

Characterizing the role of the ERLIN complex *in vivo*

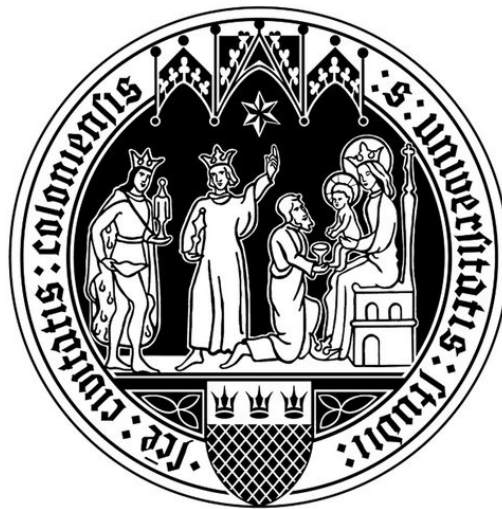
Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Lennart Robers

aus Stadtlohn

Köln, 2022

Berichterstatter:

Prof. Dr. Elena I. Rugarli

Prof. Dr. Carien M. Niessen

Tag der mündlichen Prüfung: 23.08.2022

Abstract

Hereditary spastic paraplegia (HSP) is a genetically heterogeneous disease characterized by progressive lower limb spasticity. Mutations in over 80 loci were identified to cause HSP, among them, mutations in *ERLIN1* and *ERLIN2*.

The two encoded proteins ERLIN1 and ERLIN2 are members of the SPFH family of proteins and localize to the endoplasmic reticulum (ER) membrane, where they form large homo- and heterooligomeric complexes. The ERLINs localize to lipid rafts, membrane structures that are enriched in saturated lipids and cholesterol, reported to act as separate compartments on the ER. The ERLIN complex was shown to mediate stability of various proteins via the endoplasmic reticulum associated degradation (ERAD) pathway, thereby influencing lipid, calcium and other intra- and intercellular pathways. Other reported functions include autophagosome formation, lipid homeostasis *in vivo*, cell cycle regulation and modulation of viral infection. Despite numerous studies on the function of the ERLIN complex, the underlying mechanisms of ERLIN dependent HSP pathology have not been identified.

In this study, the first full-body mouse models lacking either ERLIN2 or both ERLIN1 and ERLIN2 were generated via CRISPR/Cas9 gene editing and corresponding lines established. The mouse models show a mild phenotype in behavior experiments, commonly used for mouse models of HSP, but no histological alterations associated to the disease. The mouse models were subsequently used to conduct multiple OMICs in different tissues, aiming at identifying novel pathways associated to ablation of the ERLINs and ultimately strengthen our understanding of ERLIN associated disease progression. Many novel pathways affected upon depletion of the ERLINs have been identified, of which adhesion was successfully recapitulated in an independent *in vitro* HeLa cell model. The most prominent affected pathways are related to deficiencies in Vitamin B12, a known factor in neurodegenerative diseases. Identifying Vitamin B12 deficiency as a novel pathway affected upon ERLIN depletion, potentially enables novel approaches to treat patients of HSP.

Zusammenfassung

Hereditäre spastische Paraplegie (HSP) ist eine genetisch heterogene Erkrankung, die durch eine fortschreitende Spastik der unteren Extremitäten gekennzeichnet ist. Mutationen in über 80 Loci wurden als Ursache für HSP identifiziert, darunter Mutationen in *ERLIN1* und *ERLIN2*.

Die beiden codierten Proteine ERLIN1 und ERLIN2 sind Teil der SPFH-Proteinfamilie und in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert, wo sie große homo- und heterooligomere Komplexe bilden. Die ERLINs sind mit speziellen Membrandomänen (lipid rafts) assoziiert, die mit gesättigten Lipiden und Cholesterin angereichert sind und die Studien zufolge, als separate Kompartimente auf dem ER fungieren. Es wurde gezeigt, dass der ERLIN-Komplex die Stabilität verschiedener Proteine mit Hilfe des endoplasmatischen Retikulum-assoziierten Abbauweg (ERAD) beeinflusst und dadurch Lipid-, Calcium und andere intra- und interzelluläre Signalwege reguliert. Andere erforschte Funktionen umfassen die Bildung von Autophagosomen, regulierung der Lipid-Homöostase *in vivo*, Regulation des Zellzyklus, sowie die Modulation viraler Infektionen. Trotz zahlreicher Studien zur Funktion des ERLIN-Komplexes wurden die zugrunde liegenden Mechanismen der ERLIN vermittelten HSP Pathologie nicht identifiziert.

In dieser Studie wurden die ersten Ganzkörper-Mausmodelle, denen entweder ERLIN2 oder ERLIN1 und ERLIN2 fehlen, mit Hilfe des CRISPR/Cas9 Systems generiert und entsprechende Mauslinien etabliert. Die Mausmodelle zeigen in Verhaltensexperimenten, die üblicherweise für Mausmodelle von HSP verwendet werden, einen milden Phänotyp, aber keine mit der Krankheit assoziierten histologischen Veränderungen. Die Mausmodelle wurden anschließend verwendet, um mehrere OMICs Experimente von verschiedenen Geweben durchzuführen, mit dem Ziel, neue Signalwege zu identifizieren, die im Zusammenhang mit dem Verlust der ERLINs stehen und somit letztendlich unser Verständnis des ERLIN-assoziierten Krankheitsverlaufs zu stärken. Es wurden viele neue Signalwege identifiziert, die von dem Verlust der ERLINs betroffen sind. Von diesen wurde Adhäsion erfolgreich in einem unabhängigen *in vitro* HeLa-Zellmodell rekapituliert. Die am stärksten betroffenen Signalwege stehen im Zusammenhang mit einem Vitamin B12 Mangel, ein bekannter Faktor bei neurodegenerativen Erkrankungen. Die Identifizierung