im Complex I. Die Angabe erfolgte im Format „Untereinheit-Position der Aminosäure“. Die Farbgebung ist abhängig vom Deamidierungsgrad in (%), entsprechend der Skalierung rechts. Die weißen Stellen indizieren, dass in diesen Tieren keine Deamidierung gefunden wurde.

Aus der obigen Heatmap (Abb. 33) ist zu erkennen, dass der Deamidierungsgrad bei den meisten betroffenen Resten zwischen 0 und 20% lag. Die Reste, die den höchsten Deamidierungsgrad aufwiesen, waren Ndufa8 - Asn69, Ndufb6 – N48 und, mit großem Abstand, Ndufs7 - N160, mit einem durchschnittlichen Deamidierungsgrad von etwa 90%. Dieser Rest liegt nur neun Angström vom N2-Eisen-Schwefel-Cluster entfernt, der elektronischen Senke des Komplex I, welcher auch an dem geschwindigkeitbestimmenden Schritt des gesamten Komplexes beteiligt ist, nämlich der Reduktion des Ubichinons (Magnitsky et al., **2002**). Dieser konstant hohe, fütterungsunabhängige Deamidierungsgrad legt nahe, dass es sich bei dieser Modifikation um keine zufällige, sondern wahrscheinlich um eine funktionelle, nicht-genetische, chemische Modifikation zwecks Veränderung der Geometrie um das Zentrum des Komplex I handelt. Es ist festzuhalten, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fütterungen gab.

6. Diskussion

Als Methionin-Restriktion (MetR) wird eine ernährungsbasierte Maßnahme bezeichnet, im Zuge welcher größtenteils auf die Aufnahme der essenziellen Aminosäure Methionin verzichtet wird. Diese Diät führt zu einer Reihe interessanter Phänotypen, wie Antidiabese oder Langlebigkeit. Im Rahmen der vorliegenden Diskussion werden die gewonnenen Erkenntnisse zur vergleichenden Transkriptom- und Metabolomanalyse, sowohl als auch zu nasschemischen Untersuchungen der MetR zusammengefasst und mit der Literatur verglichen.

6.1 Eine mutmaßliche Komplex I-Inhibition erklärt die transkriptomischen Veränderungen bei MetR

Zur Aufklärung der Mechanismen der Methionin-Restriktion wurde eine vergleichende Analyse der bereits in der Literatur publizierten Transkriptom-Datensätze durchgeführt. Im Rahmen der Analyse hat sich die Erkenntnis herauskristallisiert, dass das Mitochondrium von der MetR betroffen sein könnte (Abb. 7a). Insbesondere wurden die Gencluster der mitochondrialen Translation und der mitochondrialen Qualitätskontrolle als signifikant angereichert gefunden (Abb. 8). Die Induktion der mitochondrialen Qualitätskontrolle zusammen mit einer erhöhten mitochondrialen Translation könnten auf einen Zustand der *mitochondrial unfolded protein response (mtUPR)* – eine mitochondriale Antwort auf eine die Anhäufung fehl- bzw. ungefalteter Proteine hinweisen. In diesem Zustand übersteigt die Menge der fehl- bzw. ungefalteter Proteine die Reparaturkapazität der mitochondrialen Chaperone wie Hspa9 oder Hspe1/Hspd1 (Pellegrino et al., **2013**). Die mtUPR ist in *C. elegans* gut erforscht; es wurde z.B. gezeigt, dass die mtUPR durch die Aktivierung von *ATFS-1* (Analogon in Säugetieren: *Atf5*) induziert wird (Wu et al., **2018**, Fiorese et al., **2016**, Cilleros-Holgado et al., **2023**). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass verschiedene Auslöser der Komplex-I-Hemmung die mtUPR hervorrufen, wie z.B. Piericidin A (Mick et al., **2020**), Rotenon (Runkel et al., **2013**) oder Chloramphenicol (Guerrero-Castillo et al., **2017**).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Konsensus-Modell aufgestellt, welches die signifikanten transkriptomischen Veränderungen, die durch MetR verursacht werden, abbildet (Abb. 10 und 11, Tabelle 11 und 12). Dieses Modell bietet eine Möglichkeit, die Essenz des genomischen Phänotyps der MetR zu erarbeiten. Ein interessantes Gen ist *Asns*, welches für die Asparagin-Synthase kodiert. Dieses Gen war in allen untersuchten MetR-Studien hochreguliert; der durchschnittliche Expressionsänderungsgrad (FoldChange) war mit 6,04 bei diesem Gen am höchsten. *Asns* ist ein induzierbares Gen bei der mtUPR (Quiros et al., **2017**, Bao et al., **2016**), das eine Verknüpfung zwischen MetR und mtUPR auf transkriptomischer Ebene anzeigt. Ein weiteres mtUPR-Gen, was ebenfalls in der MetR stark vertreten ist, war *Fgf21*, ein Mitokin mit einem weitreichenden Einfluss auf den

Metabolismus (Kang et al., **2021**, Kim et al., **2021**). Darüber hinaus wurden mehrere mtUPR-spezifische Transkripte in den überprüften Daten hochreguliert, wie z. B. Dnaja3, Hspd1, Hspe1 und Clpp/Clpx. Es scheint, als würde die mtUPR im Falle der MetR einen milden, kompensierbaren Stress hervorrufen, da hierbei durch die mtUPR nicht zu Schädigungen durch Entfaltung kommt, sondern positive Effekte hervorgerufen werden, wie z.B. Langlebigkeit. Dies könnte auf eine überkompensierte Stressantwort zustandekommen, wie im Falle einer Mitohormesis (Barcena et al., **2018**).

Um das Konsensus-Modell auf Spezifität zu überprüfen, wurde dieses mit mutmaßlich verwandten pharmakologischen Effektoren der Antidiabese auf der Transkriptomebene verglichen (Tabelle 10). Die milden Komplex I-Inhibitoren wie das Biguanid Metformin, das Glimin Imeglimin oder das Fibrat Fenofibrat (Brunmair et al., **2004**) wiesen die höchsten Überschneidungen und die beste Korrelation mit dem MetR-Konsensusmodell auf. Die deutlich potenteren Komplex I-Inhibitoren MPP⁺ oder Rotenon wiesen ebenfalls eine signifikante, wenn auch geringere Überschneidung in der Gensignatur mit dem Konsensus-Modell auf. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die MetR selbst eine milde, kompensierbare Komplex I-Inhibition hervorruft. Die hier untersuchten potenten Inhibitoren Rotenon und MPP⁺ sind dafür bekannt, oxidativen Stress und einen systemischen Schaden auszulösen, welcher in Apoptose und Zelltod endet (Siddiqui et al., **2013**, Cobb et al., **2018**), was nicht von den MetR-Tieren bekannt ist. Weitere Spezifität konnte durch den transkriptomischen Vergleich des Konsensus-Modells mit den Fibroblasten aus Komplex I-defizienten Patienten hergestellt werden. Dieser Vergleich erreichte Signifikanzen in beiden technischen Prüfverfahren. Diese Beispiele könnten als Hinweis dafür genutzt werden, dass eine vermutete Schädigung der Mitochondrien spezifisch auf den Komplex I zurückzuführen sein könnte.

Im selben Zusammenhang wurden weitere Modelle untersucht, welche eine gewisse phänotypische Ähnlichkeit zur MetR aufweisen, wie z.B. durch Rapamycin bedingte Langlebigkeit (Lee et al., **2024**) oder eine AICAR-bedingte Aktivierung der AMP-Kinase, welche ein Hungersignal darstellt (Kim et al., **2016**). Der Vergleich des MetR-Konsensusmodells sowohl mit Rapamycin als auch mit AICAR lieferte weder signifikante qualitative Überschneidungen zwischen den Modellen, noch eine quantitative Korrelation. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass weder die mTOR-Aktivierung noch ein „Hungersignal“ durch die AMPK eine funktionell relevante Konsequenz der MetR darstellt. Der Vergleich des Konsensus-Modells mit dem ER-UPR-Aktivator Tunicamycin (Guha et al., **2017**) lieferte ebenfalls keine signifikanten Überschneidungen, woraus gefolgert werden kann, dass es sich bei der MetR um eine spezifische mtUPR handelt und nicht um eine generalisierte UPR.

Es kann der Schluss gezogen werden, dass eine verringerte Methioninzufuhr in der Nahrung in der Leber zu einer spezifischen mitochondrialen Stressantwort führt. Die spezifische Verbindung zwischen

Methionin und Mitochondrien wirkt überraschend und sollte im Folgenden vertieft durch metabolische Untersuchungen beschrieben werden.

6.2 Eine mutmaßliche Komplex I-Inhibition erklärt die metabolischen Veränderungen bei MetR

Dieser Teil der Arbeit entstand aus einer bereits veröffentlichten Publikation „*Mitochondrial complex I inhibition triggers NAD⁺-independent glucose oxidation via successive NADPH formation, “futile” fatty acid cycling, and FADH₂ oxidation*“ im Fachjournal *Geroscience* am 25.1.2024.

Im vorliegenden Abschnitt wird eine koordinierte Transkriptionsinduktion von Genen, die für Enzyme kodieren, die die Fettsäurebiosynthese und die NADPH-Produktion katalysieren, als Reaktion auf die Hemmung des mitochondrialen Komplexes I beschrieben. In Verbindung mit einer gleichzeitig erleichterten Fettsäureoxidation entsteht ein Zyklus aus Fettsäuresynthese und -abbau, der als Stoffwechselmechanismus zur Umwandlung von NADPH aus dem Pentosephosphatweg in FADH₂ dient, das schließlich über den elektronenübertragenden Flavoprotein-Komplex (ETF) als Brennstoff für die Atmungskette verwendet werden kann. Die hier beschriebene Kopplung des Pentosephosphatwegs mit dem Fettsäurezyklus, auch als „NADPH-FADH₂-Achse“ bezeichnet, bietet einen Weg zur vollständigen katabolen Glukoseoxidation, bei der nicht mehr NADH produziert wird als verbraucht wird. Infolgedessen arbeitet diese Achse in Bezug auf das NADH/NAD⁺-Redoxpaar ertragsneutral. Im Gegensatz zur Glykolyse, bei der alle 24 Elektronen (4 pro C-Atom) aus der Oxidation eines Glukosemoleküls zur Bildung von 10 NADH und 2 FADH₂ führen, entstehen bei der Glukoseoxidation über die NADPH-FADH₂-Achse jedoch nur 12 Moleküle FADH₂ (s. Abschnitt 5.2). Die mitochondriale FADH₂-Oxidation über den ETF-Komplex ist unabhängig von der Komplex-I-Aktivität, sodass eine Blockade dieses Komplexes umgangen wird.

Der beschriebene Weg der NAD⁺-unabhängigen Glukoseoxidation unter Umgehung von Komplex I ist energetisch negativ und führt zu einem Verlust von -19 ATP pro Glukose, im Gegensatz zu einem Gewinn von +32 ATP pro Glukose bei der Kopplung von Glykolyse, Pyruvatdehydrogenase und dem Citratzyklus. Daher ist die NADPH-FADH₂-Achse wohl kein evolutionär ausgewählter Weg der Haushaltsglukoseoxidation für bioenergetische Zwecke, sondern eher als ein Notfallphänomen im Zusammenhang mit der „Glukoseentgiftung“ oder „Notatmung“ anzusehen. Genauer gesagt scheint er die mitochondriale Atmung trotz der Hemmung des Komplexes I in einigen Geweben (z. B. in einer geschädigten Leber) auf Kosten von Energieverlusten in anderen Geweben zu unterstützen, deren Atmungskette noch funktionsfähig ist (z. B. im Fettgewebe). Bei MetR-Ratten lässt das berichtete

Ausmaß der metabolischen Ineffizienz (etwa 150 % der Nahrungsaufnahme pro Körpergewicht (Hasek et al., **2010**; Perrone et al., **2013**) darauf schließen, dass etwa 20 % der aufgenommenen Glukose über die NADPH-FADH₂-Achse metabolisiert werden, während etwa 80 % nach wie vor über die Glykolyse und den Zitronensäurezyklus abgebaut werden. Diese Überschlagsrechnung passt gut zu dem geschätzten 15 %-igen Beitrag der Leber zum Grundumsatz bei Ratten (Even et al., **2001**). Bemerkenswert ist, dass das gesamte, durch die NADPH-FADH₂-Achse erzeugte, ATP in der Leber gebildet wird und das gesamte verbrauchte ATP im Fettgewebe verloren geht, wenn die NADPH-FADH₂-Achse zwischen diesen beiden Geweben gemäß dem in Abb. 14 dargestellten Modell verteilt ist. Es ist plausibel, dass nach der Aufnahme von Nahrungstoxinen, die Komplex I hemmen, die Leber viel häufiger von einer Komplex-I-Hemmung betroffen sind als das Fettgewebe. Mehrere Dutzend solcher hochwirksamen natürlichen Komplex-I-Hemmer, meist aus pflanzlichen Quellen wurden charakterisiert (Degli Esposti, **1998**; Murai et al., **2016**), deren gelegentliche Aufnahme bei Tierarten mit einem breiten Spektrum der Nahrungsaufnahme unvermeidlich erscheint.

Neben einer direkten Intoxikation des Komplexes I durch solche Nahrungschemikalien könnten auch andere Formen der funktionellen Hemmung der Glykolyse und der NADH-produzierenden Achse durch die NADPH-FADH₂-Achse abgepuffert werden.

6.2.1 NADPH-FADH₂-Achse ist zirkadian und räumlich getrennt

Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, dass die beschriebene Stoffwechselkopplung (NADPH-FADH₂-Achse) eine koordinierte physiologische Reaktion darstellt. Erstens wurde die beschriebene Kopplung transkriptionell induziert und war nicht nur die passive Folge einer Metabolitenumleitung, die aus einem einfachen „Überlauf“ von Glucose-6-Phosphat in den Pentosephosphatweg resultierte (Stincone et al., **2015**). Zweitens wurden zusätzlich zum Pentosephosphatweg mehrere andere Wege der NADPH-Bildung induziert, was auf eine koordinierte Anstrengung hindeutet. Drittens waren im MetR-Modell die Transkriptionsreaktionen in Leber und Fettgewebe überwiegend entgegengesetzt, was sehr wahrscheinlich eine gezielte Organkommunikation für ein gemeinsames Ziel widerspiegelt (Abb. 34).

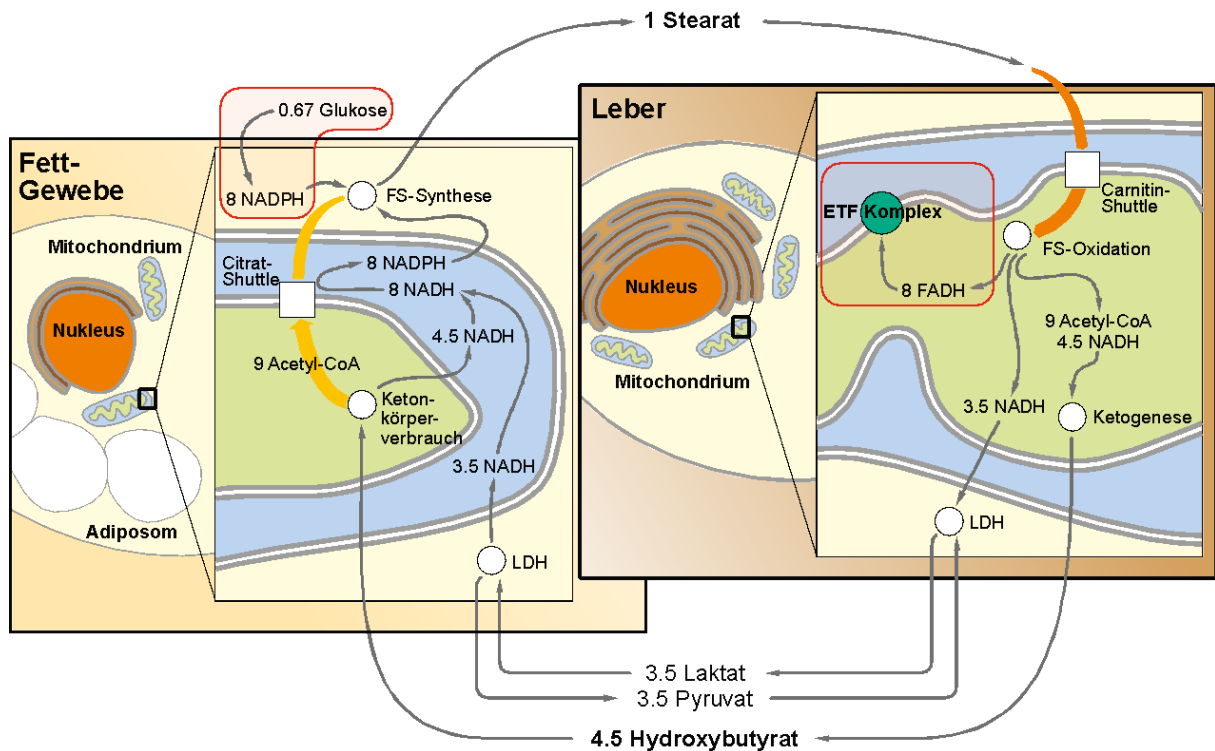


Abbildung 34: Cross-talk zwischen der Leber und dem Fettgewebe während einer hepatischen Komplexe-I Inhibition.

Die Transkriptionsinduktion von Genen, die für die Enzyme eines bestimmten Stoffwechselweges kodieren, sagt nicht unbedingt den Stoffwechselfluss voraus. Zwar werden viele der in dieser Arbeit beschriebenen signifikant induzierten Enzyme allgemein als geschwindigkeitsbestimmend angesehen werden (z. B., G6pd und Tkt für den Pentosephosphat-Stoffwechselweg und Cs, Slc25a1, Acly und Acaca für die Fettsäuresynthese), könnten regulatorische Effekte von allosterischen Inhibitoren, Enzym-Phosphorylierung oder Substrat- und Cofaktormangel den Stoffwechselfluss in vielen Fällen dennoch einschränken (Perrone et al., **2008**; Hue und Taegtmeyer, **2009**; Oosterveer et al., **2009**; Chang, **2023**). Wenn jedoch eine bioenergetisch zunächst paradox angesehene metabolische Kopplung wie die NADPH-FADH₂-Achse auf verschiedene Gewebe oder Tageszeiten verteilt wäre, würden sich viele der potenziellen Antagonismen zwischen Transkriptionsinduktion und allosterischer Hemmung auflösen. Und tatsächlich scheinen beide Arten der Verteilung bei methioninrestriktiven Ratten realisiert zu sein. Wie in Tab. 13 gezeigt, waren mehrere limitierende Enzyme der Fettsäuresynthese durch die Methioninrestriktion *in vivo* antagonistisch reguliert: Die ATP-Citrat-Lyase (Acly) wurde in der Leber signifikant herunterreguliert (0,48-fach), im Fettgewebe jedoch signifikant hochreguliert (1,7-fach). Darüber hinaus wurde die Haushalts-Acetyl-CoA-Carboxylase (Acaca) im Fettgewebe signifikant hochreguliert (3,4-fach), während die regulatorische Acacb, die die β -Oxidation hemmt (Abu-Elheiga et al., **2000**), in der Leber herunterreguliert wurde (0,46-fach). Infolgedessen waren auch mehrere Fettsäuren und Monoacylglyceride in der Leber vermindert, im Fettgewebe jedoch erhöht (Tab. 14) vorhanden (Perrone et al., **2012**).

Interessanterweise wurde bei Methionin-restringierten Ratten bereits ein anderer Verteilungseffekt beobachtet, nämlich die zeitliche Trennung von Fettsäuresynthese und -oxidation. Die zirkadiane Analyse der Respirationsquotienten (RQs) zeigte, dass die Tiere während der Nacht vermutlich eine Nettoumwandlung von Glukose in Fettsäuren durchführten (gekennzeichnet durch einen ungewöhnlich hohen $RQ > 1$), während die Tiere tagsüber trotz einer weitgehend kohlenhydratbasierten Ernährung (20 % Glukose, 48 % Stärke und Maltodextrin, 8 % Fett) fast vollständig auf β -Oxidation angewiesen waren (gekennzeichnet durch einen ungewöhnlich niedrigen $RQ \approx 0,75$) (Hasek et al., **2010**). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit einer hepatischen oder sogar systemischen Umstellung auf die β -Oxidation von Fettsäuren während des Tages, die in der Nacht aus Nahrungsglukose im Fettgewebe frisch synthetisiert wurden.

Zusätzlich zu einer primären Komplex-I-Hemmung könnte eine „Erzwingung“ der β -Oxidation in der Leber durch PPAR-Agonisten (Staels et al., **1998**; Leone et al., **1999**; Hsiao et al., **2017**) einen unabhängigen Auslöser der NADPH-FADH₂-Achse darstellen. Ein ablaufender Fettsäureabbau in der Leber unterdrückt bekanntermaßen die Glukoseoxidation durch mehrere allosterische Effektoren (Hue und Taegtmeier, **2009**), so dass die Leber eine kontinuierliche Fettsäurezufuhr aus dem Fettgewebe über FGF21 und andere Signale benötigt (Inagaki et al., **2007**; Lundasen et al., **2007**). Als Reaktion darauf führt das Fettgewebe eine insulinstimulierte *de-novo*-Lipogenese durch, solange ausreichend Glukose oder Laktat aus der Nahrung für diesen Zweck zur Verfügung stehen (Wong und Sul, **2010**; Lagarde et al., **2021**). In der Summe kann ein hepatischer Wechsel von Glykolyse zu β -Oxidation somit durch Pull-Faktoren (d.h. transkriptionell erzwungene β -Oxidation wie bei der Fibrat-Behandlung) oder Push-Faktoren (d.h. eingeschränkte Glykolyse aufgrund von NADH-Akkumulation nach Komplex-I-Hemmung) induziert werden (Abb. 14).

