

Abstract

Mitochondria are essential organelles of eukaryotic cells and to ensure proper function mitochondrial proteases constantly regulate the mitochondrial proteome. Mutations in *SPG7* (encoding the Paraplegin protein) or *AFG3L2*, both encoding subunits of the hexameric m-AAA protease located in the mitochondrial inner membrane, cause mitochondrial dysfunction and result in the development of neurodegenerative diseases. While *AFG3L2* subunits can form homo-oligomeric protease enzymes independently, Paraplegin subunits must form hetero-oligomers with *AFG3L2* to assemble into functional complexes. Interestingly, mutations in *SPG7* affect axons of the corticospinal tract and mutations in *AFG3L2* cause degeneration of Purkinje cells in the cortex. This leads to development of different neurodegenerative diseases. It is poorly understood why mutations in genes encoding subunits of the same protease result in different phenotypes. We here aim to understand the function of the hetero- and homo-oligomeric m-AAA protease by identifying substrates. We first generated human cell lines lacking Paraplegin and/or *AFG3L2*. After basal characterization of those cell lines, we used a multiomic approach to systematically generate an unbiased list of novel m-AAA protease substrates. We combined analysis of the cellular proteome under basal and CHX treated conditions, Neo N terminal proteome and RNA sequencing. We were not able to identify any substrates that specifically depend on the presence of hetero-oligomers, suggesting that the different phenotype of m-AAA protease associated diseases are a result of tissue-specific expression of Paraplegin and *AFG3L2*. Our list includes proteins that are involved in a variety of mitochondrial functions and underlines the role of the m-AAA in mitochondrial gene expression and maintenance of oxidative phosphorylation. We furthermore show a possible involvement of the human m-AAA protease in regulating mitochondrial protein import, as the protease regulates turnover of the TIM 23 complex subunit DNAJC15.

Zusammenfassung

Mitochondrien sind essentielle Organellen eukaryotischer Zellen. Um ihre Funktion sicherzustellen, regulieren mitochondriale Proteasen kontinuierlich das mitochondriale Proteom. Die m-AAA Protease ist ein hexametrischer Proteinkomplex der inneren mitochondrialen Membran. *SPG7* (kodierend für das Paraplegin-Protein) und *AFG3L2* kodieren homologe Untereinheiten der m-AAA Protease. *AFG3L2* Proteine können unabhängig von Paraplegin funktionelle homo-oligomerische Proteasekomplexe formen. Paraplegin jedoch benötigt *AFG3L2*-Untereinheiten um zusammen hetero-oligomerische Komplexe zu bilden. Mutationen in *SPG7* führen zum Verlust von Neuronen im Rückenmark und Mutationen in *AFG3L2* verursachen eine Degeneration von Purkinje-Zellen des Kortex. Dies führt zur Entwicklung verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen. Es ist bislang nicht bekannt warum Mutationen in *SPG7* und *AFG3L2* zu unterschiedlichen Phänotypen führen, obwohl sie Untereinheiten des gleichen Proteasekomplexes kodieren. Um die Funktion der hetero- und homo-oligomerischen m-AAA-Protease zu verstehen, wurden Substrate der m-AAA Protease identifiziert. Zunächst wurden humane Zelllinien generiert, die kein Paraplegin und/oder *AFG3L2* exprimieren. Nach der allgemeinen Charakterisierung dieser Zelllinien wurde eine Kombination verschiedener Omics-Methoden angewendet, um systematisch eine Liste neuer m-AAA-Proteasesubstrate zu erstellen. Für diese Untersuchung wurde die Analyse des zellulären Proteoms unter basalen und CHX-behandelten Bedingungen, des Neo-N-terminalen Proteoms und der RNA-Sequenzierung kombiniert. Es wurden keine Substrate identifiziert, die ausschließlich durch die hetero-oligomerische m-AAA Protease abgebaut werden, was darauf hindeutet, dass der unterschiedliche Phänotyp von m-AAA-Protease-assoziierten Krankheiten eine Folge von gewebespezifischer Expression von Paraplegin und *AFG3L2* ist. Die hier präsentierte Liste umfasst Proteine, die an einer Vielzahl von mitochondrialen Funktionen beteiligt sind und unterstreicht die Rolle der m-AAA bei der mitochondrialen Genexpression und der Aufrechterhaltung der oxidativen Phosphorylierung. Außerdem suggeriert diese Analyse eine mögliche Beteiligung der menschlichen m-AAA-Protease an der Regulierung des mitochondrialen Proteinimports hin, da die Protease DNAJC15, eine Untereinheit des mitochondrialen Proteinimportkomplex, reguliert.