

Author's name: Selver Altin

Document title: Role of ubiquitin in the regulation of yeast and mammalian mitofusins

Exam date: 11.06.2018

Free keywords: Mitochondrial dynamics, Mitofusin, Ubiquitin, Fusion

Abstract

Mitochondria are essential organelles with a broad variety of functions from ATP production to the synthesis of iron sulfur clusters. Several layers of quality control mechanisms, ranging from mitochondrial unfolded protein response to mitochondrial dynamics maintain proper mitochondrial function. In contrast, complete failure of the organelle results in the removal by mitophagy. Intimately linked to the mitochondrial function is the mitochondrial morphology. Dependent on the requirements of the cell, mitochondria form a net like structure by fusion or small dot like fragments by mitochondrial fission. Large GTPases, like Fzo1 in yeast and MFN1/MFN2 in mammals are the key players regulating mitochondrial outer membrane fusion.

This study revealed a novel GTPase independent function of Fzo1 for mitophagy. In contrast, mitophagy depends on Fzo1 ubiquitination and subsequent turnover by the proteasome. Moreover, mitophagy is antagonistically regulated via the DUB Ubp3 and the polyubiquitin encoding gene *UBI4*. Ubp3 is a negative regulator of mitophagy, which prevents Fzo1 turnover. In contrast, similar as Fzo1, *UBI4* is an upstream activator of mitophagy, promoting Fzo1 turnover. Detail studies focusing on *UBI4* revealed a novel, non-conjugable variant of ubiquitin, named as Ub-N, encoded by the last ubiquitin moiety of *UBI4*. Ub-N serves as a stress signalling molecule, which initiates mitophagy via Fzo1 turnover. Thus cells with a deletion of the last asparagine residue show inhibited mitophagy response and stabilization of Fzo1. Consistently with the novel function of Fzo1 required for mitophagy, also human MFN2^{-/-} cell lines revealed a delayed mitophagy response.

The yeast mitofusin Fzo1 is highly regulated by ubiquitination, which dictates Fzo1 protein stability promoting fusion or Fzo1 destabilization resulting in mitochondrial fragmentation due to unbalanced fission. This study further focused on the analysis of mammalian mitofusin ubiquitination in human MFN1^{-/-}, MFN2^{-/-} and MFN1/2^{-/-} HEK and HeLa cells generated by CRISPR-Cas9. Mitofusin deficiency in human cells resulted in mitochondrial fragmentation. Moreover, MFN2 deficiency led to a respiratory defect, whereas MFN1^{-/-} cells behaved WT-like. In addition, MFN2 mutant variants associated with CMT2A, which differently alter mitochondrial fusion capacity, did not impair mitofusin ubiquitination.

In conclusion, a novel function for mitophagy of mitofusins and the ubiquitin precursor Ub-N was identified in this study.

Kurzzusammenfassung

Mitochondrien sind essentielle Zellorganellen mit einer großen Vielfalt an Funktionen, wie zum Beispiel die Produktion von ATP und die Synthese von Eisen-Schwefel Clustern. Verschiedene Stufen von Qualitätskontrollmechanismen, wie unter anderem die mitochondriale Dynamik sorgen dafür, dass die Funktionsabläufe in dem Organell fehlerlos ablaufen, wohingegen der vollständige Defekt der Mitochondrien den selektiven Abbau über die Mitophagie initiiert. Die Funktion der Mitochondrien ist eng mit ihrer dynamischen Morphologie verbunden. Der Prozess der Fusion fördert die Entstehung eines Mitochondrien-Netzwerks, wohingegen der Prozess der Fragmentierung die Zerlegung des Mitochondrien-Netzwerks in kleine Fragmente vermittelt. GTPasen, wie Fzo1 in Hefe und Mitofusin1 und Mitofusin2 in Säugern sind die Hauptakteure, die die Fusion der äußeren mitochondrialen Membran regulieren. Die vorliegende Studie beschreibt eine neue, GTPase unabhängige Funktion von Fzo1, wobei die Ubiquitinierung dieses Proteins und der damit verbundene proteolytische Abbau von Fzo1 für die Initiierung der Ubiquitin vermittelten Mitophagie in Hefe notwendig ist. Dieser Prozess wird antagonistisch von der Deubiquitinase Ubp3 und dem polyubiquitin Gen *UBI4* reguliert. Ubp3 fungiert als negativer Regulator der Mitophagie, der den proteolytischen Abbau von Fzo1 verhindert. Im Gegensatz dazu ist *UBI4*, so wie Fzo1, für die Initiierung der Mitophagie notwendig. Durch eine detaillierte Analyse des *UBI4* Gens konnte eine nicht-konjugierbare Ubiquitin Variante, hier benannt als Ub-N, identifiziert werden, die von der letzten Ubiquitineinheit von *UBI4* kodiert wird. Ub-N ist ein Stress-Signalmolekül, das die Mitophagie und den proteolytischen Abbau von Fzo1 initiiert. Somit können Hefezellen mit einer Deletion der letzten Aminosäure Asparagin von Ubiquitin keine Mitophagie induzieren. In Anlehnung an diese neue Funktion von Fzo1, zeigt auch das homologe Protein MFN2 in Säugerzellen eine verzögerte Mitophagie in MFN2^{-/-} HeLa Zellen.

Fzo1 in Hefe ist ein stark posttranslational reguliertes Protein, wobei die Ubiquitinierung dieses Proteins es entweder stabilisiert und dabei die Fusion der Mitochondrien fördert, oder es für den Abbau kennzeichnet, wodurch die Mitochondrien fragmentieren. Basierend auf den Untersuchungen in Hefe, wurde in dieser Studie ein Fokus auf die Ubiquitinierung von Mitofusin1 und Mitofusin2 gelegt.

Dafür wurden HEK und HeLa MFN1^{-/-}, MFN2^{-/-} und MFN1/2^{-/-} Zelllinien mittels CRISPR-Cas9 generiert. Die Charakterisierung dieser Zelllinien zeigt einen Defekt der mitochondrialen Respiration auf, wenn MFN2 deletiert wird, wohingegen die Deletion von MFN1 keine Auswirkungen hat. Im Gegensatz zur essentiellen Ubiquitinierung von Fzo1, die für die mitochondriale Fusion notwendig ist, zeigte die Analyse der humanen Mitofusine keine Korrelation zwischen der Ubiquitinierung und der Fusionsaktivität der GTPase. Diese Korrelation wurde anhand von Mitofusin2 assoziierten Mutationen untersucht, die mit der neurodegenerativen Erkrankung Charcot-Marie Tooth 2A assoziiert sind.