Dies weist auf eine mechanistische Konvergenz von so unterschiedlichen antidiabetischen Interventionen wie Metformin, Fibraten und Methionin-Restriktion hin. Ob die Pull-Seite oder die Push-Seite bei der Induktion der einzelnen Veränderungen, die die NADPH-FADH₂-Achse etablieren, durchsetzungsfähiger ist, muss noch geklärt werden.

6.2.2 Transport der Metaboliten zwischen betroffenen Geweben

Die bereits erwähnte Trennung des Fettsäurezyklus zwischen zwei verschiedenen Geweben wirft die Frage auf, wie die beteiligten Metaboliten transportiert werden. Der Transport von Albumin-gebundenen Fettsäuren aus dem Fettgewebe in die Leber zur Internalisierung durch die Fettsäuretranslokase (CD36) ist sicherlich der Standardmechanismus in Vorwärtsrichtung (Abb.34). Tatsächlich waren die Gene für CD36 und andere Wege der Lipidaufnahme, wie z. B. VLDL-Rezeptoren, in der Methionin-restringierten Leber stark induziert (Tab.13). In der umgekehrten Richtung müssten

die durch die hepatische β -Oxidation erzeugten Acetyl-CoA-Einheiten sowie ein Molekül NADH pro Acetyl-CoA-Einheit in das Fettgewebe zurückgeführt werden, um den Zyklus formal abzuschließen. Die Produktion von Ketonkörpern würde eine einfache Antwort auf das Acetyl-CoA-Problem und auf 50 % des zu transportierenden NADH geben (die Synthese von β -Hydroxybutyrat aus zwei Acetyl-CoA verbraucht nur ein NADH) (Abb. 34). Es ist seit langem bekannt, dass das Fettgewebe Ketone für die Fettsäuresynthese verwendet, und diese Verwendung wird durch Glukose und Insulin stimuliert (Söling et al., **1969**), d. h. im kohlenhydratgefütterten Zustand, wie er bei methioninrestriktiven Ratten vorliegt. Experimentell wurde ein signifikanter Anstieg von β -Hydroxybutyrat nach Methioninrestriktion im Serum (2,4-fach) und im Skelettmuskel (3,2-fach) von Ratten (Tab. 14) (Perrone et al., **2012**) und im Serum von genetisch adipösen Mäusen (Malloy et al., **2013**) nachgewiesen. Was das restliche NADH betrifft, so ist der Transport als Laktat (das unter Bedingungen eines hohen NADH/NAD⁺-Verhältnisses aus Pyruvat erzeugt wird) eine mögliche Option, da Laktat ein bevorzugtes Substrat für die Lipogenese im Fettgewebe ist, dessen Verwertung wiederum durch Glukose, d. h. im gefütterten Zustand, stimuliert wird (Katz und Wals, **1974**; Lagarde et al., **2021**). Experimentell wurde nicht festgestellt, dass die Laktatwerte im Methioninrestriktionsmodell in vivo dauerhaft erhöht sind. Die signifikante Induktion der Laktatdehydrogenase-mRNA im Fettgewebe (1,7-fach) und im Skelettmuskel (2,6-fach) der methioninrestriktiven Ratten (Tab. 13) könnte jedoch auf eine chronisch erhöhte Verwertung des zirkulierenden Laktats durch diese Gewebe hinweisen. Die Verringerung von Pyruvat in der Leber (0,43-fach) und im Serum (0,24-fach), die zu einem signifikant erhöhten Laktat/Pyruvat (L/P) -Verhältnis von 1,6 bzw. 3,7 führt (Tab. 13), spiegelt möglicherweise eine schnelle, NADH-gesteuerte Umwandlung von Pyruvat in Laktat für den Export aus der Leber in Laktat-verbrauchende Gewebe wider. Das L/P-Verhältnis wurde bereits früher als klinischer Biomarker für erblichen Komplex-I-Mangel verwendet (Loeffen et al., **2000**). Schließlich ist seit langem bekannt, dass sowohl die Laktat- als auch die Ketonkörperproduktion in der Leber durch Metformin und andere Biguanide bei Tieren und Menschen angeregt wird (Luft et al., **1978**; Tessari und Tiengo, **2008**; Tokubuchi et al., **2017**).

6.2.3 Endokrine Steuerung der NADPH-FADH₂-Achse

Die endokrine Koordination der NADPH-FADH₂-Achse zwischen verschiedenen Geweben wird wahrscheinlich durch mitochondrialen Stress induzierte Zytokine (Mitokine) wie FGF21 (Hotta et al., **2009**) und GDF15 (Breit et al., **2020**) gesteuert. FGF21 ist ein endokrines Signal, das die Glukoseaufnahme in Adipozyten stark stimuliert (Kharitonov et al., **2005**). Gleichzeitig löst es die Bereitstellung von freien Fettsäuren durch das Fettgewebe vorzugsweise im gefütterten Zustand, d.h. unter nicht-fastenden Bedingungen, aus (Hotta et al., **2009**). Dieses scheinbar paradoxe Verhalten wird in einem Szenario verständlich, in dem der Leberkomplex I vorübergehend durch ein

nahrungsmittelbedingtes Toxin gehemmt wird. Um irreversible Leberschäden durch ATP-Mangel zu verhindern, wird die NADPH-FADH₂-Achse aktiviert, über die die Leber mit lebensrettenden Fettsäuren versorgt wird, während das Fettgewebe die überschüssige Glukose verwertet und abbaut. Da FGF21 ein Zielgen von PPAR α ist (Inagaki et al., **2007**; Lundasen et al., **2007**), könnte es ein nachgeschalteter Mediator des Fettsäurezyklus sein, wie er durch Fibrate (Oosterveer et al., **2009**) und andere Auslöser der PPAR α -Aktivierung, darunter Methioninrestriktion (Perrone et al., **2010**) und Metforminbehandlung (Maida et al., **2011**; Arruda et al., **2020**), induziert wird. Es hat sich gezeigt, dass FGF21-Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen in mehreren Schlüsselaspekten nicht auf Methioninrestriktion reagieren (Wanders et al., **2017**; Forney et al., **2020**; Fang et al., **2021**), insbesondere im Hinblick auf ihren Energieverbrauch und ihre Insulinsensitivität. In der Leber war die Modulation der Genexpression durch Methioninrestriktion bei FGF21-Knock-out-Mäusen jedoch unverändert, was auf zusätzliche Regulatoren der NADPH-FADH₂-Achse in diesem Organ hindeutet. Es ist zu vermuten, dass GDF15 eine entscheidende Rolle spielt, auch wenn die Methioninrestriktion bei GDF15-Knock-out-Mäusen noch nicht untersucht wurde.

Zusammenfassend ergibt sich die Schlussfolgerung, dass auch die metabolische Veränderung bei MetR in der Leber eine ursächliche, primäre Komplex I-Inhibition zu spiegeln scheinen. Die Überlappung der Befunde aus Transkriptom- und Metabolomanalysen deutet auf eine spezifische Komplex I-Hemmung bei MetR. Dieser Theorie wurde anschließend mithilfe von authentischem Lebergewebe aus MetR-Ratten nachgegangen.

Da als Ergebnis dieser Untersuchungen eine erhöhte iso-Asp-Bildung in Komplex I festgestellt wurde, wird in Folgendem die Biochemie des Isoaspartats zusammengefasst.

6.3 iso-Asp-Bildung als eine Ursache der Komplex I-Hemmung in der MetR

Die in Proteinen enthaltenen Aminosäuren unterliegen vielfältigen chemischen Reaktionen, wie z.B. Oxidationen, Acetylierungen oder Phosphorylierungen. Diese Reaktionen sind für die zelluläre Organisation und den Ablauf von Reaktionskaskaden unerlässlich. Die Reaktivität von Aminosäuren variiert stark, wobei aromatischen und schwefelhaltigen Aminosäuren ohne enzymatische Beteiligung am reaktivsten sind (Xu et al., **2005**; Granold et al., **2017**).

Eine mögliche Einteilung der chemischen Reaktionen an den Aminosäureresten in Proteinen ist durch die Beteiligung eines Enzyms möglich. Das Paradebeispiel einer enzymatischen posttranslationalen Modifikation (PTM) ist die Phosphorylierung, die von über 500 verschiedenen Kinasen (in Menschen) an Tausenden von Substraten durchgeführt wird (Duong-Ly et al., **2013**). Die nicht-enzymatischen

PTMs hingegen treten spontan auf und können in reversible und irreversible PTMs unterteilt werden. Eine der reversiblen, nicht-enzymatischen PTMs, die jedoch eher selten untersucht wird, ist die Isomerisierung. Diese kann an verschiedenen Aminosäuren, wie Phenylalanin (Buczek et al., **2005**) oder Aspartat und Asparagin (Geiger und Clarke, **1987**) auftreten.

Der Mechanismus hinter der Isoaspartatbildung und -reparatur gilt als weitgehend geklärt (Clarke, **1987**). Der nukleophile Angriff des C-terminalen Stickstoffatoms der Peptidbindung auf die Carboxylgruppe (bzw. Carbamidgruppe bei Asparagin) führt zur Dehydratisierung (Deamidierung) unter Bildung eines fünfgliedrigen Succinimid-Intermediates (Abb. 35). Dieses kann nun spontan auf zwei Weisen hydrolysieren: Durch den nukleophilen Angriff des Wassers auf eine der beiden Carbonylgruppen kann nun entweder das Aspartat zurückgebildet werden, oder es entsteht ein Isoaspartat, je nachdem an welcher Carbonylgruppe (1 oder 2, s. Abb. 35) der Angriff von Wasser erfolgt. Ein Isoaspartatrest in der Peptidkette führt zur Verlängerung dieser um eine Methyleneinheit, wodurch die gewöhnlichen Abstände in einer α -Helix nicht eingehalten werden können – es kommt zu Proteinschäden (Wang et al., **2023**). Das Isoaspartat kann nun an der neu gebildeten β -Carboxygruppe durch das Enzym PIMT (**P**rotein-**I**soaspartyl-**O**-**M**ethyltransferase) mit Hilfe von S-Adenosylmethionin zum entsprechenden *O*-Methylester methyliert werden, der unter Methanolabspaltung zum Succinimidintermediat zurückzyklisiert. Nach der Zyklisierung kann der oben dargestellte Zyklus erneut beginnen (Vigneswara et al., **2006**).

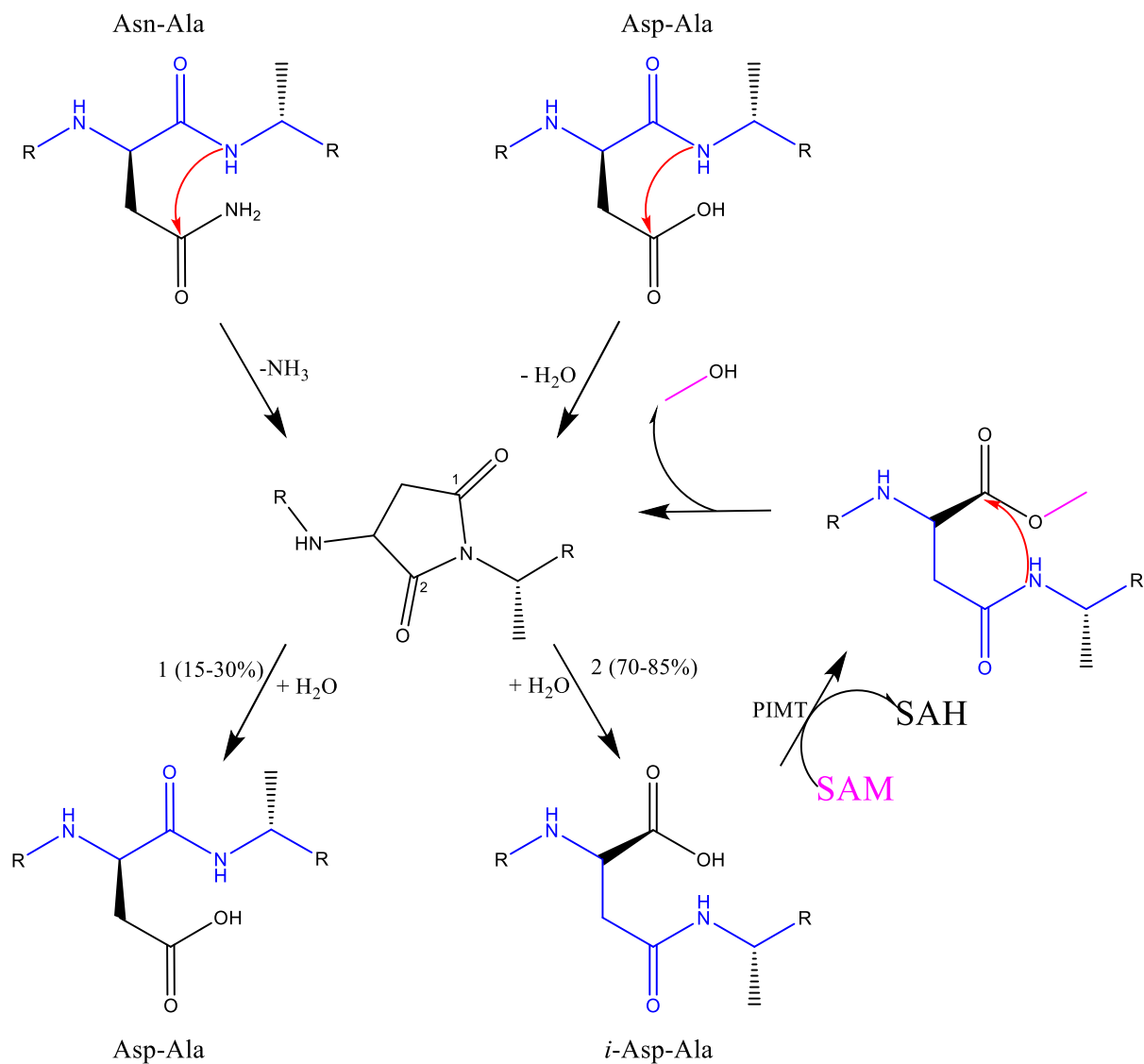


Abbildung 35: Chemischer Mechanismus der Isoaspartat-bildung und -reparatur.

Interessanterweise hat die C-flankierende Aminosäure einen großen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Bildung des Isoaspartats. Die Wahrscheinlichkeit zur Bildung eines Isoaspartats steigt, wenn Glycin, Serin oder Histidin auf das Aspartat folgen. Die N-flankierende Aminosäure hat keinen nennenswerten Einfluss auf die Isomerisierung (Robinson und Robinson, **2001**). Außerdem findet die Isomerisierung leichter in flexiblen Strukturen des Proteins, und weniger leicht in α -Helices und β -Faltblättern statt (Xie und Schowen, **1999**). Die Fähigkeit, Iso-Asp-Reste zu bilden, wird oftmals untersucht, indem die Proteine bei 37°C natürlich altern gelassen werden. Isoaspartat wurde bereits in Angiogenin (Hallahan et al., **1992**), Calmodulin (Johnson und Aswad, **1985**), Tubulin (Najbauer et al., **1996**) und anderen Proteinen nachgewiesen. Bisher wurde kein mitochondriales Protein mit Isoaspartat charakterisiert.

Das Enzym, das am engsten mit der Biochemie des Isoaspartats verbunden ist, ist die bereits erwähnte Protein-Isoaspartyl-Methyltransferase (PIMT). Dieses kleine Enzym (25 kDa) wurde 1989 erstmals als

eine Carboxymethyltransferase beschrieben (Henzel et al., **1989**). Nach aktueller Literaturlage ist die PIMT *in vivo* ausschließlich zytosolisch lokalisiert.

Obwohl es bisher keine Hinweise darauf gibt, dass PIMT in Säugetieren mitochondrial lokalisiert sein kann, gibt es Belege dafür, dass ein Proteinprodukt eines PIMT-Pseudogens in Bakterien mit Komplex I assoziiert ist. Ivanov et al. beobachteten, dass im α -Proteobakterium *Paracoccus denitrificans*, eine neue Variante der L-Isoaspartyl-O-Methyltransferase als Untereinheit von Komplex I existiert (Ivanov et al., **2024**). *Paracoccus denitrificans* wird auch als Model für das Studium von Säugetiere-Komplex I verwendet, da es den vollständigen Basissatz an Komplex I-Proteinen (14 UE) aufweist, aber nur drei akzessorische Untereinheiten. Interessanterweise ist die PIMT-Variante, die in *P. denitrificans* an Komplex I bindet, inaktiv: Die wichtigen Reste Thr60 und Ser62 der kanonischen PIMT sind mutiert, ebenso Asp134 und Gly135, was die Bindung der Cofaktoren und Substrate verhindert und somit diese CI-PIMT-Variante mit an Sicherheit grenzende Wahrscheinlichkeit inaktiv macht (Bennett et al., **2003**).

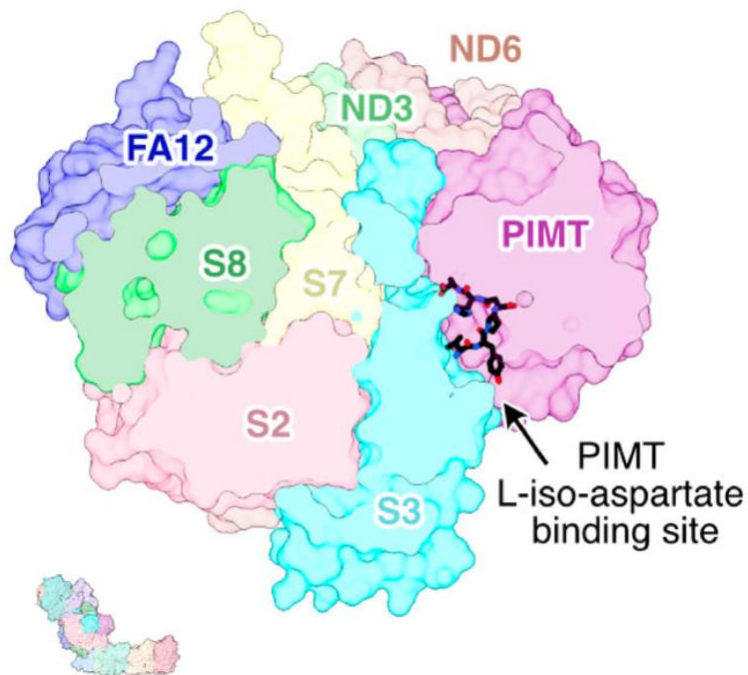


Abbildung 36: Die PIMT-Variante in *P. denitrificans*, gebunden an Komplex I. Die Domäne, welche Isoaspartatreste erkennen sollte, zeigt nach innen, was daraufhin deutet, dass das Enzym nicht funktionsfähig ist. Übernommen aus Ivanov et al. **2024**.

Darüber hinaus sind PIMT-KO-Mäuse wegen ihres besonderen Phänotyps von Interesse. Durch den KO des Reparaturenzyms kommt es zu einer abnormalen Anhäufung von Isoaspartatresten, was im frühen Tod der Tiere (44 Tage) resultiert. Die Todesursache war vermutlich in allen Fällen ein epileptischer Anfall. Die Häufigkeit der epileptischen Anfälle geht mit einer 9-fachen Erhöhung der Isoaspartatmenge im Gehirn im Vergleich zu heterozygoten Mutanten und dem Wildtyp einher (Yamamoto et al., **1998**). Die heterozygoten Tiere haben wiederum eine normale Lebensdauer (745 Tage beim Wildtyp vs. 649 Tage bei den heterozygoten Tieren) (Farrar et al., **2002**). Interessant ist auch

die Tatsache, dass die PIMT-KO Tiere ebenso wie die MetR-Tiere deutlich kleiner sind und weniger wiegen (Yamamoto et al., **1998**). Darüber hinaus zeigen die Gehirne der KO-Tiere erhöhte SAM- und verminderte SAH-Spiegel, insbesondere im Hippocampus. Dies könnte auf eine kompensatorische Antwort zurückzuführen sein.

Die PIMT-Deletion und die Methionin-Restriktion ähneln sich insofern, als das in beiden Fällen möglicherweise die Reparaturfähigkeit für Isoaspartatreste eingeschränkt ist; im ersten Fall ist zwar im Organismus ausreichend SAM vorhanden, aber das Reparaturenzym fehlt, sodass die Reparatur nicht stattfinden kann. Im Falle der Methionin-Restriktion läge das Problem aber an dem Mangel des S-Adenosylmethionins, während die PIMT funktionsfähig sein sollte. Die Hypothese der Vergleichbarkeit der beiden Modelle wird dadurch gestützt, dass die PIMT die erste Methyltransferase ist, welche unter einem SAM-Mangel (und SAH-Anstieg) funktionell und katalytisch zum Erliegen kommt (Clarke und Banfield, **2002**). Diese Folgerung lässt sich mit den zuvor gewonnenen Erkenntnissen aus den Transkriptomdaten über die apparente Schädigung des Mitochondriums verbinden. Um der Komplex I-Isoaspartat-Hypothese nachzugehen, wurde ein Screening der Komplexe der Atmungskette mittels Western Blots in Leber und Herzen der MetR-Tiere durchgeführt.

