

# The mitochondrial AAA<sup>+</sup> protein CLPB regulates mitochondrial proteostasis and controls cellular innate immunity

## Abstract

Mitochondria regulate a whole plethora of cellular functions, ranging from ATP production to immune signalling. Maintenance of proper mitochondrial function is crucial for cellular fitness and survival. Hence, various quality control mechanisms monitor mitochondrial damage and ensure mitochondrial proteostasis and integrity. CLPB is a mitochondrial localized, putative protein disaggregase that maintains proteostasis of human mitochondria. Loss-of-function mutations in *CLPB* in humans, are associated with a novel, autosomal-recessive syndrome, which is characterized by a broad range of pathologies including progressive brain atrophy, epilepsy and intellectual disability, congenital neutropenia, bilateral cataracts and movement disorders. All patients accumulate 3-MGA in their urine, a biomarker linked to mitochondrial dysfunction but the pathophysiological mechanism remained enigmatic. *Clpb* deficient mice are embryonic lethal, demonstrating that *Clpb* is essential for embryogenesis. In this thesis, the role of CLPB in mitochondrial proteostasis is analysed in human cell models. CLPB is shown to localize to the intermembrane space and to maintain the solubility of a specific set of mitochondrial intermembrane space proteins. This function depends on the ankyrin-like repeats of CLPB as well as on its functional AAA<sup>+</sup> domain. The evidence provided is consistent with CLPB binding specific insoluble protein substrates via its ankyrin-like repeats and preserving their solubility by ATP hydrolysis via its AAA<sup>+</sup> domain. Loss of mitochondrial CLPB elicits a broad cellular innate immune response, which is accompanied with the release of mitochondrial DNA into the cytosol and regulated by DNA- and RNA-sensors. Metabolomic analysis of *CLPB* deficient cells suggests a link of this immune response to the cellular aspartate metabolism. Together, the results presented in this thesis reveal that CLPB maintains mitochondrial proteostasis and exerts important functions for innate immune signalling.

## Zusammenfassung

Mitochondrien regulieren eine ganze Reihe von Zellfunktionen, angefangen bei der ATP-Produktion bis hin zu Immunreaktionen. Die Aufrechterhaltung der Mitochondrienfunktion ist entscheidend für die Gesundheit und das Überleben der Zelle, weshalb verschiedene Qualitätskontrollmechanismen Mitochondrien auf Schädigungen überwachen und die Proteostase und Integrität der Mitochondrien sicherstellen. Das menschliche Protein CLPB ist eine mitochondriale, mutmaßliche Disaggregase, die die mitochondriale Proteostase aufrechterhält. Das Fehlen funktionellen CLPB Proteins im Menschen ist mit einem neuartigen, autosomal-rezessiven Syndrom assoziiert, das durch ein breites Spektrum von Pathologien

gekennzeichnet ist, darunter progressive Hirnatrophie, Epilepsie und geistige Behinderung, kongenitale Neutropenie, bilateraler Katarakt und Bewegungsstörungen. Alle Patienten akkumulieren 3-MGA im Urin, ein Biomarker, der mit mitochondrialer Dysfunktion zusammenhängt, aber dessen pathophysiologischer Mechanismus rätselhaft bleibt. Die physiologische Relevanz funktionellen CLPB Proteins wird durch die Beobachtung unterstrichen, dass Mäuse mit *Clpb*-Defizit embryonal letal sind, wodurch *Clpb* eine essentielle Bedeutung während der Embryogenese zukommt.

In dieser Arbeit wird die Rolle von CLPB bei der mitochondrialen Proteostase in humanen Zellmodellen analysiert. Es wird gezeigt, dass CLPB im Intermembranraum lokalisiert ist und die Löslichkeit bestimmter, mitochondrialer Intermembranraumproteine aufrechterhält. Diese Funktion hängt sowohl von den Ankyrin-Wiederholungen als auch von einer funktionellen AAA<sup>+</sup>-Domäne des CLPB Proteins ab. Die Daten dieser Arbeit schlagen einen Wirkmechanismus von CLPB bei der Proteindisaggregation vor, bei dem CLPB spezifische, unlösliche Substrate über seine Ankyrin-Wiederholungen bindet und die Substrate unter ATP-Hydrolyse mittels der AAA<sup>+</sup>-Domäne zu löslichen Proteinen auflöst. Der Verlust von mitochondrialem CLPB löst eine breite, zelluläre, angeborene Immunantwort aus, die mit der Freisetzung mitochondrialer DNA in das Cytosol einhergeht und durch DNA- und RNA-Sensoren reguliert wird. Stoffwechselanalysen von *CLPB*-defizienten Zellen legen eine Verbindung dieser Immunantwort mit dem zellulären Asparaginsäure-Stoffwechsel nahe. Zusammengefasst zeigen die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse, dass CLPB die mitochondriale Proteostase aufrechterhält und wichtige Funktionen in der angeborenen Immunantwort ausübt.