

Abstract

Cellular health is intimately linked to mitochondrial functionality. Mitochondria are essential determinants of metabolic control, regulate numerous signalling pathways and play a critical role in cellular homeostasis, affecting viability outcomes. Hence, a plethora of mitochondrial quality control systems are in place to ensure proper stress responses. Not surprisingly, the disruption of mitochondrial integrity is associated with a wide range of ageing-associated disorders, including neurodegenerative and metabolic diseases.

Mitochondria are highly dynamic organelles that continuously remodel their shape in response to cellular cues, through balancing fusion and fission events. These processes depend on large dynamin-like GTPase proteins (DRPs), whose activity is driven by self-assembly. In this study, we focused on the regulation of mitofusins, the DRPs responsible for mitochondrial outer membrane fusion. Mitofusins are called Fzo1 in yeast and MFN1 & MFN2 in mammals. Defects in mitofusins have been associated with several disorders, including cancer, diabetes, non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), and cardiac defects. Moreover, mutations in the mitofusin MFN2 are causative of a neuropathy of the peripheral nervous system, known as Charcot-Marie Tooth type 2A (CMT2A). Mitofusins and consequently mitochondrial morphology are regulated by the ubiquitin-proteasome system (UPS), in yeast and mammals. On the one hand, Fzo1 ubiquitylation is required for mitochondrial fusion. On the other hand, under stress, Fzo1 ubiquitylation targets its turnover by the proteasome and causes mitochondrial fragmentation. However, the interplay between Fzo1 oligomerization, ubiquitylation and interaction with ubiquitin regulators remained unclear.

This thesis focuses on the cellular components and mechanisms that control the ubiquitin-dependent regulation of mitofusins, both in the presence and absence of stress, addressing four key areas. First, we investigated the role of mitofusins in membrane fusion, with a particular focus on the mechanisms of ubiquitylation-mediated regulation. Here, we created novel Fzo1 mutants that affect Fzo1 ubiquitylation in different ways. We could show how they arrest Fzo1 at distinct steps in the fusion process, highlighting the importance of several conformational changes. Moreover, pro-fusion ubiquitylation of Fzo1 does not target its proteasomal turnover. Instead, it allows Fzo1 recognition by the ubiquitin-specific AAA-ATPase Cdc48/p97, which promotes complete membrane merging. Second, we investigated Fzo1 ubiquitylation in the context of mitochondrial and cellular stress. We found that the E4-ligase Ufd2/UBE4B extends ubiquitin chains on mitofusin and thereby facilitates its degradation in yeast and mammals. This mechanism was relevant under stresses associated with metabolic dysfunction, as well as for the regulation of CMT2A disease variants, making it of potential interest for therapeutic intervention. Third, we show that the precursor protein CxUb (C-terminally extended ubiquitin) promotes cellular stress responses by enabling Ufd2-dependent ubiquitylation. This allows for degradation of Fzo1 and signals mitophagy, in yeast and in *C. elegans*. Fourth, we examined the mechanisms underlying the cellular localization and degradation of mitofusins in response to stress. We observed that Fzo1 is displaced from mitochondria in a Ufd2-dependent manner and thereby identify a novel quality control pathway acting on mitofusin.

In conclusion, here we present a detailed description of ubiquitin-dependent mechanisms that govern mitofusin activity and regulation under basal and stress conditions.

Zusammenfassung

Zelluläre Gesundheit ist eng mit der Funktionalität der Mitochondrien verbunden.

Mitochondrien sind wesentliche Einflussfaktoren für die Stoffwechselkontrolle, regulieren zahlreiche Signalwege und spielen eine entscheidende Rolle bei der zellulären Homöostase, die sich auf die Lebensfähigkeit auswirkt. Daher gibt es eine Vielzahl von mitochondrialen Qualitätskontrollsystemen, die eine angemessene Stressreaktion gewährleisten. Es ist daher nicht überraschend, dass eine Störung der mitochondrialen Integrität mit einer Vielzahl von altersbedingten Erkrankungen in Verbindung gebracht wird, darunter neurodegenerative und Stoffwechselkrankheiten.

