

The ERLIN complex regulates cholesterol metabolism and mediates the RNF170-TMUB1 interaction

Abstract

ERLIN1 and ERLIN2 are two endoplasmic reticulum (ER) proteins belonging to the stomatin/prohibitin/flotillin/HflKc (SPFH) family that form a 2 MDa complex capable of binding cholesterol. Each ERLIN protein is reported to bind four cholesterol molecules and the localisation of the complex to the detergent resistant membranes (DRMs) of the ER is known to be cholesterol dependent. Mutations in *ERLIN1* or *ERLIN2* lead to a neurodegenerative disease known as hereditary spastic paraplegia, a rare disease in which patients progressively lose the ability to walk due to the degeneration of the long axons of the motor neurons that control voluntary movement. The cause of the disease remains unclear and the severity of the disease varies widely from patient to patient, with cases progressing to the more severe neurodegenerative disease amyotrophic lateral sclerosis, leaving patients with almost no treatment. The molecular function of the ERLIN complex is still not fully understood. So far, the ERLINs have been shown to regulate the ER-associated proteins degradation (ERAD) of some proteins, such as ITPR1 or HMGCR, while preventing the degradation of others, as in the case of insulin-induced gene 1 (INSIG1). These proteins link the ERLINs to calcium and cholesterol homeostasis, two tightly regulated processes known to be disrupted in neurodegenerative processes.

In this study, a double knock-out cell line for both ERLIN1 and 2 and a rescue cell line in which both genes were retrovirally transduced were used to study the function of the complex. A series of multiomics approaches were performed to determine the effect of depleting the complex in total cell lysate and in isolated DRMs. Consistently, the results showed an alteration in the protein and lipid composition of the DRMs in cells lacking both ERLIN1 and ERLIN2, and a perturbation of intracellular trafficking pathway and secretion. The omics data were also independently confirmed by imaging techniques, which revealed a morphological alteration of the ER and Golgi apparatus. Furthermore, the interactome of the complex was determined by endogenous pulldown followed by mass spectrometry. The organisation of the interaction between ERLINs, RNF170 and TMUB1-L could be deduced from the results. The organisation of the ERLINs-RNF170-TMUB1-L complex was further confirmed by independent bioinformatic approaches using AlphaFold.

In conclusion, the data demonstrate the importance of the ERLIN complex as an organiser of membrane lipids and proteins on the ER, particularly in the context of intracellular trafficking. Furthermore, a defined endogenous interactome was unravelled, revealing a role for ERLINs in tethering the interaction between TMUB1 and RNF170.

Abstrakt

ERLIN1 und ERLIN2 sind zwei Proteine des endoplasmatischen Retikulums (ER), die zur Stomatin/Prohibitin/Flotilin/HflKC (SPFH)-Familie gehören und einen 2 MDa großen Komplex bilden, der Cholesterin binden kann. Jedes ERLIN-Protein kann Berichten zufolge vier Cholesterinmoleküle binden, und die Lokalisierung des Komplexes an den detergensresistenten Membranen (DRM) des ER ist bekanntermaßen cholesterinabhängig. Mutationen in ERLIN1 oder ERLIN2 führen zu einer neurodegenerativen Erkrankung, der so genannten hereditären spastischen Paraplegie, einer seltenen Krankheit, bei der die Patienten aufgrund der Degeneration der langen Axone der Motoneuronen, die die willkürliche Bewegung steuern, nach und nach die Fähigkeit zu gehen verlieren. Die Ursache der Krankheit ist nach wie vor unklar, und der Schweregrad der Erkrankung ist von Patient zu Patient sehr unterschiedlich. In einigen Fällen entwickelt sich die Krankheit zu der schwereren neurodegenerativen Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose, so dass die Patienten fast keine Behandlung mehr erhalten. Die molekulare Funktion des ERLIN-Komplexes ist noch immer nicht vollständig geklärt. Bisher hat sich gezeigt, dass die ERLINs den ER-assoziierten Proteinabbau (ERAD) einiger Proteine, wie ITPR1 oder HMGCR, regulieren, während sie den Abbau anderer Proteine, wie im Fall des Insulin-induzierten Gens 1 (INSIG1), verhindern. Diese Proteine stellen eine Verbindung zwischen den ERLINs und der Kalzium- und Cholesterinhomöostase her, zwei streng regulierten Prozessen, von denen bekannt ist, dass sie bei neurodegenerativen Prozessen gestört sind.

In dieser Studie wurden eine doppelte Knock-out-Zelllinie für ERLIN1 und 2 sowie eine Rettungszelllinie, bei der beide Gene retroviral transduziert wurden, zur Untersuchung der Funktion des Komplexes verwendet. Es wurde eine Reihe von Multiomics-Ansätzen durchgeführt, um die Auswirkungen der Abreicherung des Komplexes im Gesamtzelllysat und in isolierten DRMs zu bestimmen. Die Ergebnisse zeigten übereinstimmend eine veränderte Protein- und Lipidzusammensetzung der DRMs in Zellen, denen sowohl ERLIN1 als auch ERLIN2 fehlten, sowie eine Störung des intrazellulären Trafficking und der Sekretion. Die Omics-Daten wurden auch unabhängig durch bildgebende Verfahren bestätigt, die eine morphologische Veränderung des ER und des Golgi-Apparats zeigten. Außerdem wurde das

Interaktom des Komplexes durch endogenen Pulldown und anschließende Massenspektrometrie bestimmt. Aus den Ergebnissen konnte die Organisation der Interaktion zwischen ERLINs, RNF170 und TMUB1-L abgeleitet werden. Die Organisation des ERLINs-RNF170-TMUB1-L-Komplexes wurde außerdem durch unabhängige bioinformatische Ansätze unter Verwendung von AlphaFold bestätigt.

Zusammenfassend zeigen die Daten die Bedeutung des ERLIN-Komplexes als Organisator von Membranlipiden und -proteinen am ER, insbesondere im Kontext des intrazellulären Traffics. Darüber hinaus konnte ein definiertes endogenes Interaktom entschlüsselt werden, das eine Rolle der ERLINs bei der Bindung der Interaktion zwischen TMUB1 und RNF170 aufzeigt.

Zusammenfassend zeigen die Daten die Bedeutung des ERLIN-Komplexes als Organisator von Membranlipiden und -proteinen im ER, insbesondere im Kontext des intrazellulären Traffics. Darüber hinaus konnte ein definiertes endogenes Interaktom entschlüsselt werden, das eine Rolle für ERLINs bei der Bindung der Interaktion zwischen TMUB1 und RNF170 aufzeigt.