

Abstract

The *i*-AAA protease Yme1 is a highly conserved ATP-dependent AAA protease residing in the inner mitochondrial membrane (IM). This protease is part of the IM protein quality control machinery, which mediates turnover of damaged proteins and is crucial for cell survival. In yeast as in mammals, deficiency of the *i*-AAA protease is associated with pleiotropic phenotypes that are so far not understood. In fact, few functions, proteolytic substrates and interaction partners of the *i*-AAA protease are known. To unravel the molecular functions of the *i*-AAA protease, we identified its interaction partners in the model organism *Saccharomyces cerevisiae*. A biochemical approach was chosen, exploiting affinity purification of Yme1, followed by identification of interactors by mass spectrometry. In order to stabilize the binding between the protease and its substrates, thus facilitating their identification, a substrate-trap variant of Yme1 was used that carries a point mutation in the proteolytic center. Robust identification of the adapter proteins Mgr1 and Mgr3, facilitating substrate binding to Yme1, and proteolytic substrates such as the lipid transport proteins Ups1 and Ups2 validated our experimental approach. Moreover, novel interactors and substrates could also be found. In particular, Mdm32 emerged as a highly enriched protein, whose levels were strongly increased upon deletion of *YME1*. Specific binding to the substrate-trap variant of Yme1 together with the abrogated rapid turnover in the absence of the protease showed that Mdm32 is a new substrate of the *i*-AAA protease. Mdm32 has been reported to impact on mitochondrial morphology and motility as well as mitochondrial DNA and the mitochondrial specific phospholipid cardiolipin (CL), but the molecular function remained unknown. Our comprehensive phospholipid analysis of Δ *mdm32* cells revealed increased phosphatidylglycerol (PG) levels. PG is converted by the cardiolipin synthase Crd1 to CL, whose levels were concomitantly decreased. Further analysis revealed that upon *MDM32* deletion Crd1 protein levels decreased due to reduced mRNA levels and reduced protein stability. Consistently, *YME1* deletion, resulting in higher Mdm32 levels, led to increased levels of Crd1 and its stabilization. Therefore, Yme1 regulates both Mdm32 and Crd1 protein levels. Furthermore, Mdm32 and Crd1 formed interdependent high molecular weight complexes, suggesting they might physically interact. Elevated levels of CRLS1, the mouse *CRD1* homolog, in *Yme11*-deficient MEFs suggest functional conservation of this regulation to mammals.

In conclusion, this work identified Mdm32 to be a novel substrate of Yme1 that is involved in mitochondrial cardiolipin biosynthesis. Together with the turnover of the lipid transfer proteins Ups1 and Ups2, it demonstrates a central role of *i*-AAA protease-mediated proteolysis in mitochondrial phospholipid metabolism.

Zusammenfassung

Die *i*-AAA Protease Yme1 ist eine hochkonservierte ATP-abhängige AAA (ATPase associated with a variety of cellular activities) Protease der mitochondrialen Innenmembran (IM). Diese Protease ist der Teil einer mitochondrialen Maschinerie zur Qualitätskontrolle von Proteinen, die fehlgefaltete, sowie nicht assemblierte Proteine abbaut und wichtig für das Überleben der Zelle ist. Sowohl in Hefe als auch in Säugern führt der Verlust der *i*-AAA Protease zu pleiotrophen Phänotypen, die bisher nicht erklärt werden können. Nur wenige Funktionen, proteolytische Substrate und Interaktionspartner sind bisher bekannt. Um die molekularen Funktionen der Protease heraus zu finden, identifizierten wir seine Interaktoren im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*. Wir verwendeten einen biochemischen Ansatz, bei dem die Affinitätsaufreinigung dieses *i*-AAA Komplexes unter nativen Bedingungen uns erlaubte neue Interaktoren und Substrate mittels Massenspektrometrie zu identifizieren. Um die Bindung zwischen Protease und seinen Substraten zu stabilisieren und dadurch ihre Identifizierung zu ermöglichen, wurde eine Variante von YME1 verwendet, die eine Punktmutation im proteolytischen Zentrum aufweist und so als Substratfalle dient. Die robuste Identifizierung der Adapterproteine Mgr1 und Mgr3, die Substratbindung an Yme1 vermitteln, und bekannter Substrate wie die Lipidtransportproteine Ups1 und Ups2 bestätigten unseren experimentellen Ansatz. Weiterhin wurden neue Interaktoren und Substrate gefunden. MDM32 stach als hochangereichertes Protein heraus, dessen Level stark anstieg, wenn YME1 deletiert wurde. Die spezifische Bindung an die Substratfallenvariante von Yme1 zusammen mit der Inhibierung des ansonsten schnellen Abbaus des Proteins in Abwesenheit der Protease bestätigte, dass Mdm32 ein neues regulatorisches Substrat der *i*-AAA Protease ist. Mdm32 beeinflusst die mitochondriale Morphologie und Beweglichkeit, als auch mitochondriale DNA und das mitochondrien-spezifische Phospholipid Cardiolipin (CL), aber seine molekulare Funktion ist nicht bekannt. Unsere umfassende Phospholipidanalyse des *MDM32* Deletionsstamms zeigte erhöhte Phosphatidylglycerol (PG) Level. PG wird von der Cardiolipinsynthase Crd1 zu CL umgesetzt, dessen Level gleichzeitig verringert waren. Weitere Analysen zeigten, dass die Deletion von *MDM32* die Proteinlevel von Crd1 reduzierten anhand geringerer mRNA Level und verminderter Proteinstabilität. In Übereinstimmung damit führte die Deletion von *YME1*, welche höhere Mdm32 Level zu Folge hat, zur Erhöhung der Crd1 Level und dessen Stabilisierung. Daher reguliert Yme1 sowohl Mdm32 als auch Crd1 Proteinlevel. Weiterhin bildeten Mdm32 und Crd1 voneinander abhängige hochmolekulare Komplexe, was darauf hindeutet, dass sie direkt interagieren. Die Erhöhung der CRLS1 Level, welches das Homolog von Crd1 in Mäusen darstellt, in *Yme1*-defizienten embryonalen Fibroblasten der Maus deuten auf einen Konservierung dieser Funktion in Säugern hin.

Diese Arbeit enthüllt Mdm32 als neues regulatorisches Substrat von Yme1, welches an der mitochondrialen Cardiolipinbiosynthese beteiligt ist. Zusammen mit dem Abbau von Ups1 und Ups2, zeigt dies die zentrale Rolle der *i*-AAA Protease-vermittelten Proteolyse für den mitochondrialen Phospholipidmetabolismus.