

A protective function against apoptosis revealed by the neuronal interactome of the mitochondrial *m*-AAA protease

Abstract

The *m*-AAA protease, known to degrade and process substrates, is an oligomeric metalloprotease of the inner mitochondrial membrane. Human isoforms assemble from two homologous subunits, AFG3L2 and PARAPLEGIN, into complexes with different subunit composition. Patients with mutations in either subunit suffer from spinocerebellar ataxia SCA28, or hereditary spastic paraplegia HSP7, due to the progressive loss of neurons in the cerebellum and the spinal cord. However, the molecular mechanism for the neuronal cell death remains largely unknown. It is conceivable that neuronal survival may rely on yet unidentified interactors or substrates of the *m*-AAA protease in neurons. To identify the neuronal *m*-AAA protease interactome, conditional transgenic mice were generated, allowing the inducible expression of a dominant negative substrate trap of Afg3l2 (Afg3l2^{trap}) in the forebrain. These transgenic mice displayed massive neuronal loss and premature death shortly after induction of the Afg3l2^{trap} variant. Mass spectrometry of *m*-AAA protease complexes purified from their forebrain allowed the identification of known interactors, thus validating the experimental approach. Moreover, new interactors and substrates could be identified, including OCIAD1. OCIAD1 is a largely uncharacterized protein recently reported to influence the pro-survival STAT3 pathway. Indeed, the absence of either OCIAD1 or AFG3L2 rendered HeLa cells sensitive towards apoptotic cell death. Constitutive STAT3 activity was sufficient to fully restore the apoptotic phenotype of these cells, strongly suggesting that STAT3 is responsible for the protective function of the *m*-AAA protease complex. Hence, this work reveals a role of the *m*-AAA protease complex in apoptotic resistance, which may explain the loss of neurons in neurodegenerative diseases associated with *m*-AAA dysfunction. Furthermore, STAT3 may prove to be a promising target for therapeutic intervention.

Zusammenfassung

Die *m*-AAA Protease ist eine oligomere Metalloprotease der inneren Mitochondrienmembran, die am proteolytischem Abbau und der Prozessierung von Substraten beteiligt ist. Die humane *m*-AAA Protease bildet Komplexe aus zwei homologen Untereinheiten, AFG3L2 und PARAPLEGIN. Mutationen in einer der beiden Untereinheiten führen beim Menschen zu spinocerebellärer Ataxie oder hereditärer spastischer Spinalparalyse gekennzeichnet durch den Verlust von Neuronen im Kleinhirn und Rückenmark. Der zugrundeliegende pathophysiologische Mechanismus ist jedoch weitgehend unbekannt. Es ist denkbar, dass bislang unbekannte Interaktoren oder Substrate der *m*-AAA Protease essentiell für Neuronen sind. Um das neuronale Interaktom der *m*-AAA Protease zu bestimmen wurden transgene Mäuse generiert, welche eine dominant negative, permanent substratbindende AFG3L2 Mutante (AFG3L2^{trap}) im Vorderhirn exprimieren. Die transgenen Tiere zeigten fortschreitenden Verlust von Neuronen und verstarben kurz nach Induktion des AFG3L2^{trap} Transgens. Massenspektrometrische Analyse von aufgereinigten *m*-AAA Protease Komplexen aus dem Vorderhirn dieser Mäuse bestätigten bekannte Interaktoren der *m*-AAA Protease und validierten dadurch den experimentellen Ansatz. Zudem konnten neue Interaktoren und Substrate identifiziert werden, darunter der Interaktor OCIAD1. OCIAD1 repräsentiert ein weitgehend unbekanntes Protein, das jedoch kürzlich als regulierendes Element im anti-apoptischen STAT3 Signalweg identifiziert wurde. In dem Zusammenhang konnte die vorliegende Studie nachweisen, dass der Verlust von OCIAD1 oder AFG3L2 die apoptotische Sensitivität von HeLa Zellen signifikant erhöht. Zudem war die Expression einer konstitutiv aktiven STAT3 Variante ausreichend, um die apoptotische Resistenz dieser Zellen vollständig wiederzuerstellen. Dies legt nahe, dass der STAT3 Signalweg verantwortlich für die protektive Eigenschaft des *m*-AAA Proteasekomplexes ist. Zusammenfassend beschreibt die vorliegende Arbeit eine bislang unbekannt Funktion des *m*-AAA Protease Komplexes in apoptotischer Resistenz, die den Verlust von Neuronen in den assoziierten neurodegenerativen Erkrankungen erklären könnte und zudem, durch Aktivierung des STAT3 Signalweges, erstmalig Potential für eine therapeutische Behandlung von Patienten darstellt.