

Neuronal and astroglial autonomous role of AFG3L2 in neurodegeneration

Abstract

AFG3L2 is a subunit of the *m*-AAA metalloprotease, which functions in the quality control of mitochondria by degrading misfolded proteins of the inner membrane and mediates proteolytic maturation of specific substrates. The human *m*-AAA protease is a high molecular weight hexameric complex, formed by homo-oligomers of AFG3L2 or by hetero-oligomers of AFG3L2 and the homologous protein paraplegin. Heterozygous mutations in *AFG3L2* have been linked to dominant hereditary ataxia SCA28, characterized by degeneration of the cerebellum. Homozygous mutation in *AFG3L2* cause Spastic ataxia neuropathy syndrome.

Deletion of *Afg3l2* in the mouse leads to a very severe phenotype, characterized by defects in axonal development, loss of large-caliber myelinated fibers, and widespread astrogliosis, leading to death within the first three weeks of age. This limits our analysis of the role of AFG3L2 for axonal maintenance in the adult brain, and complicates the dissection of how neuronal-glia interactions may contribute to pathogenesis of neuronal degeneration. To overcome these drawbacks, we used a conditional *Afg3l2* mouse model, allowing a temporal and spatial controlled deletion of the allele. By crossing this mouse model to transgenic mouse lines expressing the Cre recombinase under specific promoters, we generated murine lines in which *Afg3l2* is selectively deleted in neurons and astrocytes.

We have crossed *Afg3l2*^{flox/flox} mice with a transgenic line expressing the Cre recombinase under the Purkinje cells L7 promoter. These mice start to display an abnormal motor phenotype in the cage at about 8 weeks of age, consistent with a remarkable loss of Purkinje cells associated with massive astrogliosis in the molecular layer, indicating that AFG3L2 function is required for survival of Purkinje neurons. Analysis at 4 weeks showed early mitochondrial fragmentation and respiratory dysfunction. By using the constitutive knock-out mouse model, we proved there is impaired mitochondrial synthesis in the absence of *Afg3l2*, thereby explaining the respiration phenotype.

The astrocyte-specific knock-out mice for *Afg3l2* show a very mild phenotype by comparison, perhaps by turning to glycolysis or due to high levels of AFG3L1, a protein absent in human

but present in mice that is part of the *m*-AAA protease and can therefore compensate. The mice develop a much stronger phenotype when AFG3L1 is also absent, confirming the importance of the *m*-AAA protease for this cell type.

Zusammenfassung

AFG3L2 ist eine Untereinheit der *m*-AAA Metalloprotease, welche falsch gefaltete Proteine abbaut und die Reifung von speziellen Substraten vermittelt und somit eine wichtige Rolle in der Qualitätskontrolle von Mitochondrien spielt. Die humane *m*-AAA protease besteht entweder aus homo-oligomeren AFG3L2 Untereinheiten oder aus hetero-oligomeren AFG3L2 und paraplegin Untereinheiten, welche hochmolekulare hexamere Komplexe bilden. Heterozygote Mutationen in *AFG3L2* stehen im Zusammenhang mit dominanter vererbbarer Ataxie SCA28, welche zur Degeneration des Cerebellums führen. Homozygote Mutationen in *AFG3L2* sind bekannt das Spastische Ataxie Neuropathie Syndrome auszulösen.

Das Entfernen des *Afg3l2* Gens in der Maus hat einen schwerwiegenden Phänotyp, welcher sich durch Defekte in der axonalen Entwicklung, Verlust der großkalibrige myelinisierten Fasern und stark verbreitete Astroglieose auszeichnet und zum Tode innerhalb von 3 Wochen führt. Dies schränkt uns bei der Untersuchung der Funktion die AFG3L2 in der Instandhaltung des erwachsenen Gehirns haben könnte stark ein und führt dazu, dass die Erörterung wie neuronale Gliazellen zur Pathogenese von neuronaler Degeneration beitragen erheblich erschwert wird. Um diese Hindernisse zu überwinden haben wir ein konditionelles *Afg3l2* Mausmodell benutzt, welches uns erlaubt den Zeitpunkt und das Gebiet zu bestimmen in dem das *AFG3L2* Gen entfernt werden soll. Durch Kreuzung mit einer transgenen Mauslinie welche das Cre Rekombinase Gen unter einem spezifischen Promoter expremiert, haben wir eine Mauslinien generiert welcher das *Afg3l2* Gen spezifisch in Neuronen und Astrozyten fehlt.

Wir haben die *Afg3l2*^{flox/flox} Mäuse mit einer transgenen Mauslinie gekreuzt welche spezifisch die Cre Rekombinase unter der Kontrolle des L7 Promoter von Purkinjezellen expremiert. Im Alter von 8 Wochen zeigen die Mäuse einen abnormalen motorischen Phänotyp, was mit einem starken Verlust von Purkinjezellen und starker Astroglieose einhergeht. Diese Beobachtungen zeigen, dass AFG3L2 essentiell für das Überleben von Purkinjezellen ist. Analysen nach 4 Wochen zeigten bereits frühe mitochondriale Fragmentierung und respiratorische Fehlfunktion. Mit Hilfe des konstitutiven knock-out Mausmodells konnten wir zeigen, dass der Verlust des *Afg3l2* Gens dazuführt, dass die Synthese von neuen Mitochondrien beeinträchtigt ist und dies die Ursache für respiratorische Fehlfunktion ist.

Knock-out Mäuse in denen *Afg3l2* spezifisch in Astrozyten entfernt wurde, zeigen einen sehr milden Phänotyp. Gründe dafür könnten erhöhte Glycolyse sein oder aber kompensatorische Effekt von dem AFG3L1 Protein, welches in Mauszellen einen Teil der *m*-AAA Protease bildet aber in humanen Zellen nicht vorkommt. Mäuse denen das AFG3L1 Protein fehlt zeigen einen deutlicheren Phänotyp in Astrozyten, was die Bedeutsamkeit der *m*-AAA Protease für diese Zellen verdeutlicht.