

Abstract

The *m*-AAA protease is a conserved AAA (ATPase associated with a variety of cellular activities) protease, localized to the mitochondrial inner membrane (IM). Quality control of proteins in the IM is mediated by the *m*-AAA protease as it is degrading misfolded or non-assembled proteins. In addition to its role in protein turnover, the *m*-AAA protease acts as a processing enzyme, responsible for the maturation of the mitochondrial ribosomal protein MrpL32 and thereby regulates mitochondrial translation. In yeast, the *m*-AAA protease is a hetero-oligomeric ring-complex, build of alternating Yta10 and Yta12 subunits, whereas in human mitochondria homo-oligomeric complexes of AFG3L2 exist, as well as hetero-oligomeric complexes of AFG3L2 and paraplegin. Energy derived from ATP hydrolysis is used by the protease to unfold substrates and for their translocation towards the proteolytic chamber. ATP hydrolysis is coordinated between Yta10 and Yta12 subunits in yeast to ensure optimal force generation.

In order to analyze the evolutionary conservation of coordinated ATP hydrolysis, human *m*-AAA protease variants, harboring mutations in the ATPase domain were expressed in yeast and analyzed *in vivo* and *in vitro*. Coordination of ATP hydrolysis was found to be evolutionary conserved, as results obtained with human *m*-AAA protease complexes were similar to the previous observations on the yeast *m*-AAA protease.

A mutant *m*-AAA protease subunit (Yta12^{E416K}), which impairs the coordination of ATP hydrolysis within the ring-complex, causes substrate specific deficiencies. Complexes harboring Yta12^{E416K} mediate maturation of MrpL32 but lack the ability to dislocate proteins from the membrane. Use of Yta12^{E416K} allowed the analysis of *m*-AAA protease functions, avoiding secondary effects caused by impaired MrpL32 maturation. In combination with a synthetic genetic array, it was possible to identify novel pathways connected to the *m*-AAA protease. In the absence of cardiolipin in mitochondria, the *m*-AAA protease becomes essential for mitochondrial biogenesis and cell viability. Purification of native *m*-AAA protease complexes in combination with quantitative mass spectrometry allowed the identification of several novel quality control substrates, as wells as the identification of a so far unknown component of the *m*-AAA protease/prohibitin supercomplex. Furthermore, the results obtained indicate

the possibility that proteolytic control of intron splicing in *COB* and *COXI* mRNAs by the *m*-AAA protease has regulatory function on mitochondrial translation.

Zusammenfassung

Die *m*-AAA Protease, in der inneren Mitochondrienmembran, ist eine evolutionär konservierte Protease aus der Familie der AAA Proteasen (*ATPase associated with a variety of cellular activities*). Durch den Abbau fehlgefalteter sowie nicht assemblierter Proteine trägt die *m*-AAA Protease zur Qualitätskontrolle von Proteinen in der inneren Mitochondrienmembranen bei. Zusätzlich zum Proteinabbau vermittelt die *m*-AAA Protease die Reifung von MrpL32, einer Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms. Durch proteolytische Prozessierung von MrpL32 ist die *m*-AAA Protease in der Lage, den Vorgang der mitochondrialen Translation zu regulieren. Die *m*-AAA Protease in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein hetero-oligomerer Komplex aus alternierend angeordneten Yta10 und Yta12 Untereinheiten. Im Menschen existieren jedoch sowohl homo-oligomere *m*-AAA Protease-Komplexe, bestehend aus der Untereinheit AFG3L2, sowie hetero-oligomere Komplexe aus den Untereinheiten AFG3L2 und Paraplegin. Die *m*-AAA Protease nutzt aus der Hydrolyse von ATP gewonnene Energie zum entfalten von Substratproteinen, sowie zu deren Translokation in Richtung der proteolytischen Domäne. In Hefe wird die Hydrolyse von ATP zwischen den beiden Untereinheiten Yta10 und Yta12 koordiniert um eine optimale Kraftausbeute zu erlangen.

Um zu analysieren, ob die Koordinierung der ATP-Hydrolyse ein evolutionär konservierter Prozess ist, wurden Untereinheiten der menschlichen *m*-AAA Protease, welche verschiedene Mutationen trugen, in Hefe exprimiert und sowohl *in vivo* als auch *in vitro* analysiert. Die resultierenden Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die koordinierte ATP-Hydrolyse evolutionär konserviert ist.

Eine Mutation in Yta12, welche die Koordinierung der ATP-Hydrolyse beeinträchtigt, verursacht substratspezifische Abbauprobleme. Diese Mutante ist in der Lage MrpL32 zu prozessieren, kann aber Membranproteine nicht mehr abbauen. Mit Hilfe dieser Mutante können *m*-AAA Protease abhängige Prozesse analysiert werden ohne durch fehlende MrpL32-Prozessierung verursachte Sekundäreffekte. In Kombination mit einem genetischen *Screen*, war es möglich, mitochondriale Prozesse zu identifizieren, die mit der proteolytischen Aktivität der *m*-AAA-Protease verknüpft sind. In Abwesenheit der mitochondrienspezifischen Lipid-Spezies Cardiolipin ist die proteolytische Aktivität der *m*-AAA Protease essentiell für das Überleben der

Hefezellen. Die Aufreinigung nativer *m*-AAA Protease Komplexe in Verbindung mit quantitativer Massenspektrometrie ermöglichte die Identifizierung von bisher unbekanntem Qualitätskontrollsubstraten. Zusätzlich konnte ein Protein identifiziert werden, welches Teil des *m*-AAA Protease/Prohibitin Superkomplexes ist. Des Weiteren deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass die proteolytische Kontrolle der Reifung von Cox1 und COB mRNAs durch die *m*-AAA Protease einen regulatorischen Einfluß auf die mitochondriale Translation haben könnte.