Dieses zeigte auf, dass ein spezifischer monoklonaler Antikörper gegen die mt-ND1 Untereinheit des Komplex I eine Abnahme des Signals in den MetR-Tieren verzeichnete, während andere Antikörper gegen weitere Komplexe der Atmungskette keinen Unterschied zwischen den CF- und MR-Gruppen detektiert haben. Dieser Effekt war nur in der Leber zu vermerken, das Herz im Gegenteil wies keine Unterschiede in der Atmungskette auf. Diese Spezifität könnte zu erklären sein, indem in Betracht gezogen wird, dass unter einem Hungerzustand (in diesem Fall mangelhaftem Met / SAM) das Gehirn oder in diesem Fall das Herz überlebenswichtiger für den Organismus als die Leber ist, woraufhin sich die Leber „opfert“, um andere Organe mit essenziellen Aminosäuren/Kofaktoren zu versorgen. Dies ist auch z.B. der Fall bei der Selenversorgung des Gehirns (Schweizer et al., **2005**). Die Untersuchung derselben Untereinheit in der Leber mit einem anderen, polyklonalen Antikörper zeigte jedoch keinen Unterschied in der Expression, woraus gefolgert werden könnte, dass die Expression des Proteins in beiden Kohorten gleich war und, dass lediglich die Bindung des ersten, monoklonalen Antikörpers in den MetR-Tieren aufgrund der Beschaffenheit des Epitops nicht mehr richtig erfolgen konnte. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte diese Annahme, da die Expression der mt-ND1 Untereinheit in beiden Gruppen in der Tat vergleichbar war und lieferte die Erkenntnis, dass keine massenverändernden Modifikationen am fraglichen Epitop vorhanden sind. Deswegen wurde ein Isoaspartatrest (D51) innerhalb des Epitops als ursächlich vermutet.

Da sich der monoklonale Antikörper als ein nützliches Werkzeug zur Analyse des betroffenen Komplex I erwiesen hatte, wurden die nachfolgenden Assays zur Charakterisierung des Antikörpers und der

Reparatur des vermeintlichen Schadens mittels diesem durchgeführt. Es wurde eine Sensitivität des Antikörpers für das L-Asp-Blockpeptid festgestellt, während der Antikörper um mehrere Zehnerpotenzen schlechter an das Blockpeptid mit D- oder Iso-Aspartat band. Der Reparaturassay mittels der PIMT lieferte somit weitere Hinweise auf das Vorhandensein eines Isoaspartats in der mt-ND1 Untereinheit. Dieser Assay ist weit verbreitet in der isoAsp-Forschung und wird zur großflächigen Bestimmung der Isoaspartate verwendet (Paranandi et al., **1994**).

Die Massenspektrometrie kann am besten Unterschiede in der molaren Masse von Verbindungen detektieren – der Nachweis einer massenneutralen Modifikation, wie einer Isomerisierung, erweist sich als problematisch. Glücklicherweise konnten die drei synthetischen Varianten des Peptides über eine HPLC-Säule aufgetrennt und anschließend im Massenspektrometer detektiert werden (Abb. 23). Die Ergebnisse bestätigten die aufgestellte Vermutung: in den MetR-Tieren wurden alle drei Varianten des ND1-Peptides gefunden. Im Vergleich zu den CF-Tieren waren die Peptide mit nicht-L-Asp in MR-Tieren doppelt so häufig vertreten wie das eigentliche L-Asp-Peptid.

Die Einzigartigkeit des D51-Aspartats in der mt-ND1 Untereinheit besteht darin, dass dieses als einziges Aspartat im Komplex I durch die Änderung der Fütterung mehr Isoaspartat bildete (Abb. 29). Zwar wurden 8 weitere isoAsp-haltige Peptide innerhalb des Komplex I gefunden, allerdings reagierte kein anderes Peptid fütterungsabhängig mit einer erhöhten Bildung von Isoaspartat. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass nur das ND-1 Peptid von der PIMT im normalen Zustand repariert wird, während die anderen Peptide aufgrund ihrer Lage im Komplex ein basales Niveau an Isoaspartat aufweisen, welches nicht von der PIMT repariert wird. Ferner war es das D51 im ND1-Protein, welches bereits in der CF-Gruppe zur Asp-Isomerisierung neigte, und das obwohl primär Asparagine zur Isoaspartatbildung neigen, was auch in dieser Arbeit zu sehen war. Diese Erkenntnisse legen eine besondere Vulnerabilität des D51 innerhalb des Komplex I nahe.

Die betroffene Untereinheit ND1 des Komplex I umfasst 318 Aminosäuren mit acht transmembranen Helices (TMH) (Rákosníková et al., **2023**). Das Aspartat-51 (D51) liegt in einer nicht-transmembranären Helix und ist, wie bereits gezeigt, stark konserviert. Im analysierten Peptid nimmt das zu betrachtende Aspartat an drei Wasserstoffbrückenbindungen (H-Brücken) teil: auf einer Seite wird das Peptidrückgrat der α -Helix durch das Stickstoffatom des Aspartats-51 mit der Carbonylgruppe des Glutamins-47 (Q47) zusammengehalten; auf der anderen Seite entsteht eine H-Brücke zwischen der Carbonylgruppe des D51 und dem Leucin-55 (L55). Interessanterweise sind sowohl das N47 als auch L55 genau wie das D51 absolut konserviert. Die dritte H-Brücke befindet sich zwischen der Carbonylgruppe der β -Carboxygruppe und dem Serin-21 (Ser21) des Ndufs7-Proteins. Der untersuchte D51-Rest erfüllt eine wichtige Rolle in der Ausbildung des sogenannten Q-Kanals, eines etwa 30 Å

langen Tunnels, welcher am N2-Fe-S-Cluster endet und die Reduktionsstelle des Ubichinons darstellt (Baradaran et al., 2013; Yoga et al., 2019).

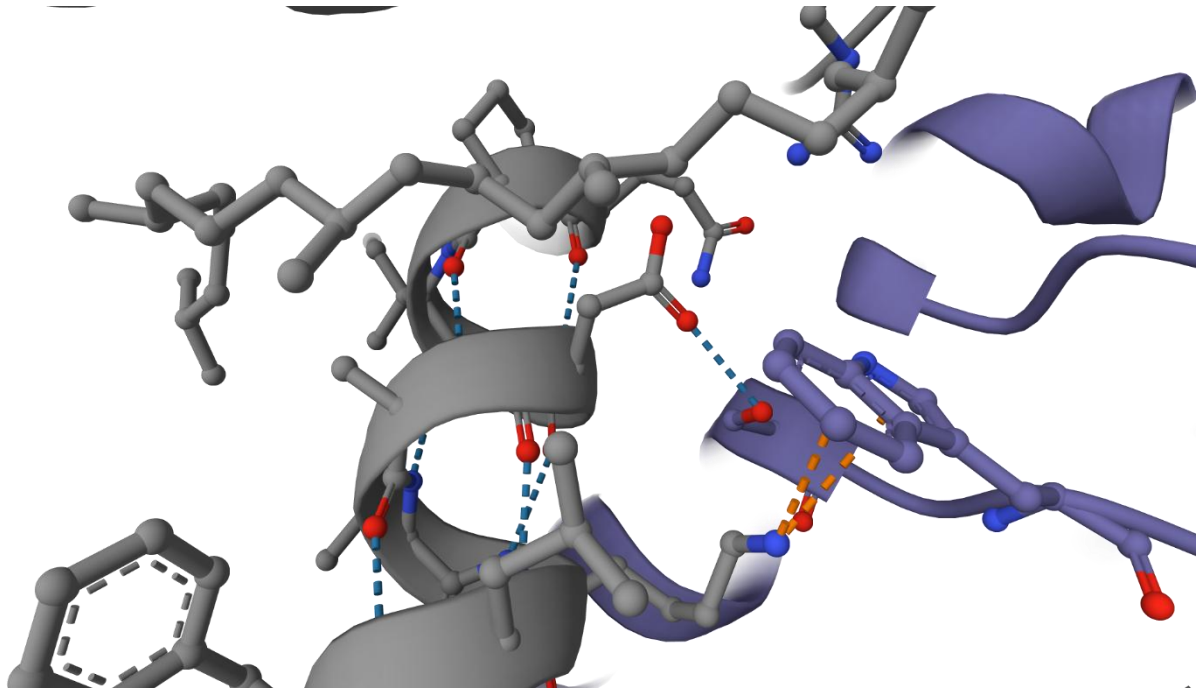


Abbildung 37: Rolle des Aspartats-51 (zentriert) in der Struktur des Komplex I. Es ist zu erkennen, dass D51 drei H-Brücken ausbildet und in unmittelbarer Nähe zum Ubichinon (im Vordergrund) liegt. In grau ist die ND1-Untereinheit dargestellt, während in violett die Ndufs7-Untereinheit gezeigt ist. Gestrichelte Linien sind H-Brücken. Als Modell wurde die kristallografische Struktur 7V2C der PDB genommen.

Vom Interesse ist ebenfalls weitere räumliche Ausrichtung des Restes und seine Umgebung. Das D51 liegt in räumlicher Nähe zum Ubichinon (Q10) – der Abstand zwischen der Methylengruppe des Restes und dem C41 des Q10 beträgt 3,36 Å, während der Abstand zwischen der Carboxylgruppe und dem C38 lediglich 4,11 Å groß ist. Da die Doppelbindung 4, vom Ende des Schwanzes gezählt, eine erhöhte Elektronendichte aufweist, ist eine mögliche elektronische Wechselwirkung denkbar. Ebenfalls vom Interesse sind N47 und Arginin-25 (R25) der ND1-Untereinheit. Diese Reste liegen ebenfalls in räumlicher Nähe zum D51 und können durch ihre geladene bzw. basische Natur einen Einfluss auf die räumliche Stabilität der Helix bzw. des Q-Kanals ausüben. Der Abstand zwischen der Carbonylgruppe des D51 und der Guanidinogruppe des R25 beträgt 4,2 bzw 3,45 Å (Abb. 38).

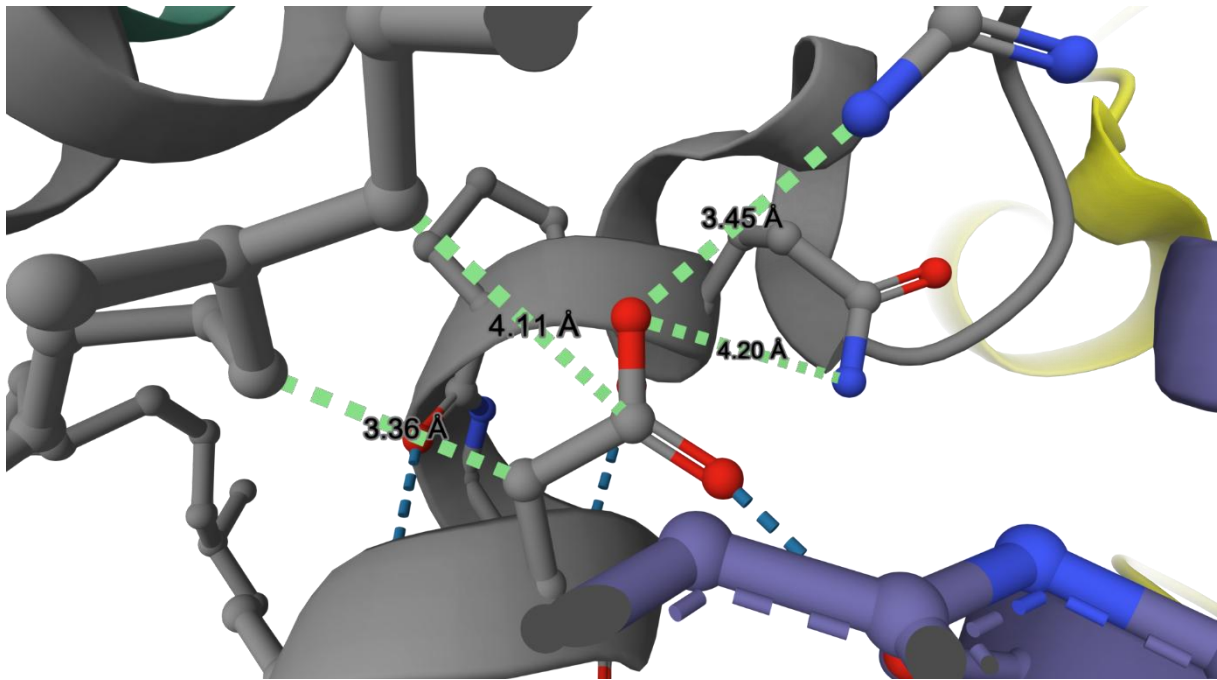


Abbildung 38: Räumliche Partner des D51. In grau ist die ND1-Untereinheit dargestellt, während in lila die Ndufs7-Untereinheit gezeigt ist. In gelb ist die Ndufa12-Untereinheit erkennbar. Gestrichelte Linien sind H-Brücken; grüne dick gestrichelte Linien sind die jeweiligen Abstände. Als Modell wurde die kristallografische Struktur 7V2C der PDB genommen.

Der mitochondriale Komplex I (MCI) ist der größte und initiale Komplex der Atmungskette und besteht in Säugern aus 44 verschiedenen Untereinheiten (Wirth et al., **2016**). Von diesen Untereinheiten werden 14 als Core-Einheiten bezeichnet, deren Vorhandensein für die Funktion des Komplexes von entscheidender Bedeutung ist. Sieben der vierzehn Core-Einheiten werden vom mitochondrialen Genom kodiert. Die übrigen, nicht-Coreeinheiten werden als akzessorisch bezeichnet und fungieren häufig als Chaperone. Die Funktion des MCI besteht in der Oxidation von NADH zu NAD⁺, wobei die dabei entstehenden Elektronen auf das Ubichinon übertragen werden, was zur Reduktion des Ubichinons zu Ubichinol führt. Hierbei werden aktiv vier Protonen in den Intermembranraum transportiert. Der durch diese Protonenpumpe erzeugte Protonengradient ist essentiell für die ATP-Synthese.

Der mitochondriale Komplex I ist ein Angriffspunkt für eine Vielzahl von niedermolekularen Substanzen, wie natürlich vorkommende Flavonoide und daraus ableitenden Wirkstoffen. Ein prominentes Beispiel für die Hemmung des Komplex I ist das weit verbreitete Antidiabetikum Metformin (Fontaine et al., **2018**). Neuere Studien haben mehrere Angriffspunkte für Biguanide wie Metformin oder Phenformin am Komplex I identifiziert (Bridges et al., **2023**). Darüber hinaus sind sekundäre Metaboliten wie die Familie der Piericidine (Yoshida et al., **1978**) und Acetogenine (Eposti et al., **1994**) potente Hemmer von Komplex I.

Komplex I als großes Enzym (960 kDa) ist häufig von Mutationen betroffen. Humanpathogene Mutationen wurden in allen sieben mitochondrial-codierten Untereinheiten und in mehr als zwanzig

kernkodierten Untereinheiten gefunden (Fassone et al., **2012**). Zu den häufigsten durch Komplex I-Defizienz verursachten Erkrankungen gehören die Lebersche Hereditäre Optikusneuropathie (LHON) (Howell und McCullough, **1990**), die „Mitochondriopathie mit Enzephalomyopathie, Laktatazidose und schlaganfallähnlichen Episoden“ (MELAS) (Yamanaka et al., **1987**) und das Leigh-Syndrom (Van Erven et al., **1986**). In den meisten Fällen werden diese Erkrankungen durch Mutationen in der mtDNA verursacht, wobei in Detail bis heute unklar ist, wie verschiedene Mutationen im gleichen Gen (und sogar an der gleichen Position) zu verschiedenen Pathophänotypen führen können: m.11778G>A (R340>H340) in mtND4 verursacht LHON, während m.11777C>A (R340>S340) das Leigh-Syndrom verursacht (Wallace et al., **1988**; Hadzsiev et al., **2010**; Rodenburg, **2016**). Für diese Arbeit ist die Mutation m.3460G>A von besonderem Interesse, die in der mt-ND1-Untereinheit vorkommt. Im Zuge dieser Mutation wird Ala52 in Thr52 umkodiert, was zum LHON-Krankheitsbild führt. Durch Simulation der oben genannten Mutante wurde festgestellt, dass die Mutante weniger stark an Q10 bindet, obwohl die Q10-Kopfgruppe näher am N2-Fe-S-Cluster liegt. Das entscheidende Problem könnte sein, dass durch den Aminosäureaustausch die Seitenkette größer wird und durch mechanische Blockade und ungünstigere elektrostatische Natur (Wechsel unpolar nach polar) die Kopfgruppe des Ubichinons im Ubichinon-Kanal gefangen bleibt (Fuller III et al., **2023**); die aufzuwendende Energie, um das Ubichinon aus dem Q-Kanal zu befreien, liegt bei ca. 50 kT (30 kcal/mol).

Ala52 ist ein Teil des sogenannten „Flaschenhalses“ (eng.: *bottleneck*) – des engsten Bereiches innerhalb des Q₁₀-Kanals (Wang et al., **2021**). Anhand verschiedener Cryo-EM-Strukturen und Modellierungen wurde festgestellt, dass selbst im normalen, nicht-mutierten Zustand, der Flaschenhals zu eng nicht nur für die Kopfgruppe des Ubichinons, sondern selbst für den Isoprenoidschwanz ist. Damit das Ubichinon überhaupt an den N2-Fe-S-Cluster gelangen und reduziert werden kann, wird eine Konformationsänderung, nämlich eine Öffnung dieses Flaschenhalses, benötigt.

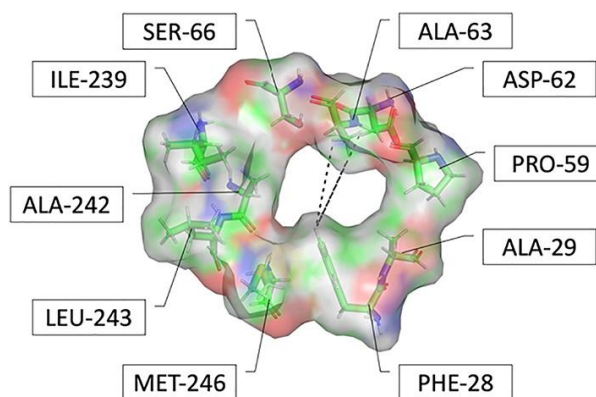


Abbildung 39: Der „Flaschenhals“ des Q-Kanals im Komplex I. Die hier abgebildete Grundstruktur und somit die Nummerierung der Reste entspricht der Situation im Bakterium *T. Thermophilus*. Die Reste Ala-63 und Asp-62 aus *T. Thermophilus* entsprechen Ala-52 und Asp-51 in *H. sapiens* und *R. norwegicus*. Die Abbildung wurde übernommen aus Wang et al., **2021**.

Abbildung 39 zeigt, dass der Flaschenhals aus zehn Aminosäuren dreier Helices der ND1-Untereinheit besteht. Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist die Tatsache, dass auch die Helix, in der sich das untersuchte Aspartat-51 befindet, an diesem Engpass beteiligt ist. Die Tatsache, dass für den Eintritt des Ubichinons in den Q10-Kanal eine Konformationsänderung notwendig ist, könnte eine bevorzugte Bildung von Isoaspartat erklären: jede Öffnung des Flaschenhalses und damit jede Katalyse erfordert eine Verschiebung der Helices, wodurch auch Aspartat51 (hier 62) bewegt wird und damit den Weg für das Q10 freigibt (Wang et al., **2021**). Diese Flexibilität könnte eine molekular-dynamische Erklärung der Bildung des Isoaspartates an dieser Stelle darstellen. Während in den mit Kontrollfutter gefütterten Tieren genügend SAM vorhanden ist, um den Schaden ständig zu reparieren, wäre dies in den MetR-Tieren mutmaßlich nicht der Fall. Da sich dieser Rest an einer entscheidenden Stelle im Komplex I befindet, könnte die Isoaspartat-Modifikation darüber entscheiden, ob der Komplex funktioniert oder nicht. Der Asp-51-Rest ist höchstkonserviert (s. Teil 5.3), was besonders die Wichtigkeit dieser Aminosäure im Komplex I untermauert. Die Bedeutung der Reste der AH_1-Helix (die Helix mit Asp51 und Ala52, Bezeichnung nach Wang et al., **2021**) wird dadurch unterstrichen, dass der Austausch von Asp51 durch Asn oder Cys zu weitestgehend vollständiger Inhibition des ganzen Komplex I in *P. denitrificans* führen (92,5% im Falle von Asn und 100% bei Cys) (Zickermann et al., **1998**).

