

Łukasz Mateusz Kowalski

Extramitochondrial factors affecting import and degradation of mitochondrial proteins

Pozamitochondrialne czynniki wpływające na import i degradację białek mitochondrialnych

Supervisor: Prof. Dr. hab. Agnieszka Chacińska

Co-supervisor: Dr. Piotr Brągoszewski

Abstract

The majority of mitochondrial proteins are synthesized in the cytosol and require an active import into a specific location within the cellular organelles. To maintain protein homeostasis, protein synthesis and transport are accompanied by the quality control mechanisms that remove misfolded or mislocalized proteins. One of such mechanisms is the degradation of misfolded/mistargeted mitochondrial proteins by the ubiquitin-proteasome system (UPS). Several lines of evidence suggest that proteins directed to the intermembrane space of mitochondria (IMS) are substrates of UPS. Moreover, an increased abundance of such proteins in the cytosol results in an increased proteasomal activity. Despite this firm link, the detailed mechanism of the ubiquitination of such proteins remained known.

In my PhD project, I focused on a model IMS protein – Cox12. I aimed to find external (i.e. specific enzymes) and internal factors (i.e. sequence features) responsible for its ubiquitination and degradation. Moreover, I investigated the interplay between Cox12 ubiquitination and its import to mitochondria. My experiments identified E2 ubiquitin-conjugating enzyme – Ubc4 and E3 ubiquitin ligase – Rsp5, as enzymes participating in ubiquitination of Cox12. I also discovered that a decrease in mitochondrial import of Cox12 causes its increased ubiquitination. Importantly, my results indicated that the attachment of the ubiquitin prohibits the mitochondrial import of the IMS protein.

The above observation prompted me to investigate the consequences of mitochondrial import of precursor protein with a stably folded domain. To model such a scenario I expressed mitochondria-directed fusion protein containing a tightly folded protein tag - superfolder GFP. Expression of such protein fusion led to severe growth inhibition phenotype in yeast. My results showed that my model protein was unable to complete its import effectively, and instead was stalled in the translocation machinery. This in turn led to general import failure. I aimed to characterize the cytosolic factors which might constitute a response to the clogging of mitochondrial import channels. I employed low and high-throughput screening techniques which allowed me to discover proteins involved in this cellular response. I identified a crucial role of the UPS in this process, as well as several protein candidates, which role in this process has to be further investigated.

Overall, my research has broadened the knowledge about the consequences of mitochondrial protein import disruption. It emphasized the importance of the UPS in the regulation of the import of mitochondrial precursor proteins. Additionally, the high-throughput analysis revealed several protein candidates that may be involved in the clearance of clogged mitochondrial channels. My results help to understand the extramitochondrial quality control mechanisms acting on mitochondrial proteins.

Streszczenie

Większość białek mitochondrialnych jest syntetyzowanych w cytosolu i wymaga aktywnego importu do specyficznej lokalizacji wewnątrz organelli. Aby zachować komórkową homeostazę, syntezie i transportowi białek towarzyszą systemy kontroli jakości. Systemy takie mogą usuwać źle sfałdowane lub zlokalizowane białka. Selektywną degradację tych białek zapewnia między innymi system ubikwityna-proteasom (ang. ubiquitin-proteasome system, UPS). Wiele przesłanek wskazuje, że pula białek kierowanych do mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej (ang. Intermembrane space of mitochondria, IMS) może być degradowana przez UPS. Z kolei wzrost ilości tych białek w cytosolu wpływa na UPS i prowadzi do zwiększonej aktywności proteasomu. Jednakże dokładny mechanizm ubikwitynacji tych białek jest wciąż nieznan.

W mojej pracy doktorskiej skupiłem się na białku Cox12 reprezentującym białka IMS. Moim celem było zidentyfikowanie czynników decydujących o ubikwitynacji białka Cox12, zarówno zewnętrznych (enzymy zaangażowane w proces ubikwitynacji) oraz wewnętrznych (właściwości białka Cox12 niezbędne dla jego ubikwitynacji). Moje obserwacje objęły również wzajemny wpływ procesów ubikwitynacji i importu. Odkryłem, że białka Ubc4 (enzym E2) oraz Rsp5 (ligaza ubikwitynowa) biorą udział w ubikwitynacji Cox12. Wykazałem również, że osłabienie importu białka do mitochondriów powoduje jego zwiększoną ubikwitynację. Wyniki moich badań wskazują również, że przyłączenie ubikwityny do białka prekursorowego może uniemożliwić jego import do mitochondriów.

Otrzymane wyniki pozwoliły mi na rozpoczęcie kolejnej części projektu, w której skupiłem się na badaniu konsekwencji importu do mitochondriów białek posiadających domeny o trwałej strukturze trzeciorzędowej. W celu odtworzenia takich warunków w komórkach drożdży zdecydowałem się na ekspresję białka fuzyjnego kierowanego do mitochondriów, które zawierało w swojej sekwencji stabilnie sfałdowaną domenę białka zielonej fluorescencji nazwaną „superfolder GFP”. Ekspresja tego białka skutkowała silnym spowolnieniem wzrostu drożdży. Uzyskane przeze mnie wyniki dowodzą, że modelowe białko fuzyjne jest importowane nieefektywnie i utyka w mitochondrialnych translokazach. To z kolei prowadzi do uogólnionego zaburzenia procesu importu. Moim celem było wskazanie cytosolowych czynników odpowiadających na zablokowanie mitochondrialnych kanałów importu. Połączyłem nisko- i wysokoprzepustowe metody, co pozwoliło mi wytypować białka potencjalnie zaangażowane w taką odpowiedź komórkową. Potwierdziłem, że również w tym przypadku, niezwykle istotną rolę odgrywa UPS. Wskazałem również pulę innych białek mogących stanowić elementy badanego mechanizmu odpowiedzi komórki, jednak zrozumienie ich roli w opisywanym procesie wymagać będzie dalszych badań.

Podsumowując, moje badania poszerzyły wiedzę o konsekwencjach zaburzenia importu mitochondrialnego. Podkreśliły one znaczenie UPS dla regulacji importu mitochondrialnych białek prekursorowych. Dodatkowo, przeprowadzone eksperymenty pozwoliły wskazać białka, które potencjalnie mogą być zaangażowane w udrażnianie zablokowanych kanałów mitochondrialnych. Moje wyniki stanowią znaczący wkład do naszego zrozumienia mechanizmów kontroli jakości białek mitochondrialnych, działających poza tym organellum.

