

## Abstract

The *m*-AAA protease, an ATP-dependent proteolytic complex in the inner mitochondrial membrane, controls mitochondrial protein quality and, acting as a processing enzyme, regulates mitochondrial protein synthesis in yeast. Mammalian *m*-AAA proteases assemble into several isoenzymes with variable subunit composition. In human, two different subunits paraplegin and AFG3L2, are expressed in a tissue-specific manner. Loss of function mutations in the *m*-AAA protease subunit paraplegin cause the neurodegenerative disease hereditary spastic paraplegia (HSP), which is mainly characterized by the axonal degradation of neurons in the cortical tract. AFG3L2 mutations on the other hand cause spinocerebellar ataxia 28 (SCA28), which is a genetically heterogeneous neurological disorder characterized by cerebellar dysfunction mostly due to Purkinje cell degeneration.

Using a yeast complementation assay, disease-causing mutations in the *SPG7* or *AFG3L2* gene could be identified and in addition their consequences on *m*-AAA protease activities characterized. Additionally a mutation in the *AFG3L2* gene could be identified displaying a reduced complex formation with paraplegin resulting in a new disorder, combining the lack of AFG3L2 homo-oligomeric activity in cerebellar cells, creating an SCA28-like phenotype and the lack of paraplegin activity in motor cells contributing to SPG7-like myotonic symptoms.

The *m*-AAA protease exerts essential housekeeping functions within mitochondria. The mitochondrial ribosomal protein MrpL32 is processed by the *m*-AAA protease, after which it associates with the 54S preassembled ribosomal subunit. Analyzing MrpL32 maturation reveals that a stable folded domain at the C-terminus of the protein determines the processing site of MrpL32. This domain is formed by four conserved cysteine residue, which coordinate a metal ion to form the folded domain. This mechanism of MrpL32 folding and processing is conserved in yeast and mammals. The folding state of MrpL32 is altered in the presence of induced oxidative stress in yeast cells, resulting in a higher turnover of MrpL32 by the *m*-AAA protease. These findings reveals a new processing mechanism in mitochondria and suggest a novel regulatory mechanism of mitochondrial translation under oxidative stress.

The regulatory role of the *m*-AAA protease for mitochondrial ribosome assembly and mitochondrial translation may therefore help to understand why the loss of paraplegin or AFG3L2 results in hereditary spastic paraplegia or spinocerebellar ataxia 28, respectively.

## Zusammenfassung

Die *m*-AAA Protease, ein ATP-abhängiger proteolytischer Komplex in der inneren mitochondrialen Membran, kontrolliert in Hefe den Abbau fehlgefalteter Proteine und reguliert als Prozessierungsenzym die mitochondriale Proteinsynthese. Die *m*-AAA Proteasen im Menschen assemblieren in verschiedene Isoenzyme, die aus unterschiedlichen Untereinheiten bestehen. Homo-oligomere AFG3L2-Komplexe sowie hetero-oligomere Komplexe aus AFG3L2 und Paraplegin konnten identifiziert werden. Mutationen in der *m*-AAA Protease Untereinheit Paraplegin führen zu hereditärer spastischer Paraplegie (HSP), einer neurodegenerativen Krankheit, die durch eine zellspezifische axonale Degeneration gekennzeichnet ist. Dagegen führen Mutationen in der AFG3L2 Untereinheit zu spinocerebellären Ataxie 28 (SCA28), was zu einem Verlust der Purkinje-Zellen, der größten Neuronen des Kleinhirns führt. Die molekulare Grundlage dieser neuronenspezifischen Phänotypen sowie die Funktionen der *m*-AAA Proteasen im Menschen im Allgemeinen sind unklar und wurden in dieser Arbeit untersucht.

Hierzu wurde Auswirkungen von Mutationen in den krankheitsauslösenden Genen *AFG3L2* und *SPG7* auf die Funktion der *m*-AAA Protease in einem Hefekomplementations System untersucht. Mit Hilfe dieses Komplementationsystems konnten neue krankheitsauslösende Mutationen in den *m*-AAA Protease Untereinheiten bestimmt werden. Zusätzlich konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass bestimmte Mutationen in *AFG3L2* die Komplexassemblierung zwischen den beiden *m*-AAA Protease Untereinheiten stört. Diese Erkenntnisse könnten die unterschiedlichen klinischen Effekte erklären.

Das ribosomale Protein MrpL32 wird in Abhängigkeit von der *m*-AAA Protease am N-Terminus prozessiert. Die N-terminale Reifung führt dazu, dass MrpL32 in direkter Nachbarschaft zur inneren Mitochondrienmembran in fast vollständig assemblierte Ribosomen integriert werden kann. Dieser Vorgang ist essentiell für die Funktion der mitochondrialen Ribosomen und somit der Translation der mitochondrial kodierten Proteine. Der Ausfall der Prozessierung von MrpL32 in Abwesenheit der *m*-AAA Protease führt daher, in Hefezellen, zum Verlust der Atmungskompetenz.

Die Analyse der Prozessierung von MrpL32 zeigt, dass eine gefaltete Domäne am C-terminalen Ende von MrpL32 für die Prozessierung von entscheidender Bedeutung ist. Diese gefaltete Domäne wird von vier Cysteinen gebildet, die höchst wahrscheinlich ein Metall- Molekül in ihrem Zentrum koordinieren und dadurch die Prozessierungsstelle

bestimmen, da die gefaltete Domäne der Proteolyse durch die *m*-AAA Protease entgegen wirkt. Weitere Experimente lassen darauf schließen, dass diese Art der Faltung und Prozessierung von MrpL32 als Sensor für oxidativen Stress in der Zelle dienen kann und somit die Translation in den Mitochondrien reguliert wird. Ein besseres Verständnis der *m*-AAA Protease, ihrer Substrate und der Assemblierung der Ribosomen kann dabei helfen, die zellulären Grundlagen der hereditären spastischen Paraplegie und der spinozerebellären Ataxie beim Menschen besser zu verstehen.