6.4 Könnte Komplex I-Isoaspartatbildung humanpathogen sein?

Komplex I zeigt innerhalb der Säugerspezies eine Korrelation mit der Lebensspanne. Es wurde gezeigt, dass eine hohe metabolische Leistung, die mit einer hohen Komplex I-Aktivität einhergeht, und eine geringe Stabilität von mitochondrial-kodierten Proteinen (wobei die meisten mitochondrial-kodierten Proteine Untereinheiten von Komplex I sind) negativ mit der maximalen Lebensspanne korrelieren (Kitazoe et al., **2017**). So beträgt die maximale Lebensspanne bei Nagetieren mit hoher Komplex I-Aktivität und weniger stabilen Atmungskettenkomplexen wie z.B. Mäusen nur vier Jahre, während Wale mit geringer mitochondrialer Leistung pro kg Körpermasse und stabileren Atmungskettenkomplexen bis zu 220 Jahren leben (Kitazoe et al., **2017**, Hulbert et al., **2008**, Schindeldecker et al., **2011**). Ebenfalls ist eine Korrelation der Komplex I-Inhibierung mit einer verlängerten Lebensspanne in Nematoden wie *C. elegans* gezeigt. Die Behandlungen mit bestimmten Komplex I-Inhibitoren wie DPI (Diphenyliodonium) (Bonuccelli et al., **2023**), Paraquat (Bora et al., **2020**), Phloretin (Zhang et al., **2024**) oder bestimmte Mutationen in Komplex I-Untereinheiten (Rauthan et al., **2015**) führten in Nematoden zur Verlängerung der Lebensspanne. Einige der oben erwähnten Studien (Rauthan et al., **2015** und Bonuccelli et al., **2023**) zeigten, dass die Inhibition des Komplex I parallel mit einer mtUPR einhergeht, was ebenfalls bei der MetR der Fall ist. Das RNAi-

Silencing bestimmter Gene von Komplex I zeigte auch einen positiven Effekt auf die Lebensspanne in *D.Melanogaster* (Landis et al., **2023**).

Im Menschen führt eine Komplex I-Mangel zu einem heterogenen Krankheitsbild. Dabei stechen insbesondere das bereits erwähnte Leigh-Syndrom und MELAS hervor. Viele der Komplex I-Mangel-Patienten leiden an einer Lactatacidose (Bet et al., **1990**, van Straaten et al., **2005**), welche durch Akkumulation von NADH und anschließende Reduktion des Pyruvats zu Lactat zu erklären wäre. Komplex I-Defekte können zu Muskelschwächen und Myalgien führen (Sanchez-Caballero et al., **2016**, Bernsen et al., **1991**).

Ebenfalls wird Komplex I mit neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer in Verbindung gebracht. Komplex I, aber nicht III und IV, war herunterreguliert in Patienten mit anfänglichem und fortgeschrittenem Alzheimer (Manczak et al., **2004**). Verringerte immunohistochemische Färbung des Komplex I war in den Gehirnen der Patienten mit Alzheimer zu vermerken (Cottrell et al., **2001**). Ebenfalls chronisch-milde Komplex I-Inhibition von bis zu 50% wurden in den Gehirnen anderer Patienten gefunden (Swerdlow et al., **2009**). Was diese Befunde von den zuvor erwähnten Komplex I-Schäden mit Laktatacidose und Muskelschwäche unterscheidet, ist die Tatsache, dass diese Komplex I-Schäden bei Alzheimer nicht auf genetische Mutationen zurückzuführen sind, wie es bei MELAS und weiteren Erkrankungen der Fall ist. Dies eröffnet ein Fenster für Spekulationen, ob nicht ein SAM-Mangel im Gehirn älterer Menschen zu Isoaspartatbildung am D51 der mt-ND1 Untereinheit des Komplex I führen könnte. Tatsächlich ist das Niveau an SAM in den Gehirnen von Alzheimer-Patienten im Vergleich zu gesunden Menschen deutlich geringer; ein Abfall von 67% bis 85% war in Hippocampus und Putamen zu beobachten (Morrison et al., **1996**). Ebenfalls ist bekannt, dass der Spiegel an SAM mit dem chronologischen Alter auch bei gesunden Menschen signifikant abnimmt (Hooijmans et al., **2009**). Es existieren die ersten Hinweise auf eine allgemein erhöhte Isoaspartatpräsenz in Patienten mit Alzheimer. So konnte festgestellt werden, dass das humane Serumalbumin, das Transportprotein für Amyloid- β , in Alzheimerpatienten signifikant mehr isoAsp-Reste aufweist und stärker als in Kontrollpatienten aggregiert (Wang et al., **2023**). Es wäre höchstinteressant, das D51 des mt-ND1 Proteins im Komplex I sich unter die Lupe zu nehmen und bei Alzheimer und weiterer Erkrankungen zu untersuchen.

7. Zusammenfassung

Das Verständnis der dem Altern zugrundeliegenden Prozesse ist eine der wichtigsten Herausforderungen der modernen Biochemie. Trotz einer Vielzahl von Untersuchungen ist es bisher nicht gelungen, die für das chronologische Altern verantwortlichen Mechanismen zufriedenstellend zu verstehen. Eine weitgehende Restriktion der essentiellen Aminosäure Methionin kann bei vielen Lebewesen, von Hefen und Würmern bis hin zu höheren Wirbeltieren wie Mäusen und Ratten, den Alterungsprozess verlangsamen, die Lebensspanne signifikant verlängern und für das Ausbleiben chronischer Krankheiten wie Diabetes sorgen. Obwohl diese Effekte positiv und seit langem bekannt sind, sind die molekularen Mechanismen, die zu diesem Phänotyp führen, noch im Wesentlichen unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Inhibition des Komplex I (NADH Dehydrogenase) der Atmungskette als einen plausiblen molekularen Ausgangspunkt für die phänotypischen Veränderungen bei der Methionin-Restriktion (MetR) zu identifizieren. Durch eine vergleichende Analyse bereits publizierter Sequenzierungsdaten konnten konkrete Hinweise auf eine mögliche Inhibition der hepatischen Atmungskette gewonnen werden. Im zweiten Teil der Arbeit konnte eine Verbindung zwischen den bislang unverstandenen metabolischen und physiologischen Phänotypen der MetR, darunter Gewichtsverlust trotz Hyperphagie und ein sehr variabler respiratorischer Koeffizient mit der Inhibition des Komplex I hergestellt werden. Dazu wurde ein neues Modell des Glukose-Abbaus aufgestellt, welches die Annahme beinhaltet, dass bei einer Komplex-I-Inhibition Elektronen durch FADH₂ und nicht mehr primär durch NADH in die hepatische Atmungskette gelangen. Im Rahmen des letzten Teils der vorliegenden Arbeit wurde der spezifischen molekularen Ursache der zuvor erwähnten Komplex I-Inhibition nachgegangen. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Isomerisierung des Asp-51 der mt-ND1-Untereinheit spezifisch bei MetR auftritt. Die Verknüpfung zwischen der MetR, Komplex I und Isoaspartatbildung besteht darin, dass durch einen Methioninmangel ebenfalls das Niveau an S-Adenosylmethionin abnimmt, welches als Kofaktor bei Methylierungen enzymatisch umgesetzt wird. Die Reparatur von spontan auftretenden Aspartatisomerisierungen erfolgt durch das Enzym PIMT, welches eine Methyltransferase ist und SAM als Kofaktor benötigt.

Die Isoaspartatbildung stellt ein allgemeines Phänomen der Alterung dar. Die im Rahmen dieser Arbeit gefundene Isomerisierung des Asp-51 der mt-ND1-Untereinheit kann möglicherweise durch Einsatz moderner massenspektrometrischen Methoden zur Aufklärung von Krankheiten wie z.B. Alzheimer beitragen.

8. Summary

Understanding the processes underlying ageing is one of the most important challenges of modern biochemistry. Despite a large number of studies, it has not yet been possible to gain a satisfactory understanding of the mechanisms responsible for chronological ageing. Extensive restriction of the essential amino acid methionine can slow down the ageing process in many organisms, from yeasts and worms to higher vertebrates such as mice and rats, significantly extend lifespan and ensure the absence of chronic diseases such as diabetes. Although these effects are positive and have been known for a long time, the molecular mechanisms that lead to this phenotype are still largely unknown.

In the course of this work, it was possible to identify the inhibition of Complex I (NADH dehydrogenase) of the hepatic respiratory chain as a plausible molecular starting point for the phenotypic changes in methionine restriction (MetR). A comparative analysis of previously published sequencing data provided concrete evidence for a possible inhibition of the hepatic respiratory chain. In the second part of the work, a link was established between the previously poorly understood metabolic and physiological phenotypes of MetR, including weight loss despite hyperphagia and a highly variable respiratory coefficient with the inhibition of Complex I. For this purpose, a new model of glucose degradation was established, which includes the assumption that electrons enter the xy through FADH₂ and no longer primarily through NADH. In the last part of this thesis, the specific molecular cause of the aforementioned complex I inhibition was investigated. It was demonstrated that an isomerization of Asp-51 of mt-ND1 subunit of Complex I occurs specifically in MetR. The link between methionine restriction, Complex I and the formation of isoaspartate is S-Adenosylmethionine (SAM), a cofactor of methylation reactions. During MetR levels of Met (and SAM as a follow-up) falls which prevents the repair of newly formed isoaspartates, because the repair enzyme for isoaspartate, the PIMT, is SAM-dependent.

Isoaspartate formation is a general phenomenon of ageing. The isomerization of Asp-51 of mt-ND1 which was found in this thesis can possibly contribute to the elucidation of diseases such as Alzheimer's by using modern mass spectrometric methods.

9. Literatur

- Abdelraheem, E., Thair, B., Varela, R. F., Jockmann, E., Popadić, D., Hailes, H. C., Ward, J. M., Iribarren, A. M., Lewkowicz, E. S., Andexer, J. N., Hagedoorn, P., & Hanefeld, U. (2022). Methyltransferases: Functions and Applications. In *ChemBioChem* (Vol. 23, Issue 18).
- Abu-Elheiga L, Brinkley WR, Zhong L, Chirala SS, Woldegiorgis G, Wakil SJ. The subcellular localization of acetyl-CoA carboxylase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Feb 15;97(4):1444-9.
- Albers, E. (2009). Metabolic characteristics and importance of the universal methionine salvage pathway recycling methionine from 5'-methylthioadenosine. In *IUBMB Life* (Vol. 61, Issue 12, pp. 1132–1142).
- Anda, S., Zach, R., & Grallert, B. (2017). Activation of Gcn2 in response to different stresses. In J. Mata (Ed.), *PLOS ONE* (Vol. 12, Issue 8, p. e0182143). Public Library of Science (PLoS).
- Arruda, A. C., Perilhão, M. S., Santos, W. A., Gregnani, M. F., Budu, A., Neto, J. C. R., Estrela, G. R., & Araujo, R. C. (2020). PPAR α -Dependent Modulation by Metformin of the Expression of OCT-2 and MATE-1 in the Kidney of Mice. In *Molecules* (Vol. 25, Issue 2, p. 392).
- Baldarelli RM, Smith CL, Ringwald M, Richardson JE, Bult CJ, Mouse Genome Informatics Group. 2024. Mouse Genome Informatics: an integrated knowledgebase system for the laboratory mouse. In *Genetics*. 2024 May 7;227(1):iyae031
- Bao XR, Ong S-E, Goldberger O, Peng J, Sharma R, Thompson DA, Vafai SB, Cox AG, Marutani E, Ichinose F, Goessling W, Regev A, Carr SA, Clish CB & Mootha VK (2016) Mitochondrial dysfunction remodels one-carbon metabolism in human cells. *eLife* 5.
- Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS & Sazanov LA (2013) Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 494, 443–448.
- Bárcena C, Mayoral P & Quirós PM (2018) Mitohormesis, an Antiaging Paradigm. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 35–77.
- Bennett EJ, Bjerregaard J, Knapp JE, Chavous DA, Friedman AM, Royer, WE & O'Connor CM (2003) Catalytic Implications from the Drosophila Protein L-Isoaspartyl Methyltransferase Structure and Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* 42, 12844–12853.
- Bernsen PLJA, Gabreels FJM, Ruitenbeek W, Sengers RCA, Stadhouders AM & Renier WO (1991) Successful Treatment of Pure Myopathy, Associated With Complex I Deficiency, With Riboflavin and Carnitine. *Archives of Neurology* 48, 334–338.
- Bet L, Bresolin N, Moggio M, Meola G, Prella A, Schapira AH, Binzoni T, Chomyn A, Fortunato F, Cerretelli P & Scarlato G (1990) A case of mitochondrial myopathy, lactic acidosis and complex I deficiency. *J Neurol* 237, 399–404.
- Bhatia, M. (2005). Hydrogen sulfide as a vasodilator. In *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)* (Vol. 57, Issue 9, pp. 603–606).
- Bian, Y., Li, W., Kremer, D. M., Sajjakulnukit, P., Li, S., Crespo, J., Nwosu, Z. C., Zhang, L., Czerwonka, A., Pawłowska, A., Xia, H., Li, J., Liao, P., Yu, J., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Grove, S., Liu, J. R., ... Zou, W. (2020). Cancer SLC43A2 alters T cell methionine metabolism and histone methylation. In *Nature* (Vol. 585, Issue 7824, pp. 277–282).
- Bonuccelli G, Brooks DR, Shepherd S, Sotgia F & Lisanti MP (2023) Antibiotics that target mitochondria extend lifespan in *C. elegans*. *Aging* 15, 11764–11781.
- Bora S, Vardhan GSH, Deka N, Khataniar L, Gogoi D & Baruah A (2021) Paraquat exposure over generation affects lifespan and reproduction through mitochondrial disruption in *C. elegans*. *Toxicology* 447, 152632.
- Breit, S. N., Brown, D. A., & Tsai, V. W.-W. (2021). The GDF15-GFRAL Pathway in Health and Metabolic Disease: Friend or Foe? In *Annual Review of Physiology* (Vol. 83, Issue 1, pp. 127–151).

- Bridges HR, Blaza JN, Yin Z, Chung I, Pollak MN & Hirst J (2023) Structural basis of mammalian respiratory complex I inhibition by medicinal biguanides. *Science* 379, 351–357.
- Brunmair B, Lest A, Staniek K, Gras F, Scharf N, Roden M, Nohl H, Waldhäusl W & Fürnsinn C (2004) Fenofibrate Impairs Rat Mitochondrial Function by Inhibition of Respiratory Complex I. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311, 109–114.
- Buczek, O., Yoshikami, D., Bulaj, G., Jimenez, E. C., & Olivera, B. M. (2005). Post-translational Amino Acid Isomerization. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 280, Issue 6, pp. 4247–4253).
- Cantoni, G. L. (1953). S-Adenosylmethionine; A new intermediate formed enzymatically from l-methionine and adenosinetriphosphate. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 204, Issue 1, pp. 403–416).
- Chang, J. S. (2023). Recent insights into the molecular mechanisms of simultaneous fatty acid oxidation and synthesis in brown adipocytes. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 14).
- Chen, X., Jhee, K.-H., & Kruger, W. D. (2004). Production of the Neuromodulator H₂S by Cystathionine β-Synthase via the Condensation of Cysteine and Homocysteine. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 279, Issue 50, pp. 52082–52086).
- Chen, Y., Yang, Y., Miller, M. L., Shen, D., Shertzer, H. G., Stringer, K. F., Wang, B., Schneider, S. N., Nebert, D. W., & Dalton, T. P. (2007). Hepatocyte-specific Gclc deletion leads to rapid onset of steatosis with mitochondrial injury and liver failure. In *Hepatology* (Vol. 45, Issue 5, pp. 1118–1128).
- Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J. W., & Roberts, R. J. (1993). Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-l-methionine. In *Cell* (Vol. 74, Issue 2, pp. 299–307).
- Cilleros-Holgado P, Gómez-Fernández D, Piñero-Pérez R, Reche-López D, Álvarez-Córdoba M, Munuera-Cabeza M, Talaverón-Rey M, Povea-Cabello S, Suárez-Carrillo A, Romero-González A, Suárez-Rivero JM, Romero-Domínguez JM & Sánchez-Alcázar JA (2023) mtUPR Modulation as a Therapeutic Target for Primary and Secondary Mitochondrial Diseases. *IJMS* 24, 1482.
- Clarke, S. (1987). Propensity for spontaneous succinimide formation from aspartyl and asparaginy residues in cellular proteins. In *International Journal of Peptide and Protein Research* (Vol. 30, Issue 6, pp. 808–821).
- Clarke S. and Banfield K. *Homocysteine in Health and Disease*. Cambridge University Press, 2001.
- Cobb S & Shepherd K (2018) The Role of Monoamines on MPP+ and H₂O₂ Induced Oxidative Stress Response. *The FASEB Journal* 32.
- Cohen J (2013) *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*, Routledge.
- Cottrell DA, Blakely EL, Johnson MA, Ince PG & Turnbull DM (2001) Mitochondrial enzyme-deficient hippocampal neurons and choroidal cells in AD. *Neurology* 57, 260–264.
- Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2004). PERK-dependent Activation of Nrf2 Contributes to Redox Homeostasis and Cell Survival following Endoplasmic Reticulum Stress. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 279, Issue 19, pp. 20108–20117).
- Cunningham, A., Erdem, A., Alshamleh, I., Geugien, M., Pruis, M., Pereira-Martins, D. A., van den Heuvel, F. A. J., Wierenga, A. T. J., ten Berge, H., Dennebos, R., van den Boom, V., Hogeling, S. M., Weinhäuser, I., Knops, R., de Blaauw, P., Heiner-Fokkema, M. R., Woolthuis, C., Günther, U. L., Rego, E. M., ... Schuringa, J. J. (2022). Dietary methionine starvation impairs acute myeloid leukemia progression. In *Blood* (Vol. 140, Issue 19, pp. 2037–2052). American Society of Hematology.
- Dang, T. T., Kim, M.-J., Lee, Y. Y., Le, H. T., Kim, K. H., Nam, S., Hyun, S. H., Kim, H. L., Chung, S. W., Chung, H. T., Jho, E.-H., Yoshida, H., Kim, K., Park, C. Y., Lee, M.-S., & Back, S. H. (2023). Phosphorylation of EIF2S1 (eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha) is indispensable for nuclear translocation of TFE3 and TFE3 during ER stress. In *Autophagy* (Vol. 19, Issue 7, pp. 2111–2142).
- de Jong, J. C. W., van Rooijen, K. S., Stigter, E. C. A., Gülersönmez, M. C., de Zoete, M. R., Top, J., Baars, M. J. D., Vercoulen, Y., Kuipers, F., van Mil, S. W. C., & Ijssennagger, N. (2024). Dietary cystine restriction increases the proliferative capacity of the small intestine of mice. In B. Mishra (Ed.), *PLOS ONE* (Vol. 19, Issue 1, p. e0290493).

De Sousa-Coelho, A. L., Marrero, P. F., & Haro, D. (2012). Activating transcription factor 4-dependent induction of FGF21 during amino acid deprivation. In *Biochemical Journal* (Vol. 443, Issue 1, pp. 165–171).

Degli Esposti M, Ghelli A, Ratta M, Cortes D & Estornell E (1994) Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochemical Journal* 301, 161–167.

Degli Esposti M, Ghelli A, Ratta M, Cortes D & Estornell E (1994) Natural substances (acetogenins) from the family Annonaceae are powerful inhibitors of mitochondrial NADH dehydrogenase (Complex I). *Biochemical Journal* 301, 161–167.

Degli Esposti, M. (1998). Inhibitors of NADH–ubiquinone reductase: an overview. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (Vol. 1364, Issue 2, pp. 222–235).

Della Ragione, F., Takabayashi, K., Mastropietro, S., Mercurio, C., Oliva, A., Russo, G. L., Della Pietra, V., Borriello, A., Nobori, T., Carson, D. A., & Zappia, V. (1996). Purification and Characterization of Recombinant Human 5'-Methylthioadenosine Phosphorylase: Definite Identification of Coding cDNA. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 223, Issue 3, pp. 514–519).

Duong-Ly KC & Peterson JR (2013) The Human Kinome and Kinase Inhibition. *CP Pharmacology* 60.

Even, P. C., Rolland, V., Roseau, S., Bouthegourd, J.-C., & Tomé, D. (2001). Prediction of basal metabolism from organ size in the rat: relationship to strain, feeding, age, and obesity. In *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (Vol. 280, Issue 6, pp. R1887–R1896).

Evstafieva AG, Garaeva AA, Khutornenko AA, Klepikova AV, Logacheva MD, Penin AA, Novakovskiy GE, Kovaleva IE & Chumakov PM (2014) A sustained deficiency of mitochondrial respiratory complex III induces an apoptotic cell death through the p53-mediated inhibition of pro-survival activities of the activating transcription factor 4. *Cell Death Dis* 5, e1511–e1511.

Fang, H., Stone, K. P., Ghosh, S., Forney, L. A., Sims, L. C., Vincik, L., & Gettys, T. W. (2021). Hepatic Nfe2l2 Is Not an Essential Mediator of the Metabolic Phenotype Produced by Dietary Methionine Restriction. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 6, p. 1788).

Fang, H., Stone, K. P., Wanders, D., Forney, L. A., & Gettys, T. W. (2022). The Origins, Evolution, and Future of Dietary Methionine Restriction. In *Annual Review of Nutrition* (Vol. 42, Issue 1, pp. 201–226).

Fang, L., Hao, Y., Yu, H., Gu, X., Peng, Q., Zhuo, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, J., Chen, Y., Zhang, J., Tian, H., Gao, Y., Gao, R., Teng, H., Shan, Z., Zhu, J., Li, Z., Liu, Y., ... Wang, P. (2023). Methionine restriction promotes cGAS activation and chromatin untethering through demethylation to enhance antitumor immunity. In *Cancer Cell* (Vol. 41, Issue 6, pp. 1118-1133.e12).