Mitochondrien sind hoch dynamische Organellen, die ihre Form als Reaktion auf zelluläre Signale kontinuierlich verändern, indem sie Fusions- und Spaltungsvorgänge ausbalancieren. Diese Prozesse hängen von großen dynamin-ähnlichen GTPase-Proteinen (DRPs) ab, deren Aktivität durch Oligomerisierung gesteuert wird. In dieser Studie konzentrierten wir uns auf die Regulierung von Mitofusinen, den DRPs, die für die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran verantwortlich sind. Mitofusine werden in Hefe Fzo1 und in Säugern MFN1 & MFN2 genannt. Defekte in Mitofusinen werden mit verschiedenen Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Krebs, Diabetes, nichtalkoholische Fettlebererkrankung (NAFLD) und Herzfehler. Darüber hinaus sind Mutationen im Mitofusin MFN2 ursächlich für eine Neuropathie des peripheren Nervensystems, die als Charcot-Marie Tooth Typ 2A (CMT2A) bekannt ist. Es wurde gezeigt, dass das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) Mitofusine und mitochondriale Morphologie in Hefe und Säugetieren reguliert. Einerseits ist die Ubiquitylierung von Fzo1 für die mitochondriale Fusion erforderlich. Andererseits führt die Ubiquitylierung von Fzo1 unter Stress zu seinem Abbau durch das Proteasom und zur mitochondrialen Fragmentierung. Das Zusammenspiel zwischen der Oligomerisierung von Fzo1, seiner Ubiquitylierung und der Interaktion mit Ubiquitin-Regulatoren ist jedoch noch unklar.

Diese Dissertation befasst sich mit den zellulären Komponenten und Mechanismen, die die Ubiquitin-abhängige Regulierung von Mitofusinen kontrollieren, sowohl in Gegenwart als auch in Abwesenheit von Stress, wobei vier Schlüsselbereiche angesprochen werden. Zunächst haben wir die Rolle von Mitofusinen bei der Membranfusion untersucht, wobei wir uns insbesondere auf die Mechanismen der Ubiquitin-vermittelten Regulierung konzentriert haben. Hier haben wir neuartige Fzo1-Mutanten kreiert, die die Fzo1-Ubiquitylierung auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Wir konnten zeigen, wie sie Fzo1 bei verschiedenen Schritten im Fusionsprozess arretieren, was die Bedeutung mehrerer Veränderungen der Konformation von Fzo1 hervorhob. Darüber hinaus zielt die Pro-Fusions-Ubiquitylierung von Fzo1 nicht auf seinen proteasomalen Abbau ab. Stattdessen ermöglicht sie die Erkennung von Fzo1 durch die ubiquitinspezifische AAA-ATPase Cdc48/p97, die die vollständige Membranfusion fördert. Zweitens haben wir die Ubiquitylierung von Fzo1 im Zusammenhang mit mitochondrialem und zellulärem Stress untersucht. Wir fanden heraus, dass die E4-Ligase Ufd2/UBE4B Ubiquitinketten an Mitofusin verlängert und dadurch seinen Abbau in Hefe und Säugetieren fördert. Dieser Mechanismus war sowohl bei Stress, der mit Stoffwechselstörungen verbunden ist, als auch bei der Regulierung von CMT2A-Krankheitsvarianten von Bedeutung, was ihn für therapeutische Interventionen bei MFN2-verknüpften Krankheiten interessant machen könnte. Drittens zeigen wir, dass das Precursor-Protein CxUb (C-terminally extended ubiquitin) zelluläre Stressreaktionen fördert, indem es eine Ufd2-abhängige Ubiquitylierung ermöglicht. Dies ermöglicht den Abbau von Fzo1 und initiiert die Mitophagie in der Hefe und in *C. elegans*. Viertens haben wir die Mechanismen untersucht, die der zellulären Lokalisierung und dem Abbau von Mitofusinen

als Reaktion auf Stress zugrunde liegen. Wir haben beobachtet, dass Fzo1 in Abhängigkeit von Ufd2 aus den Mitochondrien verdrängt wird, und haben damit einen neuartigen Qualitätskontrollpfad identifiziert, der auf Mitofusin wirkt.

Zusammenfassend stellen wir hier eine detaillierte Beschreibung der Ubiquitin-abhängigen Mechanismen vor, die die Mitofusin-Aktivität und -Regulation unter basalen und Stressbedingungen steuern.