

## Abstract

Mitochondria are dynamic organelles in eukaryotic cells, responsible for cellular respiration and essential for the production of iron-sulfur clusters. Mitochondrial function is maintained by the balanced processes of fission and fusion, and dysregulation of mitochondrial dynamics is associated with neurodegenerative diseases. Mitochondrial fusion in yeast is mediated by the mitofusin Fzo1, a family member of the large dynamin-related GTPases, whose activity depends on self-assembly. Several studies showed that Fzo1 is intricately regulated by ubiquitylation. Different kinds of Fzo1 ubiquitylation are regulated by the two ubiquitin-specific peptidases (DUBs), Ubp2 and Ubp12, which cleave off ubiquitin from the protein, promoting either its stabilization or its degradation.

In this study, we identified a new player in the regulation of Fzo1 ubiquitylation, called Cdc48. Cdc48 is a highly abundant ubiquitin-selective chaperone that interacts with ubiquitylated substrates via cofactors and extracts them from complexes or membranes. We show that Cdc48 is the master regulator of a DUB cascade encompassing Ubp2 and Ubp12. In this cascade, Cdc48 negatively regulates Ubp12, which negatively regulates Fzo1 by two ways: First, it removes stabilizing ubiquitylation from Fzo1 and second, it negatively regulates Ubp2 which removes destabilizing ubiquitylation from Fzo1. Importantly, Cdc48 itself recognizes stabilizing Fzo1 ubiquitylation which displays an unusual but highly conserved pattern. This pattern depends on the lysine residue K398 of Fzo1. We demonstrate that it is required for efficient mitochondrial fusion, independently of Fzo1 stability. By co-expression of tagged and untagged ubiquitin variants we show that the pattern consists of Fzo1 with only very short ubiquitin chains of one or two moieties. Mutation of K398 to arginine abolishes this pattern together with compromised mitochondrial function, especially upon stress conditions. By structural analysis *in silico* we identified that mutating the lysine 382 to arginine suppressed the K398R mutation effects, in terms of both ubiquitylation and function.

Together, we identified a novel component of the Fzo1 ubiquitylation machinery, Cdc48, as the regulator of a fine-tuned DUB cascade. Furthermore, we propose that the accessibility of a redundant lysine in the helix  $\alpha 5$  of Fzo1 for ubiquitylation is the key to Fzo1 function.

## Zusammenfassung

Mitochondrien sind dynamische Zellorganellen, die für die Zellatmung verantwortlich sind und deren essentielle Aufgabe die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern ist. Die Funktion von Mitochondrien wird durch deren ausbalancierte Fusion und Teilung aufrechterhalten. Die Fehlfunktion dieses Equilibriums ist mit schweren, neurodegenerativen Krankheiten assoziiert. In Hefe wird die Fusion von Mitochondrien mithilfe des Proteins Fzo1 durchgeführt. Es ist Teil einer Proteinfamilie bestehend aus Dynaminähnlichen GTPasen, deren Aktivität von ihrer Assemblierung abhängt. Studien haben gezeigt, dass die Funktion von Fzo1 stark von der posttranslationalen Modifizierung in Form von Ubiquitinierung abhängt. Zwei Arten von Ubiquitinierung von Fzo1 sind bekannt, die von zwei verschiedenen Deubiquitinasen (DUBs) erkannt: Ubp2 und Ubp12. Diese entfernen die unterschiedlichen Ubiquitinketten von Fzo1 und führen damit entsprechend zum Abbau oder zur Stabilisierung des Proteins.

In dieser Studie berichten wir von der Identifizierung einer neuen Komponente des Ubiquitinierapparates von Fzo1: Cdc48. Cdc48 ist ein sehr häufig in der Zelle vorkommendes Ubiquitin-spezifisches Chaperon das über Kofaktoren mit ubiquitinierten Proteinen interagiert und sie aus Komplexen oder Membranen extrahiert. Wir zeigen, dass Cdc48 der Hauptregulator einer DUB-Kaskade ist, die außerdem Ubp2 und Ubp12 umfasst. In dieser Kaskade reguliert Cdc48 Ubp12 negativ, welches wiederum Fzo1 auf zwei verschiedene Arten negativ reguliert: Zum einen entfernt es stabilisierende Ubiquitinketten von Fzo1, zum anderen reguliert es Ubp2 negativ, welches wiederum destabilisierende Ubiquitinketten von Fzo1 entfernt. Auf diese Weise wird Fzo1 durch Cdc48 stabilisiert. Außerdem erkennt und interagiert Cdc48 selbst auch mit ubiquitiniertem Fzo1. Dieses weist ein ungewöhnliches aber hochkonserviertes Ubiquitinmuster auf. Dieses Muster hängt von dem Lysin K398 in Fzo1 ab. Wir zeigen, dass dieses Lysin notwendig für die effiziente Fusion von Mitochondrien ist, unabhängig von der Stabilität von Fzo1. Durch die Koexpression von getaggetem und ungetaggetem Ubiquitin demonstrieren wir, dass das Ubiquitinmuster von Fzo1 aus einer monoubiquitinierten Form und zwei diubiquitinierten Formen besteht. Die Mutation des Lysins K398 zu Arginin führt zum Verlust des konservierten Ubiquitinmusters und eingeschränkter Mitochondrienfunktion, vor allem unter Stressbedingungen. Durch Strukturanalysen von Fzo1 *in silico* haben wir das Lysin K382 identifiziert, welches durch die Mutation zu Arginin den Effekt auf Fzo1 Ubiquitinierung und Funktion der K398R Mutante unterdrückt.

Zusammenfassend präsentieren wir Cdc48 als neue Komponente des Fzo1 Ubiquitinierapparates, die eine präzise DUB Kaskade steuert. Außerdem schlagen wir vor, dass die Zugänglichkeit eines Lysins in der Helix  $\alpha 5$  der Schlüssel zur Funktion von Fzo1 ist.