Farrar C & Clarke S (2002) Altered Levels of S-Adenosylmethionine and S-Adenosylhomocysteine in the Brains of I-isoaspartyl (d-Aspartyl)O-Methyltransferase-deficient Mice. *Journal of Biological Chemistry* 277, 27856–27863.

Fassone E & Rahman S (2012) Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet* 49, 578–590.

Ferrari, K. J., Scelfo, A., Jammula, S., Cuomo, A., Barozzi, I., Stützer, A., Fischle, W., Bonaldi, T., & Pasini, D. (2014). Polycomb-Dependent H3K27me1 and H3K27me2 Regulate Active Transcription and Enhancer Fidelity. In *Molecular Cell* (Vol. 53, Issue 1, pp. 49–62).

Finkelstein, J. D., & Martin, J. J. (1986). Methionine metabolism in mammals. Adaptation to methionine excess. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 261, Issue 4, pp. 1582–1587).

Finkelstein, J. D., Kyle, W. E., Martin, J. J., & Pick, A.-M. (1975). Activation of cystathionine synthase by adenosylmethionine and adenosylethionine. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 66, Issue 1, pp. 81–87).

Fiorese CJ, Schulz AM, Lin Y-F, Rosin N, Pellegrino MW & Haynes CM (2016) The Transcription Factor ATF5 Mediates a Mammalian Mitochondrial UPR. *Current Biology* 26, 2037–2043.

- Fisher, F. M., & Maratos-Flier, E. (2016). Understanding the Physiology of FGF21. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 78, Issue 1, pp. 223–241).
- Fisher, F., Ffolliott M., Kleiner, S., Douris, N., Fox, E. C., Mepani, R. J., Verdeguer, F., Wu, J., Kharitonov, A., Flier, J. S., Maratos-Flier, E., & Spiegelman, B. M. (2012). FGF21 regulates PGC-1 α and browning of white adipose tissues in adaptive thermogenesis. In *Genes & Development* (Vol. 26, Issue 3, pp. 271–281).
- Fontaine E (2018) Metformin-Induced Mitochondrial Complex I Inhibition: Facts, Uncertainties, and Consequences. *Front. Endocrinol.* 9.
- Formosa LE, Dibley MG, Stroud DA & Ryan MT (2018) Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 76, 154–162.
- Forney, L. A., Fang, H., Sims, L. C., Stone, K. P., Vincik, L. Y., Vick, A. M., Gibson, A. N., Burk, D. H., & Gettys, T. W. (2020). Dietary Methionine Restriction Signals to the Brain Through Fibroblast Growth Factor 21 to Regulate Energy Balance and Remodeling of Adipose Tissue. In *Obesity* (Vol. 28, Issue 10, pp. 1912–1921).
- Forney, L. A., Wanders, D., Stone, K. P., Piers, A., & Gettys, T. W. (2017). Concentration-dependent linkage of dietary methionine restriction to the components of its metabolic phenotype. In *Obesity* (Vol. 25, Issue 4, pp. 730–738).
- Fuller JT III, Barnes S, Sadun LA, Ajmera P, Alexandrova AN & Sadun AA (2023) Coenzyme Q10 trapping in mitochondrial complex I underlies Leber's hereditary optic neuropathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 120.
- Galemou Yoga E, Haapanen O, Wittig I, Siegmund K, Sharma V & Zickermann V (2019) Mutations in a conserved loop in the PSST subunit of respiratory complex I affect ubiquinone binding and dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1860, 573–581.
- Garcia-Ruiz I, Solís-Muñoz P, Fernández-Moreira D, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. Pioglitazone leads to an inactivation and disassembly of complex I of the mitochondrial respiratory chain. *BMC Biol.* 2013 Aug 1;11:88.
- Gaucher, D., Arnault, E., Husson, Z., Froger, N., Dubus, E., Gondouin, P., Dherbécourt, D., Degardin, J., Simonutti, M., Fouquet, S., Benahmed, M. A., Elbayed, K., Namer, I.-J., Massin, P., Sahel, J.-A., & Picaud, S. (2012). Taurine deficiency damages retinal neurones: cone photoreceptors and retinal ganglion cells. In *Amino Acids* (Vol. 43, Issue 5, pp. 1979–1993).
- Geiger, T., & Clarke, S. (1987). Deamidation, isomerization, and racemization at asparaginyl and aspartyl residues in peptides. Succinimide-linked reactions that contribute to protein degradation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 262, Issue 2, pp. 785–794).
- Gil, B., Casado, M., Pajares, M. A., Bosca, L., Mato, J. M., Martín-Sanz, P., & Alvarez, L. (1996). Differential expression pattern of S-adenosylmethionine synthetase isoenzymes during rat liver development. In *Hepatology* (Vol. 24, Issue 4, pp. 876–881).
- Granold, M., Hajieva, P., Toşa, M. I., Irimie, F.-D., & Moosmann, B. (2017). Modern diversification of the amino acid repertoire driven by oxygen. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 115, Issue 1, pp. 41–46).
- Green, R., & Miller, J. W. (2022). Vitamin B12 deficiency. In *Vitamins and Hormones* (pp. 405–439).
- Gu, J., Liu, T., Guo, R., Zhang, L., & Yang, M. (2022). The coupling mechanism of mammalian mitochondrial complex I. In *Nature Structural & Molecular Biology* (Vol. 29, Issue 2, pp. 172–182).
- Guerrero-Castillo S, Baertling F, Kownatzki D, Wessels HJ, Arnold S, Brandt U & Nijtmans L (2017) The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metabolism* 25, 128–139.
- Guha P, Kaptan E, Gade P, Kalvakolanu DV & Ahmed H (2017) Tunicamycin induced endoplasmic reticulum stress promotes apoptosis of prostate cancer cells by activating mTORC1.
- Guo H, Lishko VK, Herrera H, Groce A, Kubota T, Hoffman RM. Therapeutic tumor-specific cell cycle block induced by methionine starvation in vivo. *Cancer Res.* 1993 Dec 1;53(23):5676-9.

Hadsiev K, Maasz A, Kisfali P, Kalman E, Gomori E, Pal E, Berenyi E, Komlosi K & Melegh B (2010) Mitochondrial DNA 11777C>A Mutation Associated Leigh Syndrome: Case Report with a Review of the Previously Described Pedigrees. *Neuromol Med* 12, 277–284.

Hallahan TW, Shapiro R, Strydom DJ & Vallee BL (1992) Importance of asparagine-61 and asparagine-109 to the angiogenic activity of human angiogenin. *Biochemistry* 31, 8022–8029.

Han, Q., & Hoffman, R. M. (2021). Lowering and Stabilizing PSA Levels in Advanced-prostate Cancer Patients With Oral Methioninase. In *Anticancer Research* (Vol. 41, Issue 4, pp. 1921–1926).

Hao, S., Sharp, J. W., Ross-Inta, C. M., McDaniel, B. J., Anthony, T. G., Wek, R. C., Cavener, D. R., McGrath, B. C., Rudell, J. B., Koehnle, T. J., & Gietzen, D. W. (2005). Uncharged tRNA and Sensing of Amino Acid Deficiency in Mammalian Piriform Cortex. In *Science* (Vol. 307, Issue 5716, pp. 1776–1778).

Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. In *Molecular Cell* (Vol. 6, Issue 5, pp. 1099–1108).

Harvey, J. (2006). Leptin: a diverse regulator of neuronal function. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 100, Issue 2, pp. 307–313).

Hasek BE, Stewart LK, Henagan TM, Boudreau A, Lenard NR, Black C, Shin J, Huypens P, Malloy VL, Plaisance EP, Krajcik RA, Orentreich N & Gettys TW (2010) Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299, R728–R739.

Hasek, B. E., Stewart, L. K., Henagan, T. M., Boudreau, A., Lenard, N. R., Black, C., Shin, J., Huypens, P., Malloy, V. L., Plaisance, E. P., Krajcik, R. A., Orentreich, N., & Gettys, T. W. (2010). Dietary methionine restriction enhances metabolic flexibility and increases uncoupled respiration in both fed and fasted states. In *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* (Vol. 299, Issue 3, pp. R728–R739).

Hathazi D, Griffin H, Jennings MJ, Giunta M, Powell C, Pearce SF, Munro B, Wei W, Boczonadi V, Poulton J, Pyle A, Calabrese C, Gomez-Duran A, Schara U, Pitceathly RDS, Hanna MG, Joost K, Cotta A, Paim JF, Navarro MM, Duff J, Mattman A, Chapman K, Servidei S, Della Marina A, Uusimaa J, Roos A, Mootha V, Hirano M, Tulinius M, Giri M, Hoffmann EP, Lochmüller H, DiMauro S, Minczuk M, Chinnery PF, Müller JS & Horvath R (2020) Metabolic shift underlies recovery in reversible infantile respiratory chain deficiency. *The EMBO Journal* 39.

He, F., Ru, X., & Wen, T. (2020). NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 13, p. 4777).

Hens, J. R., Sinha, I., Perodin, F., Cooper, T., Sinha, R., Plummer, J., Perrone, C. E., & Orentreich, D. (2016). Methionine-restricted diet inhibits growth of MCF10AT1-derived mammary tumors by increasing cell cycle inhibitors in athymic nude mice. In *BMC Cancer* (Vol. 16, Issue 1).

Henzel WJ, Stults JT, Hsu CA & Aswad DW (1989) The Primary Structure of a Protein Carboxyl Methyltransferase from Bovine Brain That Selectively Methylates L-Isoaspartyl Sites. *Journal of Biological Chemistry* 264, 15905–15911.

Hernando-Rodríguez B & Artal-Sanz M (2018) Mitochondrial Quality Control Mechanisms and the PHB (Prohibitin) Complex. *Cells* 7, 238.

Heyman, B., Tulke, H., Putri, S. P., Fukusaki, E., & Büchs, J. (2019). Online monitoring of the respiratory quotient reveals metabolic phases during microaerobic 2,3-butanediol production with *Bacillus licheniformis*. In *Engineering in Life Sciences* (Vol. 20, Issues 3–4, pp. 133–144).

Hirano, W., Gotoh, I., Uekita, T., & Seiki, M. (2005). Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cytoplasmic tail binding protein-1 (MTCBP-1) acts as an eukaryotic acyl-reductone dioxygenase (ARD) in the methionine salvage pathway. In *Genes to Cells* (Vol. 10, Issue 6, pp. 565–574).

Hoffman, J. L. (1986). Chromatographic analysis of the chiral and covalent instability of S-adenosyl-L-methionine. In *Biochemistry* (Vol. 25, Issue 15, pp. 4444–4449).

- Hoffman, R. M., Jacobsen, S. J., & Erbe, R. W. (1978). Reversion to methionine independence by malignant rat and SV40-transformed human fibroblasts. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 82, Issue 1, pp. 228–234).
- Hooijmans CR, Blom HJ, Oppenraaij-Emmerzaal D, Ritskes-Hoitinga M & Kiliaan AJ (2009) S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine levels in the aging brain of APP/PS1 Alzheimer mice. *Neurol Sci* 30, 439–445.
- Hotta, Y., Nakamura, H., Konishi, M., Murata, Y., Takagi, H., Matsumura, S., Inoue, K., Fushiki, T., & Itoh, N. (2009). Fibroblast Growth Factor 21 Regulates Lipolysis in White Adipose Tissue But Is Not Required for Ketogenesis and Triglyceride Clearance in Liver. In *Endocrinology* (Vol. 150, Issue 10, pp. 4625–4633).
- Howell N, McCullough D. An example of Leber hereditary optic neuropathy not involving a mutation in the mitochondrial ND4 gene. *Am J Hum Genet.* 1990 Oct;47(4):629-34. PMID: 2121024; PMCID: PMC1683808.
- Hsiao, P.-J., Chiou, H.-Y. C., Jiang, H.-J., Lee, M.-Y., Hsieh, T.-J., & Kuo, K.-K. (2017). Pioglitazone Enhances Cytosolic Lipolysis, β -oxidation and Autophagy to Ameliorate Hepatic Steatosis. In *Scientific Reports* (Vol. 7, Issue 1).
- Hue, L., & Taegtmeyer, H. (2009). The Randle cycle revisited: a new head for an old hat. In *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* (Vol. 297, Issue 3, pp. E578–E591). American Physiological Society.
- Hulbert AJ (2008) The links between membrane composition, metabolic rate and lifespan. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 150, 196–203.
- Igarashi, K., Kawaguchi, K., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Murakami, T., Kiyuna, T., Miyake, K., Miyake, M., Singh, A. S., Eckardt, M. A., Nelson, S. D., Russell, T. A., Dry, S. M., Li, Y., Yamamoto, N., Hayashi, K., Kimura, H., Miwa, S., ... Hoffman, R. M. (2018). Recombinant methioninase in combination with doxorubicin (DOX) overcomes first-line DOX resistance in a patient-derived orthotopic xenograft nude-mouse model of undifferentiated spindle-cell sarcoma. In *Cancer Letters* (Vol. 417, pp. 168–173).
- Ignatenko O, Malinen S, Rybas S, Vihinen H, Nikkanen J, Kononov A, Jokitalo ES, Ince-Dunn G & Suomalainen A (2022) Mitochondrial dysfunction compromises ciliary homeostasis in astrocytes. *Journal of Cell Biology* 222.
- Inagaki, T., Dutchak, P., Zhao, G., Ding, X., Gautron, L., Parameswara, V., Li, Y., Goetz, R., Mohammadi, M., Esser, V., Elmquist, J. K., Gerard, R. D., Burgess, S. C., Hammer, R. E., Mangelsdorf, D. J., & Kliewer, S. A. (2007). Endocrine Regulation of the Fasting Response by PPAR α -Mediated Induction of Fibroblast Growth Factor 21. In *Cell Metabolism* (Vol. 5, Issue 6, pp. 415–425).
- Ivanov BS, Bridges HR, Jarman OD & Hirst J (2024) Structure of the turnover-ready state of an ancestral respiratory complex I. *Nat Commun* 15.
- Jacobs, R. L., Zhao, Y., Koonen, D. P. Y., Sletten, T., Su, B., Lingrell, S., Cao, G., Peake, D. A., Kuo, M.-S., Proctor, S. D., Kennedy, B. P., Dyck, J. R. B., & Vance, D. E. (2010). Impaired de Novo Choline Synthesis Explains Why Phosphatidylethanolamine N-Methyltransferase-deficient Mice Are Protected from Diet-induced Obesity. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 285, Issue 29, pp. 22403–22413).
- Jarman OD, Biner O, Wright JJ & Hirst J (2021) *Paracoccus denitrificans*: a genetically tractable model system for studying respiratory complex I. *Sci Rep* 11.
- Jeltsch, A. (2002). Beyond Watson and Crick: DNA Methylation and Molecular Enzymology of DNA Methyltransferases. In *ChemBioChem* (Vol. 3, Issue 4, pp. 274–293).
- Ji, M., Xu, Q., & Li, X. (2024). Dietary methionine restriction in cancer development and antitumor immunity. In *Trends in Endocrinology & Metabolism*.
- Johnson BA, Freitag NE & Aswad DW (1985) Protein carboxyl methyltransferase selectively modifies an atypical form of calmodulin. Evidence for methylation at deamidated asparagine residues. *Journal of Biological Chemistry* 260, 10913–10916.
- Jonsson, W. O., Margolies, N. S., Mirek, E. T., Zhang, Q., Linden, M. A., Hill, C. M., Link, C., Bithi, N., Zalma, B., Levy, J. L., Pettit, A. P., Miller, J. W., Hine, C., Morrison, C. D., Gettys, T. W., Miller, B. F., Hamilton, K. L., Wek, R. C., & Anthony, T. G. (2021). Physiologic Responses to Dietary Sulfur Amino Acid Restriction in Mice Are Influenced by Atf4 Status and Biological Sex. In *The Journal of Nutrition* (Vol. 151, Issue 4, pp. 785–799).

Jonsson, W. O., Mirek, E. T., Wek, R. C., & Anthony, T. G. (2022). Activation and execution of the hepatic integrated stress response by dietary essential amino acid deprivation is amino acid specific. In *The FASEB Journal* (Vol. 36, Issue 7).

Joubert M, Manrique A, Cariou B, Prieur X. Diabetes-related cardiomyopathy: The sweet story of glucose overload from epidemiology to cellular pathways. *Diabetes Metab.* 2019 Jun;45(3):238-247.

Kang SG, Choi MJ, Jung S-B, Chung HK, Chang JY, Kim JT, Kang YE, Lee JH, Hong HJ, Jun SM, Ro H-J, Suh JM, Kim H, Auwerx J, Yi H-S & Shong M (2021) Differential roles of GDF15 and FGF21 in systemic metabolic adaptation to the mitochondrial integrated stress response. *iScience* 24, 102181.

Kato, S., Mihara, H., Kurihara, T., Takahashi, Y., Tokumoto, U., Yoshimura, T., & Esaki, N. (2002). Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulfide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: Implications for the mechanism of iron-sulfur cluster assembly. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 99, Issue 9, pp. 5948–5952).

Katz, J., & Wals, P. A. (1974). Lipogenesis from lactate in rat adipose tissue. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* (Vol. 348, Issue 3, pp. 344–356).

Kawaguchi, K., Higuchi, T., Li, S., Han, Q., Tan, Y., Igarashi, K., Zhao, M., Miyake, K., Kiyuna, T., Miyake, M., Ohshiro, H., Sugisawa, N., Zhang, Z., Razmjooei, S., Wangsiricharoen, S., Chmielowski, B., Nelson, S. D., Russell, T. A., Dry, S. M., Hoffman, R. M. (2018). Combination therapy of tumor-targeting *Salmonella typhimurium* A1-R and oral recombinant methioninase regresses a BRAF-V600E-negative melanoma. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 503, Issue 4, pp. 3086–3092).

Keller, J. P., Smith, P. M., Benach, J., Christendat, D., deTitta, G. T., & Hunt, J. F. (2002). The Crystal Structure of MT0146/CbiT Suggests that the Putative Precorrin-8w Decarboxylase Is a Methyltransferase. In *Structure* (Vol. 10, Issue 11, pp. 1475–1487).

Kharitonov, A., Shiyanova, T. L., Koester, A., Ford, A. M., Micanovic, R., Galbreath, E. J., Sandusky, G. E., Hammond, L. J., Moyers, J. S., Owens, R. A., Gromada, J., Brozinick, J. T., Hawkins, E. D., Wroblewski, V. J., Li, D.-S., Mehrbod, F., Jaskunas, S. R., & Shanafelt, A. B. (2005). FGF-21 as a novel metabolic regulator. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 115, Issue 6, pp. 1627–1635).

Kim J, Yang G, Kim Y, Kim J & Ha J (2016) AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities. *Exp Mol Med* 48, e224–e224.

Kim KH & Lee M-S (2021) GDF15 as a central mediator for integrated stress response and a promising therapeutic molecule for metabolic disorders and NASH. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1865, 129834.

Kitazoe Y, Hasegawa M, Tanaka M, Futami M & Futami J (2017) Mitochondrial determinants of mammalian longevity. *Open Biol.* 7, 170083.

Koopmans F, van Nierop P, Andres-Alonso M, Byrnes A, Cijssouw T, Coba MP, Cornelisse LN, Farrell RJ, Goldschmidt HL, Howrigan DP, Hussain NK, Imig C, de Jong APH, Jung H, Kohansalnodehi M, Kramarz B, Lipstein N, Lovering RC, MacGillavry H, Mariano V, Mi H, Ninov M, Osumi-Sutherland D, Pielot R, Smalla K-H, Tang H, Tashman K, Toonen RFG, Verpelli C, Reig-Viader R, Watanabe K, van Weering J, Achsel T, Ashrafi G, Asi N, Brown TC, De Camilli P, Feuermann M, Foulger RE, Gaudet P, Joglekar A, Kanellopoulos A, Malenka R, Nicoll RA, Pulido C, de Juan-Sanz J, Sheng M, Südhof TC, Tilgner HU, Bagni C, Bayés À, Biederer T, Brose N, Chua JJE, Dieterich DC, Gundelfinger ED, Hoogenraad C, Huganir RL, Jahn R, Kaeser PS, Kim E, Kreutz MR, McPherson PS, Neale BM, O'Connor V, Posthuma D, Ryan TA, Sala C, Feng G, Hyman SE, Thomas PD, Smit AB & Verhage M (2019) SynGO: An Evidence-Based, Expert-Curated Knowledge Base for the Synapse. *Neuron* 103, 217-234.e4.

Kozłowski, L. P. (2016). Proteome-pl: proteome isoelectric point database. In *Nucleic Acids Research* (Vol. 45, Issue D1, pp. D1112–D1116).

Kreis W, Baker A, Ryan V, Bertasso A. Effect of nutritional and enzymatic methionine deprivation upon human normal and malignant cells in tissue culture. *Cancer Res.* 1980 Mar;40(3):634-41. PMID: 6937240.

Kubota, Y., Aoki, Y., Masaki, N., Obara, K., Hamada, K., Han, Q., Bouvet, M., Tsunoda, T., & Hoffman, R. M. (2024). Methionine restriction of glioma does not induce MGMT and greatly improves temozolomide efficacy in

an orthotopic nude-mouse model: A potential curable approach to a clinically-incurable disease. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 695, p. 149418).

Kühl I, Miranda M, Atanassov I, Kuznetsova I, Hinze Y, Mourier A, Filipovska A & Larsson N-G (2017) Transcriptomic and proteomic landscape of mitochondrial dysfunction reveals secondary coenzyme Q deficiency in mammals. *eLife* 6.

Lagarde, D., Jeanson, Y., Portais, J.-C., Galinier, A., Ader, I., Casteilla, L., & Carrière, A. (2021). Lactate Fluxes and Plasticity of Adipose Tissues: A Redox Perspective. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 12).

Landis JE, Sungu K, Sipe H & Copeland JM (2023) RNAi of Complex I and V of the electron transport chain in glutamate neurons extends life span, increases sleep, and decreases locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 18, e0286828.

Lee DJW, Hodzic Kuerec A & Maier AB (2024) Targeting ageing with rapamycin and its derivatives in humans: a systematic review. *The Lancet Healthy Longevity* 5, e152–e162.

Lee, S. B., Park, J. H., Woster, P. M., Casero, R. A., Jr., & Park, M. H. (2010). Suppression of Exogenous Gene Expression by Spermidine/Spermine N1-Acetyltransferase 1 (SSAT1) Cotransfection. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 285, Issue 20, pp. 15548–15556).

Lee, S. H., Li, Y., Kim, H., Eum, S., Park, K., & Lee, C.-H. (2022). The role of EZH1 and EZH2 in development and cancer. In *BMB Reports* (Vol. 55, Issue 12, pp. 595–601).

Leone, T. C., Weinheimer, C. J., & Kelly, D. P. (1999). A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in the cellular fasting response: The PPAR α -null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 96, Issue 13, pp. 7473–7478).

Loeffen, J. L. C. M., Smeitink, J. A. M., Trijbels, J. M. F., Janssen, A. J. M., Triepels, R. H., Sengers, R. C. A., & van den Heuvel, L. P. (2000). Isolated complex I deficiency in children: Clinical, biochemical and genetic aspects. In *Human Mutation* (Vol. 15, Issue 2, pp. 123–134).

Loenen, W. A. M. (2018). S-Adenosylmethionine Metabolism and Aging. In *Epigenetics of Aging and Longevity* (pp. 59–93).

Lu, S. C., Alvarez, L., Huang, Z.-Z., Chen, L., An, W., Corrales, F. J., Avila, M. A., Kanel, G., & Mato, J. M. (2001). Methionine adenosyltransferase 1A knockout mice are predisposed to liver injury and exhibit increased expression of genes involved in proliferation. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 98, Issue 10, pp. 5560–5565).

Luft, D., Schmülling, R. M., & Eggstein, M. (1978). Lactic acidosis in biguanide-treated diabetics. In *Diabetologia* (Vol. 14, Issue 2, pp. 75–87).

Luka, Z., Capdevila, A., Mato, J. M., & Wagner, C. (2006). A Glycine N-methyltransferase Knockout Mouse Model for Humans with Deficiency of this Enzyme. In *Transgenic Research* (Vol. 15, Issue 3, pp. 393–397).

Luka, Z., Mudd, S. H., & Wagner, C. (2009). Glycine N-Methyltransferase and Regulation of S-Adenosylmethionine Levels. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 284, Issue 34, pp. 22507–22511).

Lundåsen, T., Hunt, M. C., Nilsson, L.-M., Sanyal, S., Angelin, B., Alexson, S. E. H., & Rudling, M. (2007). PPAR α is a key regulator of hepatic FGF21. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 360, Issue 2, pp. 437–440).

Lyon YA, Sabbah GM & Julian RR (2018) Differences in α -Crystallin isomerization reveal the activity of protein isoaspartyl methyltransferase (PIMT) in the nucleus and cortex of human lenses. *Experimental Eye Research* 171, 131–141.

Maida, A., Lamont, B. J., Cao, X., & Drucker, D. J. (2010). Metformin regulates the incretin receptor axis via a pathway dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. In *Diabetologia* (Vol. 54, Issue 2, pp. 339–349).

Malloy, V. L., Krajcik, R. A., Bailey, S. J., Hristopoulos, G., Plummer, J. D., & Orentreich, N. (2006). Methionine restriction decreases visceral fat mass and preserves insulin action in aging male Fischer 344 rats independent of energy restriction. In *Aging Cell* (Vol. 5, Issue 4, pp. 305–314).

- Manczak M, Park BS, Jung Y & Reddy PH (2004) Differential Expression of Oxidative Phosphorylation Genes in Patients With Alzheimer's Disease: Implications for Early Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Damage. *NMM* 5, 147–162.
- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). The Protein Kinase Complement of the Human Genome. In *Science* (Vol. 298, Issue 5600, pp. 1912–1934).
- Markham, G. D., & Pajares, M. A. (2008). Structure-function relationships in methionine adenosyltransferases. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 66, Issue 4, pp. 636–648).
- Martínez, Y., Li, X., Liu, G., Bin, P., Yan, W., Más, D., Valdivié, M., Hu, C.-A. A., Ren, W., & Yin, Y. (2017). The role of methionine on metabolism, oxidative stress, and diseases. In *Amino Acids* (Vol. 49, Issue 12, pp. 2091–2098).
- Martinov, M. V., Vitvitsky, V. M., Banerjee, R., & Ataullakhanov, F. I. (2010). The logic of the hepatic methionine metabolic cycle. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* (Vol. 1804, Issue 1, pp. 89–96). Elsevier BV.
- Mecham, J. O., Rowitch, D., Wallace, C. D., Stern, P. H., & Hoffman, R. M. (1983). The metabolic defect of methionine dependence occurs frequently in human tumor cell lines. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Vol. 117, Issue 2, pp. 429–434).
- Meister, A. (1982). Metabolism and function of glutathione: an overview. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 10, Issue 2, pp. 78–79).
- Meister, A. (1991). Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy. In *Pharmacology & Therapeutics* (Vol. 51, Issue 2, pp. 155–194).
- Mentch, S. J., & Locasale, J. W. (2015). One-carbon metabolism and epigenetics: understanding the specificity. In *Annals of the New York Academy of Sciences* (Vol. 1363, Issue 1, pp. 91–98).
- Mick, E. 2019. Mitochondrial Triggers of the Integrated Stress Response: Disentangling the Bioenergetic Rubik's Cube. Doctoral dissertation, Harvard University, Graduate School of Arts & Sciences.
- Miller DB, Spence JD. Clinical pharmacokinetics of fibric acid derivatives (fibrates). *Clin Pharmacokinet.* 1998 Feb;34(2):155-62.
- Miller, R. A., Buehner, G., Chang, Y., Harper, J. M., Sigler, R., & Smith-Wheelock, M. (2005). Methionine-deficient diet extends mouse lifespan, slows immune and lens aging, alters glucose, T4, IGF-I and insulin levels, and increases hepatocyte MIF levels and stress resistance. In *Aging Cell* (Vol. 4, Issue 3, pp. 119–125).
- Montanari, T., Poščić, N., & Colitti, M. (2017). Factors involved in white-to-brown adipose tissue conversion and in thermogenesis: a review. In *Obesity Reviews* (Vol. 18, Issue 5, pp. 495–513).
- Morrison LD, Smith DD & Kish SJ (1996) Brain S-Adenosylmethionine Levels Are Severely Decreased in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry* 67, 1328–1331.
- Murai, M., & Miyoshi, H. (2016). Current topics on inhibitors of respiratory complex I. In *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* (Vol. 1857, Issue 7, pp. 884–891).
- Najbauer J, Orpizewski J & Aswad DW (1996) Molecular Aging of Tubulin: Accumulation of Isoaspartyl Sites in Vitro and in Vivo. *Biochemistry* 35, 5183–5190.
- Oosterveer, M. H., Grefhorst, A., van Dijk, T. H., Havinga, R., Staels, B., Kuipers, F., Groen, A. K., & Reijngoud, D.-J. (2009). Fenofibrate Simultaneously Induces Hepatic Fatty Acid Oxidation, Synthesis, and Elongation in Mice. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 284, Issue 49, pp. 34036–34044).
- Orentreich N, Matias JR, DeFelice A, Zimmerman JA. Low methionine ingestion by rats extends life span. *J Nutr.* 1993 Feb;123(2):269-74. doi: 10.1093/jn/123.2.269. PMID: 8429371. Pastore A, Piemonte F, Locatelli M, Lo Russo A, Gaeta LM, Tozzi G, Federici G. Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects. *Clin Chem.* 2001 Aug;47(8):1467-9. PMID: 11468240.
- Orwoll ES, Wiedrick J, Nielson CM, Jacobs J, Baker ES, Piehowski P, Petyuk V, Gao Y, Shi T, Smith RD, Bauer DC, Cummings SR & Lapidus J (2020) Proteomic assessment of serum biomarkers of longevity in older men. *Aging Cell* 19.

- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A., & Gorman, A. M. (2016). The integrated stress response. In *EMBO reports* (Vol. 17, Issue 10, pp. 1374–1395).
- Palam, L. R., Baird, T. D., & Wek, R. C. (2011). Phosphorylation of eIF2 Facilitates Ribosomal Bypass of an Inhibitory Upstream ORF to Enhance CHOP Translation. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 286, Issue 13, pp. 10939–10949).
- Paranandi MV, Guzzetta AW, Hancock WS & Aswad DW (1994) Deamidation and isoaspartate formation during in vitro aging of recombinant tissue plasminogen activator. *Journal of Biological Chemistry* 269, 243–253.
- Parey K, Lasham J, Mills DJ, Djurabekova A, Haapanen O, Yoga EG, Xie H, Kühlbrandt W, Sharma V, Vonck J & Zickermann V (2021) High-resolution structure and dynamics of mitochondrial complex I—Insights into the proton pumping mechanism. *Sci. Adv.* 7.
- Parkhitko AA, Jouandin P, Mohr SE, Perrimon N. Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging Cell.* 2019; 18:e13034.
- Patel, S., Alvarez-Guaita, A., Melvin, A., Rimmington, D., Dattilo, A., Miedzybrodzka, E. L., Cimino, I., Maurin, A.-C., Roberts, G. P., Meek, C. L., Virtue, S., Sparks, L. M., Parsons, S. A., Redman, L. M., Bray, G. A., Liou, A. P., Woods, R. M., Parry, S. A., Jeppesen, P. B., ... O’Rahilly, S. (2019). GDF15 Provides an Endocrine Signal of Nutritional Stress in Mice and Humans. In *Cell Metabolism* (Vol. 29, Issue 3, pp. 707-718.e8).
- Pegg, A. E. (2009). S-Adenosylmethionine decarboxylase. In H. M. Wallace (Ed.), *Essays in Biochemistry* (Vol. 46, pp. 25–46).
- Pellegrino MW, Nargund AM & Haynes CM (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833, 410–416.
- Peng H-P, Lee KH, Jian J-W & Yang A-S (2014) Origins of specificity and affinity in antibody–protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111.
- Peng Y-T, Chen P, Ouyang R-Y & Song L (2015) Multifaceted role of prohibitin in cell survival and apoptosis. *Apoptosis* 20, 1135–1149.
- Pérez-Sala, D., Martínez-Costa, Ó. H., Aragón, J. J., & Pajares, M. A. (2018). Alterations in Nucleocytoplasmic Localization of the Methionine Cycle Induced by Oxidative Stress During Liver Disease. In *The Liver* (pp. 21–41).
- Perrone, C. E., Malloy, V. L., Orentreich, D. S., & Orentreich, N. (2013). Metabolic adaptations to methionine restriction that benefit health and lifespan in rodents. In *Experimental Gerontology* (Vol. 48, Issue 7, pp. 654–660).
- Perrone, C. E., Mattocks, D. A. L., Hristopoulos, G., Plummer, J. D., Krajcik, R. A., & Orentreich, N. (2008). Methionine restriction effects on 11 β -HSD1 activity and lipogenic/lipolytic balance in F344 rat adipose tissue. In *Journal of Lipid Research* (Vol. 49, Issue 1, pp. 12–23).
- Perrone, C. E., Mattocks, D. A. L., Plummer, J. D., Chittur, S. V., Mohney, R., Vignola, K., Orentreich, D. S., & Orentreich, N. (2012). Genomic and Metabolic Responses to Methionine-Restricted and Methionine-Restricted, Cysteine-Supplemented Diets in Fischer 344 Rat Inguinal Adipose Tissue, Liver and Quadriceps Muscle. In *Lifestyle Genomics* (Vol. 5, Issue 3, pp. 132–157).
- Petrossian, T. C., & Clarke, S. G. (2011). Uncovering the Human Methyltransferasome. In *Molecular & Cellular Proteomics* (Vol. 10, Issue 1, p. M110.000976).
- Pettit, A. P., Jonsson, W. O., Bargoud, A. R., Mirek, E. T., Peelor, F. F., III, Wang, Y., Gettys, T. W., Kimball, S. R., Miller, B. F., Hamilton, K. L., Wek, R. C., & Anthony, T. G. (2017). Dietary Methionine Restriction Regulates Liver Protein Synthesis and Gene Expression Independently of Eukaryotic Initiation Factor 2 Phosphorylation in Mice. In *The Journal of Nutrition* (Vol. 147, Issue 6, pp. 1031–1040).
- Poirson-Bichat, F., Gonfalone, G., Bras-Gonçalves, R., Dutrillaux, B., & Poupon, M. (1997). Growth of methionine-dependent human prostate cancer (PC-3) is inhibited by ethionine combined with methionine starvation. In *British Journal of Cancer* (Vol. 75, Issue 11, pp. 1605–1612).
- Quirós PM, Mottis A & Auwerx J (2016) Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 213–226.

- Quirós PM, Prado MA, Zamboni N, D'Amico D, Williams RW, Finley D, Gygi SP & Auwerx J (2017) Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. *Journal of Cell Biology* 216, 2027–2045.
- Rákosníková T, Kelifová S, Štufková H, Lokvencová K, Lišková P, Kousal B, Honzík T, Hansíková H, Martínek V & Tesařová M (2023) Case report: A rare variant m.4135T>C in the MT-ND1 gene leads to Leber hereditary optic neuropathy and altered respiratory chain supercomplexes. *Front. Genet.* 14.
- Rath S, Sharma R, Gupta R, Ast T, Chan C, Durham TJ, Goodman RP, Grabarek Z, Haas ME, Hung WHW, Joshi PR, Jourdain AA, Kim SH, Kotrys AV, Lam SS, McCoy JG, Meisel JD, Miranda M, Panda A, Patgiri A, Rogers R, Sadre S, Shah H, Skinner OS, To T-L, Walker MA, Wang H, Ward PS, Wengrod J, Yuan C-C, Calvo SE & Mootha VK (2020) MitoCarta3.0: an updated mitochondrial proteome now with sub-organelle localization and pathway annotations. *Nucleic Acids Research* 49, D1541–D1547
- Rauthan M, Ranji P, Abukar R & Pilon M (2015) A Mutation in *Caenorhabditis elegans* NDUF-7 Activates the Mitochondrial Stress Response and Prolongs Lifespan via ROS and CED-4. *G3 Genes | Genomes | Genetics* 5, 1639–1648.
- Renga, B. (2011). Hydrogen Sulfide Generation in Mammals: The Molecular Biology of Cystathionine- β -Synthase (CBS) and Cystathionine- γ -Lyase (CSE). In *Inflammation & Allergy - Drug Targets* (Vol. 10, Issue 2, pp. 85–91).
- Robinson NE & Robinson AB (2001) Deamidation of human proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 12409–12413.
- Rodenburg RJ (2016) Mitochondrial complex I-linked disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857, 938–945.
- Runkel ED, Liu S, Baumeister R & Schulze E (2013) Surveillance-Activated Defenses Block the ROS-Induced Mitochondrial Unfolded Protein Response. *E. Mango, ed. PLoS Genet* 9, e1003346.
- Sánchez-Caballero L, Ruzzenente B, Bianchi L, Assouline Z, Barcia G, Metodiev MD, Rio M, Funalot B, van den Brand MAM, Guerrero-Castillo S, Molenaar JP, Koolen D, Brandt U, Rodenburg RJ, Nijtmans LG & Rötig A (2016) Mutations in Complex I Assembly Factor TMEM126B Result in Muscle Weakness and Isolated Complex I Deficiency. *The American Journal of Human Genetics* 99, 208–216.
- Sato, D., & Nozaki, T. (2009). Methionine gamma-lyase: The unique reaction mechanism, physiological roles, and therapeutic applications against infectious diseases and cancers. In *IUBMB Life* (Vol. 61, Issue 11, pp. 1019–1028).
- Sayles NM, Napierala JS, Anrather J, Diedhiou N, Li J, Napierala M, Puccio H & Manfredi G (2023) Comparative multi-omic analyses of cardiac mitochondrial stress in three mouse models of frataxin deficiency. *Disease Models & Mechanisms* 16.
- Schaffer, S. W., Azuma, J., & Mozaffari, M. (2009). Role of antioxidant activity of taurine in diabetes. This article is one of a selection of papers from the NATO Advanced Research Workshop on Translational Knowledge for Heart Health (published in part 1 of a 2-part Special Issue). In *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* (Vol. 87, Issue 2, pp. 91–99).
- Schindeldecker M, Stark M, Behl C & Moosmann B (2011) Differential cysteine depletion in respiratory chain complexes enables the distinction of longevity from aerobicity. *Mechanisms of Ageing and Development* 132, 171–179.
- Schweizer U, Streckfuß F, Pelt P, Carlson BA, Hatfield DL, Köhrle J & Schomburg L (2005) Hepatically derived selenoprotein P is a key factor for kidney but not for brain selenium supply. *Biochemical Journal* 386, 221–226.
- Sears TK & Angelastro JM (2017) The transcription factor ATF5: role in cellular differentiation, stress responses, and cancer. *Oncotarget* 8, 84595–84609.
- Sekowska, A., & Danchin, A. (2002). In *BMC Microbiology* (Vol. 2, Issue 1, p. 8). Sinclair, L. V., Howden, A. J., Brenes, A., Spinelli, L., Hukelmann, J. L., Macintyre, A. N., Liu, X., Thomson, S., Taylor, P. M., Rathmell, J. C., Locasale, J. W., Lamond, A. I., & Cantrell, D. A. (2019). Antigen receptor control of methionine metabolism in T cells. In *eLife* (Vol. 8).

- Siddiqui MA, Ahmad J, Farshori NN, Saquib Q, Jahan S, Kashyap MP, Ahamed M, Musarrat J & Al-Khedhairi AA (2013) Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 384, 59–69.
- Singh, P., Gollapalli, K., Mangiola, S., Schraner, D., Yusuf, M. A., Chamoli, M., Shi, S. L., Lopes Bastos, B., Nair, T., Riermeier, A., Vayndorf, E. M., Wu, J. Z., Nilakhe, A., Nguyen, C. Q., Muir, M., Kiflezghi, M. G., Foulger, A., Junker, A., Devine, J., ... Yadav, V. K. (2023). Taurine deficiency as a driver of aging. In *Science* (Vol. 380, Issue 6649).
- Söling, H., Zahlten, R., Reimold, W., & Willms, B. (1970). Utilization of Ketone Bodies by Adipose Tissue and Its Regulation by Carbohydrate Metabolism. In *Hormone and Metabolic Research* (Vol. 2, Issue 02, pp. 56–63).
- Staels, B., Dallongeville, J., Auwerx, J., Schoonjans, K., Leitersdorf, E., & Fruchart, J.-C. (1998). Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. In *Circulation* (Vol. 98, Issue 19, pp. 2088–2093). Ovid Technologies
- Stanley, B. A., & Shantz, L. M. (1994). S-adenosylmethionine decarboxylase structure—function relationships. In *Biochemical Society Transactions* (Vol. 22, Issue 4, pp. 863–869).
- Stern, P. H., Wallace, C. D., & Hoffman, R. M. (1984). Altered methionine metabolism occurs in all members of a set of diverse human tumor cell lines. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 119, Issue 1, pp. 29–34).
- Stinccone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2014). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. In *Biological Reviews* (Vol. 90, Issue 3, pp. 927–963).
- Sun W, Nie T, Li K, Wu W, Long Q, Feng T, Mao L, Gao Y, Liu Q, Gao X, Ye D, Yan K, Gu P, Xu Y, Zhao X, Chen K, Loomes KM, Lin S, Wu D & Hui X (2021) Hepatic CPT1A Facilitates Liver–Adipose Cross Talk via Induction of FGF21 in Mice. *Diabetes* 71, 31–42.
- Swerdlow RH & Khan SM (2009) The Alzheimer’s disease mitochondrial cascade hypothesis: An update. *Experimental Neurology* 218, 308–315.
- Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ & Mering C von (2018) STRING v11: protein–protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets. *Nucleic Acids Research* 47, D607–D613.
- Tan Y, Xu M, Hoffman RM. Broad selective efficacy of recombinant methioninase and polyethylene glycol-modified recombinant methioninase on cancer cells In Vitro. *Anticancer Res.* 2010 Apr;30(4):1041-6. PMID: 20530407.
- Tan, Y., Xu, M., Tan, X., Tan, X., Wang, X., Saikawa, Y., Nagahama, T., Sun, X., Lenz, M., & Hoffman, R. M. (1997). Overexpression and Large-Scale Production of Recombinant l-Methionine- α -deamino- γ -mercaptomethanelyase for Novel Anticancer Therapy. In *Protein Expression and Purification* (Vol. 9, Issue 2, pp. 233–245).
- Tanaka, H., Esaki, N., & Soda, K. (1985). A versatile bacterial enzyme: l-methionine γ -lyase. In *Enzyme and Microbial Technology* (Vol. 7, Issue 11, pp. 530–537).
- Taoka, S., Lepore, B. W., Kabil, Ö., Ojha, S., Ringe, D., & Banerjee, R. (2002). Human Cystathionine β -Synthase Is a Heme Sensor Protein. Evidence That the Redox Sensor Is Heme and Not the Vicinal Cysteines in the CXXC Motif Seen in the Crystal Structure of the Truncated Enzyme,. In *Biochemistry* (Vol. 41, Issue 33, pp. 10454–10461).
- Taoka, S., Ohja, S., Shan, X., Kruger, W. D., & Banerjee, R. (1998). Evidence for Heme-mediated Redox Regulation of Human Cystathionine β -Synthase Activity. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 273, Issue 39, pp. 25179–25184).
- Tessari, P., & Tiengo, A. (2008). Metformin treatment of rats with diet-induced overweight and hypertriglyceridemia decreases plasma triglyceride concentrations, while decreasing triglyceride and increasing ketone body output by the isolated perfused liver. In *Acta Diabetologica* (Vol. 45, Issue 3, pp. 143–145).

- Tokubuchi, I., Tajiri, Y., Iwata, S., Hara, K., Wada, N., Hashinaga, T., Nakayama, H., Mifune, H., & Yamada, K. (2017). Beneficial effects of metformin on energy metabolism and visceral fat volume through a possible mechanism of fatty acid oxidation in human subjects and rats. *PLOS ONE* (Vol. 12, Issue 2, p. e0171293).
- Tost, J. (2009). DNA Methylation: An Introduction to the Biology and the Disease-Associated Changes of a Promising Biomarker. In *Molecular Biotechnology* (Vol. 44, Issue 1, pp. 71–81).
- Tremaroli, V., & Bäckhed, F. (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. In *Nature* (Vol. 489, Issue 7415, pp. 242–249).
- Van Erven PMM, Gabreëls FJM, Wevers RA, Doesburg WH, Ruitenbeek W, Renier WO & Lamers KJB (1987) Intravenous pyruvate loading test in Leigh syndrome. *Journal of the Neurological Sciences* 77, 217–227.
- van Straaten HLM, van Tintelen JP, Trijbels JMF, van den Heuvel LP, Troost D, Rozemuller JM, Duran M, de Vries LS, Schuelke M & Barth PG (2005) Neonatal Lactic Acidosis, Complex I/IV Deficiency, and Fetal Cerebral Disruption. *Neuropediatrics* 36, 193–199.
- Vedi M, Smith JR, Thomas Hayman G, Tutaj M, Brodie KC, De Pons JL, Demos WM, Gibson AC, Kaldunski ML, Lamers L, Laulederkind SJF, Thota J, Thorat K, Tutaj MA, Wang S-J, Zacher S, Dwinell MR & Kwitek AE (2023) 2022 updates to the Rat Genome Database: a Findable, Accessible, Interoperable, and Reusable (FAIR) resource. V. Wood, ed. *GENETICS* 224.
- Vidgren, J., Svensson, L. A., & Liljas, A. (1994). Crystal structure of catechol O-methyltransferase. In *Nature* (Vol. 368, Issue 6469, pp. 354–358).
- Vigneswara, V., Lowenson, J. D., Powell, C. D., Thakur, M., Bailey, K., Clarke, S., Ray, D. E., & Carter, W. G. (2006). Proteomic Identification of Novel Substrates of a Protein Isoaspartyl Methyltransferase Repair Enzyme. In *Journal of Biological Chemistry* (Vol. 281, Issue 43, pp. 32619–32629).
- Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AMS, Elsas LJ II & Nikoskelainen EK (1988) Mitochondrial DNA Mutation Associated with Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Science* 242, 1427–1430.
- Wanders, D., Burk, D. H., Cortez, C. C., Van, N. T., Stone, K. P., Baker, M., Mendoza, T., Mynatt, R. L., & Gettys, T. W. (2015). UCP1 is an essential mediator of the effects of methionine restriction on energy balance but not insulin sensitivity. In *The FASEB Journal* (Vol. 29, Issue 6, pp. 2603–2615).
- Wanders, D., Forney, L. A., Stone, K. P., Burk, D. H., Pierse, A., & Gettys, T. W. (2017). FGF21 Mediates the Thermogenic and Insulin-Sensitizing Effects of Dietary Methionine Restriction but Not Its Effects on Hepatic Lipid Metabolism. In *Diabetes* (Vol. 66, Issue 4, pp. 858–867).
- Wanders, D., Stone, K. P., Forney, L. A., Cortez, C. C., Dille, K. N., Simon, J., Xu, M., Hotard, E. C., Nikonorova, I. A., Pettit, A. P., Anthony, T. G., & Gettys, T. W. (2016). Role of GCN2-Independent Signaling Through a Noncanonical PERK/NRF2 Pathway in the Physiological Responses to Dietary Methionine Restriction. In *Diabetes* (Vol. 65, Issue 6, pp. 1499–1510).
- Wang J, Guo C, Meng Z, Zwan MD, Chen X, Seelow S, Lundström SL, Rodin S, Teunissen CE & Zubarev RA (2022) Testing the link between isoaspartate and Alzheimer's disease etiology. *Alzheimer's & Dementia* 19, 1491–1502.
- Wang P, Dhananjayan N, Hagraas MA & Stuchebrukhov AA (2021) Respiratory complex I: Bottleneck at the entrance of quinone site requires conformational change for its opening. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1862, 148326.
- Weinshilboum RM, Sladek SL. Mercaptopurine pharmacogenetics: monogenic inheritance of erythrocyte thiopurine methyltransferase activity. *Am J Hum Genet.* 1980 Sep;32(5) 651-662. PMID: 7191632; PMCID: PMC1686086.
- Wirth C, Brandt U, Hunte C & Zickermann V (2016) Structure and function of mitochondrial complex I. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857, 902–914.
- Wong, R. H., & Sul, H. S. (2010). Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 684–691).

- Wu Z, Senchuk MM, Dues DJ, Johnson BK, Cooper JF, Lew L, Machiela E, Schaar CE, DeJonge H, Blackwell TK & Van Raamsdonk JM (2018) Mitochondrial unfolded protein response transcription factor ATFS-1 promotes longevity in a long-lived mitochondrial mutant through activation of stress response pathways. *BMC Biol* 16.
- Xiao, W., Gehring, M., Choi, Y., Margossian, L., Pu, H., Harada, J. J., Goldberg, R. B., Pennell, R. I., & Fischer, R. L. (2003). Imprinting of the MEA Polycomb Gene Is Controlled by Antagonism between MET1 Methyltransferase and DME Glycosylase. In *Developmental Cell* (Vol. 5, Issue 6, pp. 891–901).
- Xie M & Schowen RL (1999) Secondary Structure and Protein Deamidation. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88, 8–13. Available at: <http://dx.doi.org/10.1021/js9802493>.
- Xin, L., Lu, H., Liu, C., Zeng, F., Yuan, Y.-W., Wu, Y., Wang, J.-L., Wu, D.-Z., & Zhou, L.-Q. (2021). Methionine deficiency promoted mitophagy via lncRNA PVT1-mediated promoter demethylation of BNIP3 in gastric cancer. In *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* (Vol. 141, p. 106100).
- Xu, G., & Chance, M. R. (2005). Radiolytic Modification and Reactivity of Amino Acid Residues Serving as Structural Probes for Protein Footprinting. In *Analytical Chemistry* (Vol. 77, Issue 14, pp. 4549–4555).
- Yamamoto A, Takagi H, Kitamura D, Tatsuoka H, Nakano H, Kawano H, Kuroyanagi H, Yahagi Y, Kobayashi S, Koizumi K, Sakai T, Saito K, Chiba T, Kawamura K, Suzuki K, Watanabe T, Mori H & Shirasawa T (1998) Deficiency in Protein I-Isoaspartyl Methyltransferase Results in a Fatal Progressive Epilepsy. *J. Neurosci.* 18, 2063–2074.
- Yamanaka R, Nomura Y, Segawa M & Nonaka I (1987) MELAS, Myoclonus, Ataxia and Deficiencies of Complexes I and IV in Muscle Mitochondria. *Pediatrics International* 29, 761–767.
- Yang, Z., Sun, X., Li, S., Tan, Y., Wang, X., Zhang, N., Yagi, S., Takakura, T., Kobayashi, Y., Takimoto, A., Yoshioka, T., Suginaka, A., Frenkel, E. P., & Hoffman, R. M. (2004). Circulating Half-Life of PEGylated öPhosphate. In *Cancer Research* (Vol. 64, Issue 16, pp. 5775–5778).
- Yeo, E. J., & Wagner, C. (1994). Tissue distribution of glycine N-methyltransferase, a major folate-binding protein of liver. In *Proceedings of the National Academy of Sciences* (Vol. 91, Issue 1, pp. 210–214).
- Yoshida S & Takahashi N (1978) Piericidins: Naturally Occurring Inhibitors against Mitochondrial Respiration. *HETEROCYCLES* 10, 425.
- Zeng, Y., Forbes, K. C., Wu, Z., Moreno, S., Piwnicka-Worms, H., & Enoch, T. (1998). Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. In *Nature* (Vol. 395, Issue 6701, pp. 507–510).
- Zhang Y, Wu Y, Li B & Tian J (2024) Phloretin prolongs lifespan of *Caenorhabditis elegans* via inhibition of NDUFS1 and NDUFS6 at mitochondrial complex I. *Free Radical Biology and Medicine* 221, 283–295
- Zhang, M., Sun, W., Qian, J., & Tang, Y. (2018). Fasting exacerbates hepatic growth differentiation factor 15 to promote fatty acid β -oxidation and ketogenesis via activating XBP1 signaling in liver. In *Redox Biology* (Vol. 16, pp. 87–96).
- Zhao, T., & Lum, J. J. (2022). Methionine cycle-dependent regulation of T cells in cancer immunity. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12).
- Zickermann V, Barquera B, Wikström M & Finel M (1998) Analysis of the Pathogenic Human Mitochondrial Mutation ND1/3460, and Mutations of Strictly Conserved Residues in Its Vicinity, Using the Bacterium *Paracoccus denitrificans*. *Biochemistry* 37, 11792–11796.

Lebenslauf

Angaben zur Person

[Redacted]	[Redacted]
------------	------------

Berufliche Tätigkeiten

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

Bildungsweg

[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]
[Redacted]	[Redacted]

Danksagung

Herrn [REDACTED] möchte ich besonders für die unfassbar tolle Unterstützung und sinnvolle Leitung des Projekts danken, ebenso wie für die Möglichkeit, an einem abwechslungsreichen und spannenden Thema zu arbeiten. Er war stets zu Diskussionen bereit und gab mir tolle Impulse, die oft zu Problemlösungen führten.

Ein großer Dank geht an die Frau [REDACTED] von der Universitätsmedizin Frankfurt und ihre tolle Arbeitsgruppe für eine langjährige Freundschaft und die Unterstützung bei der Massenspektrometrie und weiteren Assays, die das gemeinsame Projekt stark vorangetrieben haben.

Außerdem gilt Herrn [REDACTED] ein großer Dank für die Bereitstellung der Gerätschaften zur Isolation von Mitochondrien und für sein Gutachten.

Ich möchte auch [REDACTED] dafür danken, dass sie sich bereit erklärte, diese Dissertation zu begutachten.

[REDACTED] möchte ich für die zwei richtig witzige Jahre danken, für die Späße und eine Menge toller und unterhaltsamer Gespräche, die die Arbeit deutlich angenehmer gemacht haben und selbstverständlich für all die Fahrten zu ALDI! Außerhalb der Arbeit geht an meinen sehr geschätzten Freund [REDACTED] für die Abwechslung zur Arbeit und offene Ohren für jede Situation.

Am meisten möchte ich mich bei meiner Mutter [REDACTED] für ihre Geduld und Unterstützung in jeder Weise während der Doktorarbeit danken. Last, but not least gehört mein ausdrücklicher Dank meiner Freundin [REDACTED] für ihre unermüdliche Wertschätzung meiner Arbeit und den Beistand in den letzten zwei Jahren der Dissertation!

10. Anhang

Tabelle 11: Gene, welche in allen vier untersuchten Transkriptomstudien entweder hoch- oder runterreguliert wurden. In grün sind die hochregulierten, in rot die herunterregulierten Gene dargestellt.

Gene Name	Rat 20M 80%	Rat 3M 80%	Mouse 3M 86%	Mouse 3M 80%	Average	Gene description
ASNS	2.10	1.89	2.57	3.36	2.48	asparagine synthetase
SLC16A5	5.46	0.43	2.31	1.48	2.42	solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters), member 5
VLDLR	3.39	2.53	1.90	1.76	2.40	very low density lipoprotein receptor
MTHFD2	2.56	2.18	1.50	1.77	2.00	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NAD ⁺ dependent), methenyltetrahydrofolate cyclohydrolase
PSAT1	1.24	1.40	2.33	2.98	1.99	phosphoserine aminotransferase 1
FGF21	1.23	3.09	1.70	1.75	1.94	fibroblast growth factor 21
CYP4A14	0.83	0.21	2.06	2.87	1.49	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14
PIR	2.60	1.07	0.92	0.97	1.39	pirin
APP	1.94	1.00	1.30	0.67	1.23	amyloid beta (A4) precursor protein
IGFBP2	2.98	0.64	0.50	0.74	1.22	insulin-like growth factor binding protein 2
CD36	0.80	0.84	2.15	0.75	1.13	CD36 molecule
UGDH	1.57	0.61	1.38	0.92	1.12	UDP-glucose dehydrogenase
ABCA8B	1.81	0.79	0.96	0.88	1.11	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8b
DDAH1	1.92	1.15	0.63	0.45	1.04	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1
SLC7A5	0.99	0.79	0.68	1.36	0.96	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member 5
EPHX1	0.73	0.56	1.15	1.05	0.87	epoxide hydrolase 1, microsomal
AOX1	0.53	0.51	1.31	0.97	0.83	aldehyde oxidase 1
GPATCH4	1.38	1.02	0.35	0.34	0.77	G patch domain containing 4
GCLC	1.49	0.48	0.48	0.49	0.73	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
GSR	1.18	0.76	0.57	0.41	0.73	glutathione reductase
HSPA9	1.42	0.67	0.46	0.34	0.72	heat shock protein 9
SOAT2	1.12	0.53	0.74	0.49	0.72	sterol O-acyltransferase 2
DNAJC12	0.61	0.44	0.74	0.80	0.65	DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C12
PRMT3	1.15	0.42	0.42	0.59	0.64	protein arginine N-methyltransferase 3

TXNRD1	1.16	0.52	0.35	0.45	0.62	thioredoxin reductase 1
ATF5	0.76	0.51	0.74	0.45	0.62	activating transcription factor 5
YARS	0.69	0.68	0.43	0.48	0.57	tyrosyl-tRNA synthetase
PSPH	0.69	0.48	0.38	0.57	0.53	phosphoserine phosphatase
ANXA7	1.00	0.44	0.41	0.22	0.52	annexin A7
ATIC	0.77	0.53	0.26	0.35	0.48	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase
TMEM106B	0.88	0.33	0.41	0.26	0.47	transmembrane protein 106B
ALG8	0.61	0.40	0.23	0.45	0.42	asparagine-linked glycosylation 8 (alpha-1,3-glucosyltransferase)
FBXO21	0.55	0.39	0.24	0.44	0.41	F-box protein 21
MYO1C	0.47	0.29	0.44	0.38	0.39	myosin IC
CUEDC2	0.56	0.30	0.37	0.29	0.38	CUE domain containing 2
PGRMC1	0.79	0.26	0.21	0.24	0.37	progesterone receptor membrane component 1
F13B	-0.57	-0.18	-0.26	-0.28	-0.32	coagulation factor XIII, beta subunit
PDCD4	-0.45	-0.32	-0.54	-0.46	-0.44	programmed cell death 4
ACY3	-0.44	-0.54	-0.34	-0.46	-0.44	aspartoacylase (aminoacylase) 3
SLCO2B1	-0.82	-0.27	-0.47	-0.42	-0.50	solute carrier organic anion transporter family, member 2b1
CD81	-1.00	-0.51	-0.26	-0.35	-0.53	CD81 antigen
AADAC	-0.64	-0.49	-0.40	-0.62	-0.54	arylacetamide deacetylase
ETNK2	-0.65	-0.54	-0.59	-0.40	-0.55	ethanolamine kinase 2
CYB5R3	-0.96	-0.42	-0.49	-0.46	-0.58	cytochrome b5 reductase 3
DBI	-1.61	-0.21	-0.18	-0.38	-0.59	diazepam binding inhibitor
C8A	-0.61	-0.15	-1.34	-0.34	-0.61	complement component 8, alpha polypeptide
VAMP7	-1.15	-0.39	-0.62	-0.31	-0.62	Vesicle-associated membrane protein 7
THEM7	-1.13	-0.34	-0.60	-0.71	-0.70	thioesterase superfamily member 7
PSMB9	-1.12	-0.43	-0.56	-0.79	-0.72	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 9 (large multifunctional peptidase 2)
GNA14	-0.62	-0.22	-0.66	-1.78	-0.82	guanine nucleotide binding protein, alpha 14
P2RY2	-2.03	-0.56	-0.22	-0.66	-0.87	purinergic receptor P2Y, G-protein coupled 2
C9	-0.76	-0.19	-2.59	-0.73	-1.07	complement component 9
PKLR	-1.85	-0.70	-0.76	-1.08	-1.10	pyruvate kinase liver and red blood cell
SRD5A1	-2.59	-0.49	-1.56	-0.51	-1.29	steroid 5 alpha-reductase 1
SULF2	-1.61	-0.43	-1.05	-2.22	-1.33	sulfatase 2
SLC2A5	-3.45	-0.55	-1.22	-1.00	-1.55	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 5
THRSP	-2.83	-1.21	-1.79	-1.79	-1.90	thyroid hormone responsive
WFDC21	-5.82	-1.20	-1.14	-0.40	-2.14	WAP four-disulfide core domain 21
C6	-4.09	-1.24	-2.65	-0.80	-2.20	complement component 6

Tabelle 12: Gene, welche in drei von vier untersuchten Transkriptomstudien entweder hoch- oder runterreguliert wurden. In grün sind die hochregulierten, in rot die herunterregulierten Gene dargestellt. Die leeren Stellen deuten an, dass in der spezifischen Studie das Gen nicht signifikant reguliert war.

Gene Name	Rat 20M 80%	Rat 3M 80%	Mouse 3M 86%	Mouse 3M 80%	Average	Gene description
SERPINA7	2.17	3.08	1.97		2.41	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 7
TRIB3	4.18	1.69	0.51		2.13	tribbles pseudokinase 3
CSAD	1.13		2.11	2.57	1.94	cysteine sulfinic acid decarboxylase
ACOT3	0.83		1.76	2.64	1.74	acyl-CoA thioesterase 3
PHGDH	3.07	0.82	1.29		1.73	3-phosphoglycerate dehydrogenase
CYP4A14		0.21	2.06	2.87	1.71	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 14
ALDH18A1	3.20		0.78	1.06	1.68	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1
HTATIP2	1.86		1.60	1.43	1.63	HIV-1 Tat interactive protein 2
ABCC4	2.62	0.75	1.49		1.62	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4
ACSF2	2.90	1.28	0.32		1.50	acyl-CoA synthetase family member 2
ABCC3	2.07	0.91	1.30		1.43	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3
NQO1		0.49	2.21	1.49	1.40	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1
CHCHD6	2.81	0.64		0.66	1.37	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6
SLC3A2	1.46	1.58	0.98		1.34	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2
NIPAL2	2.71	0.47		0.83	1.34	NIPA-like domain containing 2
SORT1	2.63	0.50		0.69	1.27	sortilin 1
ENC1	2.30	1.03	0.41		1.25	ectodermal-neural cortex 1
MYC	1.74	0.85	0.93		1.17	myelocytomatosis oncogene
SRXN1	2.06		0.72	0.51	1.09	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)

SLC7A1	2.07	0.53		0.67	1.09	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ^+ system), member 1
OSGIN1	1.00		1.04	1.20	1.08	oxidative stress induced growth inhibitor 1
AGPAT9		0.67	1.30	1.26	1.08	glycerol-3-phosphate acyltransferase 3
GAS5	1.61	0.64	0.86		1.04	growth arrest specific 5
RAB3D	1.78		0.50	0.67	0.98	RAB3D, member RAS oncogene family
CREG1	1.95		0.53	0.47	0.98	cellular repressor of E1A-stimulated genes 1
CLN6	0.98		1.09	0.74	0.94	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 6
GARS	1.35		0.88	0.56	0.93	glycyl-tRNA synthetase
ABCD2		0.39	1.63	0.74	0.92	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2
ACOT2	0.91	0.73	1.10		0.91	acyl-CoA thioesterase 2
FMO1	1.57		0.57	0.46	0.87	flavin containing monooxygenase 1
GADD45A	1.30	0.86	0.43		0.86	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 alpha
ALDH1A1	0.90	1.33	0.34		0.86	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A1
PCK2		0.59	0.79	1.18	0.85	phosphoenolpyruvate carboxykinase 2 (mitochondrial)
NUPR1		0.50	0.87	1.16	0.84	nuclear protein transcription regulator 1
SLC7A7		0.17	0.92	1.43	0.84	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ^+ system), member 7
PPAT	1.51	0.65		0.35	0.84	phosphoribosyl pyrophosphate amidotransferase
FAM73A	0.96		0.56	0.97	0.83	mitoguardin 1
GCLM	1.87		0.23	0.34	0.81	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
DPH5	1.40	0.77	0.24		0.80	diphthamide biosynthesis 5
SLC25A27		0.54	0.17	1.67	0.79	solute carrier family 25, member 27
ENTPD5	1.03	0.52	0.82		0.79	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 5
IARS	1.26		0.45	0.62	0.78	isoleucine-tRNA synthetase
ASCC1	1.66	0.38	0.26		0.77	activating signal cointegrator 1 complex subunit 1
DTD1	1.20	0.67	0.42		0.76	D-tyrosyl-tRNA deacylase 1
C1QBP	1.17	0.62	0.48		0.76	complement component 1, q subcomponent binding protein
MDN1	1.13	0.84		0.29	0.75	midasin AAA ATPase 1
SLC13A3	0.85	0.55		0.83	0.74	solute carrier family 13 (sodium-dependent dicarboxylate transporter), member 3
GNL3	0.96	0.75	0.50		0.74	guanine nucleotide binding protein-like 3 (nucleolar)
DISP1	1.32	0.67	0.19		0.73	dispatched RND transporter family member 1

IMPDH2	1.02	0.79	0.34		0.72	inosine monophosphate dehydrogenase 2
SDAD1	1.16	0.57		0.42	0.71	SDA1 domain containing 1
SETD4		0.21	0.44	1.45	0.70	SET domain containing 4
SLC17A1	0.53		0.71	0.84	0.69	solute carrier family 17 (sodium phosphate), member 1
TMEM62	0.90	0.46	0.69		0.68	transmembrane protein 62
IGF2R	1.46	0.36	0.22		0.68	insulin-like growth factor 2 receptor
AIG1		0.62	1.11	0.28	0.67	androgen-induced 1
TFRC		0.53	0.76	0.69	0.66	transferrin receptor
SARS	0.88	0.72	0.37		0.66	seryl-aminoacyl-tRNA synthetase
HADHB	0.80	0.69	0.44		0.64	hydroxyacyl-CoA dehydrogenase trifunctional multienzyme complex subunit beta
GHITM	1.25	0.35	0.33		0.64	growth hormone inducible transmembrane protein
UNC13B		0.26	0.55	1.09	0.64	unc-13 homolog B
THG1L	0.80	0.89	0.21		0.64	tRNA-histidine guanylyltransferase 1-like (<i>S. cerevisiae</i>)
MARS	0.87	0.64	0.35		0.62	methionyl-tRNA synthetase, cytoplasmic
FAM89A		0.23	0.32	1.31	0.62	family with sequence similarity 89, member A
TRIM37	1.26	0.34		0.25	0.62	tripartite motif-containing 37
LONP1	0.97	0.32	0.55		0.61	lon peptidase 1, mitochondrial
GSTO1		0.36	0.50	0.98	0.61	glutathione S-transferase omega 1
APEX1	1.02	0.44	0.37		0.61	apurinic/aprimidinic endonuclease 1
RARS	0.84	0.41		0.56	0.60	arginyl-tRNA synthetase
TRPM6	1.20	0.35	0.23		0.59	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6
PTPN11	1.41	0.12	0.21		0.58	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
NARS	0.87	0.48	0.38		0.58	asparaginyl-tRNA synthetase
TMEM245	1.01	0.34		0.37	0.57	transmembrane protein 245
POLD4	0.80	0.50	0.42		0.57	polymerase (DNA-directed), delta 4
RCC2	0.79	0.49		0.43	0.57	regulator of chromosome condensation 2
FASTKD2	0.68	0.72	0.30		0.57	FAST kinase domains 2
SGK3	0.87		0.40	0.42	0.56	serum/glucocorticoid regulated kinase 3
KLB	0.77		0.48	0.42	0.56	klotho beta
RACK1	0.80	0.57	0.30		0.56	receptor for activated C kinase 1
CLPP	0.83	0.40	0.41		0.55	caseinolytic mitochondrial matrix peptidase proteolytic subunit
CYP20A1	0.81	0.42	0.40		0.54	cytochrome P450, family 20, subfamily a, polypeptide 1

CRELD1	1.05	0.23	0.34		0.54	cysteine-rich with EGF-like domains 1
PACIN2	0.95	0.23		0.43	0.54	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 2
HSPH1	0.54		0.56	0.50	0.53	heat shock 105kDa/110kDa protein 1
HFE	0.85	0.40	0.34		0.53	homeostatic iron regulator
ATF4	0.53	0.74	0.32		0.53	activating transcription factor 4
LRRIQ3		0.33	0.40	0.84	0.52	leucine-rich repeats and IQ motif containing 3
SCAMP5	0.72	0.24	0.61		0.52	secretory carrier membrane protein 5
NIP7	0.81	0.55		0.18	0.51	NIP7, nucleolar pre-rRNA processing protein
WDR12	0.76	0.54	0.22		0.51	WD repeat domain 12
THUMPD3	0.83	0.42		0.27	0.51	THUMP domain containing 3
SRGAP2	0.62		0.50	0.37	0.50	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2
SERF1	0.94	0.26	0.28		0.49	small EDRK-rich factor 1
TRMT1	0.97		0.26	0.24	0.49	tRNA methyltransferase 1
ITPR2	0.58	0.23		0.66	0.49	inositol 1,4,5-triphosphate receptor 2
PITRM1	0.69	0.39	0.39		0.49	pitrilysin metallopeptidase 1
QTRT1	0.91	0.32	0.24		0.49	queuine tRNA-ribosyltransferase catalytic subunit 1
GRPEL2	0.60	0.19	0.66		0.48	GrpE-like 2, mitochondrial
GTF2H1	0.85		0.40	0.20	0.48	general transcription factor II H, polypeptide 1
EIF2S2	0.57	0.42	0.45		0.48	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 2 (beta)
IDH2		0.42	0.51	0.50	0.48	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial
TWISTNB	0.67	0.42	0.33		0.47	RNA Polymerase I Subunit F
FDFT1	0.38	0.33	0.70		0.47	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1
RPS7	0.73	0.43	0.24		0.47	ribosomal protein S7
ASAH1	0.61	0.49	0.30		0.47	N-acylsphingosine amidohydrolase 1
PPIE	1.00	0.15	0.24		0.46	peptidylprolyl isomerase E (cyclophilin E)
NAT10	0.89	0.24	0.25		0.46	N-acetyltransferase 10
PPP1R14B		0.63	0.42	0.31	0.45	protein phosphatase 1, regulatory inhibitor subunit 14B
EIF3E	0.67	0.39	0.30		0.45	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit E
RPL14	0.47	0.52		0.35	0.45	ribosomal protein L14
EIF4EBP1	0.53		0.23	0.57	0.44	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1
CDC25A		0.48	0.34	0.48	0.43	cell division cycle 25A
RUVBL2	0.73	0.17		0.39	0.43	RuvB-like protein 2
ANAPC11	0.73		0.18	0.38	0.43	anaphase promoting complex subunit 11
CRLS1		0.32	0.56	0.39	0.43	cardiolipin synthase 1

RNF126	0.35		0.30	0.62	0.42	ring finger protein 126
ABCB4		0.44	0.39	0.42	0.42	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4
RPL24	0.67		0.36	0.21	0.41	ribosomal protein L24
CHCHD5	0.64	0.25	0.32		0.40	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 5
LYRM7		0.42	0.21	0.59	0.40	LYR motif containing 7
CEBPG	0.70		0.28	0.23	0.40	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma
JOSD1		0.52	0.48	0.21	0.40	Josephin domain containing 1
NOC2L	0.74	0.22	0.22		0.39	NOC2 like nucleolar associated transcriptional repressor
EIF4A1	0.55	0.36		0.27	0.39	eukaryotic translation initiation factor 4A1
HSD17B13	0.64	0.16	0.35		0.38	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 13
RAN	0.51	0.23	0.40		0.38	RAN, member RAS oncogene family
CCT5	0.59	0.31	0.23		0.38	chaperonin containing Tcp1, subunit 5 (epsilon)
ALDOA	0.43	0.31	0.39		0.38	aldolase A, fructose-bisphosphate
FTL1	0.36		0.34	0.39	0.36	ferritin light polypeptide 1
G3BP1	0.50	0.20		0.38	0.36	GTPase activating protein (SH3 domain) binding protein 1
POLR2E	0.38	0.36	0.32		0.35	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide E
CHCHD10		0.25	0.37	0.43	0.35	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 10
ADPGK	0.66	0.16		0.22	0.35	ADP-dependent glucokinase
MIF	0.44	0.26	0.33		0.34	macrophage migration inhibitory factor (glycosylation-inhibiting factor)
TTC1	0.39	0.21	0.39		0.33	tetratricopeptide repeat domain 1
AKR1A1	0.52	0.20	0.25		0.32	aldo-keto reductase family 1, member A1 (aldehyde reductase)
COG6	0.62	0.16		0.17	0.32	component of oligomeric golgi complex 6
SLC6A12	0.47	0.23	0.26		0.32	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, betaine/GABA), member 12
SURF2	0.40	0.17	0.32		0.30	surfeit gene 2
STRAP	0.43	0.24	0.21		0.29	serine/threonine kinase receptor associated protein
AP2M1		0.18	0.33	0.22	0.25	adaptor-related protein complex 2, mu 1 subunit
NOP14		0.29	0.20	0.16	0.22	NOP14 nucleolar protein
GNS	-0.42		-0.19	-0.22	-0.28	glucosamine (N-acetyl)-6-sulfatase
MGST1		-0.08	-0.26	-0.51	-0.28	microsomal glutathione S-transferase 1
GM2A		-0.28	-0.32	-0.24	-0.28	GM2 ganglioside activator protein
OTC		-0.29	-0.38	-0.33	-0.33	ornithine transcarbamylase

SDC4	-0.45	-0.30	-0.25		-0.33	syndecan 4
PARVA	-0.56	-0.22		-0.22	-0.33	parvin, alpha
COMMD1	-0.60	-0.20		-0.22	-0.34	COMM domain containing 1
PRPSAP2	-0.48	-0.31	-0.25		-0.34	phosphoribosyl pyrophosphate synthetase-associated protein 2
GAMT	-0.43	-0.22		-0.41	-0.35	guanidinoacetate methyltransferase
UROC1	-0.51		-0.25	-0.33	-0.36	urocanase domain containing 1
DAGLB	-0.37		-0.44	-0.31	-0.37	diacylglycerol lipase, beta
FGGY	-0.50	-0.30		-0.33	-0.38	FGGY carbohydrate kinase domain containing
SMARCD2	-0.62	-0.10	-0.42		-0.38	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily d, member 2
ROMO1	-0.55		-0.25	-0.35	-0.38	reactive oxygen species modulator 1
ARG1	-0.57	-0.25		-0.34	-0.39	arginase, liver
CYP2C23	-0.71	-0.16	-0.31		-0.39	cytochrome P450, family 2, subfamily c, polypeptide 23
NFATC1	-0.36		-0.15	-0.67	-0.39	nuclear factor of activated T cells, cytoplasmic, calcineurin dependent 1
SLC9A3R1		-0.43	-0.43	-0.35	-0.40	sodium-hydrogen antiporter 3 regulator 1
PERP	-0.59	-0.27	-0.36		-0.41	PERP, TP53 apoptosis effector
PRR14	-0.83		-0.16	-0.24	-0.41	proline rich 14
COL14A1	-0.48	-0.36		-0.42	-0.42	collagen, type XIV, alpha 1
RDH7	-0.58	-0.41		-0.27	-0.42	retinol dehydrogenase 7
LDHD		-0.18	-0.53	-0.55	-0.42	lactate dehydrogenase D
ATL2	-0.55		-0.35	-0.36	-0.42	atlastin GTPase 2
C1R	-0.71	-0.20	-0.36		-0.42	complement component 1, r subcomponent A
SERPING1	-0.82	-0.32		-0.13	-0.43	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade G, member 1
DOCK8	-0.62	-0.17	-0.50		-0.43	dedicator of cytokinesis 8
GULO	-0.45	-0.39	-0.46		-0.43	gulonolactone (L-) oxidase
RGN		-0.31	-0.49	-0.52	-0.44	regucalcin
EPHA1	-0.80	-0.26		-0.28	-0.45	Eph receptor A1
MASP2	-0.87		-0.23	-0.26	-0.45	mannan-binding lectin serine peptidase 2
FADS1	-0.50	-0.27		-0.58	-0.45	fatty acid desaturase 1
EDEM1	-0.83		-0.34	-0.21	-0.46	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1
C4BP	-0.38		-0.40	-0.60	-0.46	complement component 4 binding protein
HAAO	-0.52		-0.34	-0.52	-0.46	3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase
TWSG1	-0.88	-0.22		-0.30	-0.47	twisted gastrulation BMP signaling modulator 1
EBPL	-0.80	-0.18		-0.43	-0.47	emopamil binding protein-like

SERPINA11	-0.73	-0.27	-0.42		-0.47	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 11
APON		-0.40	-0.66	-0.38	-0.48	apolipoprotein N
MYLK	-0.58		-0.60	-0.27	-0.48	myosin, light polypeptide kinase
IL13RA1	-0.82	-0.35		-0.30	-0.49	interleukin 13 receptor, alpha 1
PYGL	-0.88	-0.24		-0.35	-0.49	liver glycogen phosphorylase
SUB1	-1.01	-0.25		-0.23	-0.50	SUB1 homolog, transcriptional regulator
GHR		-0.23	-0.66	-0.61	-0.50	growth hormone receptor
KHK	-0.62	-0.20		-0.68	-0.50	ketohehexokinase
PIGR	-0.42		-0.60	-0.49	-0.50	polymeric immunoglobulin receptor
SDR9C7	-0.42	-0.45	-0.65		-0.51	4short chain dehydrogenase/reductase family 9C, member 7
TTC6	-0.71	-0.59	-0.29		-0.53	tetratricopeptide repeat domain 6
RECK		-0.14	-0.72	-0.73	-0.53	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
GCGR	-0.84	-0.35		-0.42	-0.53	glucagon receptor
TSHZ1	-0.98		-0.30	-0.38	-0.55	teashirt zinc finger family member 1
IGF1	-0.65	-0.48		-0.60	-0.57	insulin-like growth factor 1
ZCCHC6	-1.01	-0.45	-0.27		-0.58	terminal uridylyltransferase 7
STAT1	-0.88	-0.37	-0.49		-0.58	signal transducer and activator of transcription 1
CLU	-0.91	-0.41	-0.43		-0.58	clusterin
HTRA1	-0.80	-0.38		-0.57	-0.59	HtrA serine peptidase 1
RDH5	-0.56		-0.41	-0.83	-0.60	retinol dehydrogenase 5
PGPEP1	-0.93	-0.47		-0.46	-0.62	pyroglutamyl-peptidase I
GCHFR	-0.98	-0.52		-0.36	-0.62	GTP cyclohydrolase I feedback regulator
HAO1		-0.28	-1.16	-0.43	-0.62	hydroxyacid oxidase 1, liver
FABP2	-0.47		-0.61	-0.81	-0.63	fatty acid binding protein 2, intestinal
ARHGAP24	-1.14	-0.37	-0.41		-0.64	Rho GTPase activating protein 24
GALNT4	-1.26		-0.25	-0.42	-0.64	polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4
APOA5	-1.23	-0.33		-0.39	-0.65	apolipoprotein A-V
WIPI1	-1.27		-0.38	-0.34	-0.67	WD repeat domain, phosphoinositide interacting 1
CBLN3	-0.72	-0.23		-1.06	-0.67	cerebellin 3 precursor protein
ACBD4	-1.35	-0.37		-0.40	-0.71	acyl-Coenzyme A binding domain containing 4
EBP	-1.52	-0.30		-0.32	-0.71	phenylalkylamine Ca ²⁺ antagonist (emopamil) binding protein
TCEA3	-1.14	-0.60		-0.40	-0.71	transcription elongation factor A (SII), 3

PYROXD2	-0.87		-0.72	-0.57	-0.72	pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase domain 2
ELOVL5	-0.57	-0.63		-0.99	-0.73	ELOVL family member 5, elongation of long chain fatty acids (yeast)
SREBF1	-0.74	-0.48	-0.98		-0.73	sterol regulatory element binding transcription factor 1
CARHSP1	-1.14	-0.63	-0.43		-0.73	calcium regulated heat stable protein 1
ISG15	-1.19	-0.76	-0.26		-0.74	ISG15 ubiquitin-like modifier
ACOX3	-1.81	-0.18	-0.31		-0.77	acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl
PTPRF	-1.45	-0.54	-0.31		-0.77	protein tyrosine phosphatase receptor type F
ASRGL1	-0.92	-0.43		-0.96	-0.77	asparaginase like 1
H1FO	-1.10	-0.90	-0.38		-0.80	H1.0 linker histone
CXCL12	-1.24	-0.97	-0.24		-0.81	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
PDK1	-1.20	-0.54		-0.72	-0.82	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1
LIPC	-1.35	-0.88	-0.44		-0.89	lipase, hepatic
SLC43A1		-0.44	-0.88	-1.52	-0.95	solute carrier family 43, member 1
BMF	-2.15	-0.43	-0.30		-0.96	BCL2 modifying factor
OMD		-1.06	-0.63	-1.24	-0.98	osteomodulin
LIX1L	-2.20	-0.49	-0.24		-0.98	Lix1-like
PDZRN3	-2.31	-0.32	-0.35		-0.99	PDZ domain containing RING finger 3
HYAL1	-1.67	-0.94	-0.41		-1.01	hyaluronoglucosaminidase 1
ABHD1	-2.02	-0.67		-0.38	-1.02	abhydrolase domain containing 1
HSPB6	-2.11	-0.48	-0.49		-1.02	heat shock protein, alpha-crystallin-related, B6
RARRES1		-0.50	-1.41	-1.23	-1.05	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 1
NR1D1	-2.06	-0.57		-0.62	-1.08	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1
ALAS2	-1.52		-1.18	-0.71	-1.14	aminolevulinic acid synthase 2, erythroid
SLC22A7		-0.29	-1.30	-1.92	-1.17	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 7
MAFB	-1.38		-1.14	-1.00	-1.18	MAF bZIP transcription factor B
GRIA3	-1.47		-0.38	-2.08	-1.31	glutamate receptor, ionotropic, AMPA3 (alpha 3)
FGF1	-2.34	-0.73	-0.86		-1.31	fibroblast growth factor 1
NTF3	-3.09	-0.76	-0.20		-1.35	neurotrophin 3
APOA4	-2.10		-0.72	-1.46	-1.43	apolipoprotein A-IV
TSC22D1	-2.22	-1.57	-0.57		-1.45	TSC22 domain family, member 1
ACACB	-2.26	-1.13		-1.19	-1.52	acetyl-Coenzyme A carboxylase beta
AACS	-3.70	-0.17		-0.82	-1.56	acetoacetyl-CoA synthetase
ACLY	-4.11	-1.05		-0.75	-1.97	ATP citrate lyase
OAT	-4.17	-1.88		-0.39	-2.15	ornithine aminotransferase

CYP4A12A	-3.83		-1.95	-0.87	-2.22	cytochrome P450, family 4, subfamily a, polypeptide 12a
PTK6	-3.74	-0.50		-2.48	-2.24	PTK6 protein tyrosine kinase 6
SCD1	-6.01	-3.78		-1.95	-3.92	stearoyl-CoA desaturase

Tabelle 14: Veränderungen der Metaboliten in verschiedenen Geweben durch Methionin-Restriktion. Fettgedruckte Werte deuten Signifikanz an.

		Leber	Fettgewebe	Muskel	Serum
		FC	FC	FC	FC
Glykolytische Intermediate	Glucose	0.80	0.72	1.14	0.79
	Glucose-6P	—	1.02	4.10	—
	3P-Glycerat	0.69	1.35	1.20	—
	PEP	0.65	2.80	1.16	—
	Pyruvat	0.43	—	1.11	0.24
	Lactat	0.70	0.88	0.96	0.89
	L/P Verhältnis	1.63	—	0.86	3.71
Zitratzyklus-Intermediate	Citrat	—	0.58	0.53	1.26
	Succinat	1.61	0.72	—	0.90
	Fumarat	0.88	1.29	1.05	0.78
	Malat	0.89	1.13	1.44	0.96
Pentosephosphat-Weg Intermediate	6P-Gluconat	1.88	1.42	—	—
Fettsäuren	Palmitat	0.85	1.38	0.93	1.19
	Palmitoleat	0.52	2.37	0.91	1.46
	Stearat	0.88	—	1.06	1.10
	Oleat	0.73	2.60	0.76	1.17
	Linoleat	1.01	1.57	0.83	1.29
	Linolenat	1.87	1.47	0.75	1.52
	Arachidonat	1.03	1.40	0.71	0.97
	Docosahexaenoat	0.80	2.94	1.78	1.13
Ketonkörper	β-Hydroxybutyrat	1.17	—	3.22	2.44

Anhang "Nutzung KI-Tools":

KI-Tool	Genutzt für	Warum	Wann
DeepL Write	Neuformulierung der Textentwürfe	bessere Lesbarkeit	Über die gesamte Arbeit hinweg