

Characterization of neuropathological and proteomic changes caused by lack of SPG7

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln



vorgelegt von Giovanna Evangelista
aus Napoli, Italia

Köln, 2024

Abstract

Hereditary Spastic Paraplegia type 7 (HSP7) is a genetic neurodegenerative disease that results from mutations in the *SPG7* gene, which encodes a subunit of the mitochondrial *m*-AAA protease. This protease plays a central role in regulating mitochondrial homeostasis and protein quality control; in this complex, SPG7 assembles in the inner mitochondrial membrane with the homologous protein AFG3L2 and, in mice, with AFG3L1. A deficiency in SPG7 results in the dying-back axonal degeneration of corticospinal neurons, a phenomenon that entails the deterioration of the axon while the cell body remains intact and culminates in a progressive spastic-ataxic phenotype in the lower limbs. A fundamental initial step in elucidating the mechanisms of HSP7 is to explore the neuropathology and perturbed pathways downstream of the SPG7 deletion.

The first objective of my research was to identify the specific cell types involved in neurodegeneration and to elucidate the underlying molecular mechanisms that contribute to the disease phenotype, starting with a proteomic approach, with the aim of uncovering potential therapeutic strategies for counteracting the disease. After crossing the newly developed *eSpg7^{KO}* mouse model with a *UCHL1-eGFP* transgenic mouse, I obtained a transgenic *eSpg7^{KO}* mouse line expressing an eGFP in cortical motoneurons. Employing light microscopy, electron microscopy and correlative light-electron microscopy, I investigated the motor cortex and spinal cord of SPG7-deficient mice from the *eSpg7^{KO}* and *eSpg7^{KO};UCHL1-eGFP* lines to determinate the extent of degeneration and mitochondrial involvement in specific neuronal tracts, thereby excluding the involvement of the corticospinal tract and discovering the contribution of proprioceptive primary afferents in the phenotype of HSP7 in the *eSpg7^{KO}* mouse.

Proteomic analyses of human patients' fibroblasts and murine tissues, including laser-capture microdissected punches of motor cortex and cerebellar astrocytes enriched through FACS sorting, allowed for a comparison of all the proteomic dataset and helped to individuate recurrently changed proteins and possible substrate candidates of SPG7, among which the zinc transporter SLC30A9 and the MPC subunits MPC1 and MPC2.

Finally, experiments conducted in parallel on *Sarm1^{KO};eSpg7^{KO}* mice provided insight into the role of SARM1 in the SPG7-related disease. The results confirmed that the only tissue in which deletion of SARM1 temporarily ameliorates the phenotype is the murine cerebellum.

Abstract

Hereditäre spastische Paraplegie Typ 7 (HSP7) ist eine genetische neurodegenerative Erkrankung, die auf Mutationen im SPG7-Gen zurückzuführen ist. Letzteres kodiert eine Untereinheit der mitochondrialen *m*-AAA-Protease. Diese Protease spielt eine zentrale Rolle bei der Regulierung der mitochondrialen Homöostase und der Proteinqualitätskontrolle. In diesem Komplex lagert sich SPG7 in der inneren Mitochondrienmembran mit dem homologen Protein AFG3L2 und bei Mäusen mit AFG3L1 zusammen. Ein Defizit an SPG7 bedingt die axonale Degeneration kortikospinaler Neuronen, ein Phänomen, das den Abbau des Axons zur Folge hat, während der Zellkörper intakt bleibt. Das bringt zu einem progressiven spastisch-ataktischen Phänotyp in den unteren Extremitäten. Zur Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen von HSP7 ist es daher essenziell, die Neuropathologie und die gestörten Bahnen stromabwärts der SPG7-Deletion zu untersuchen.

Mein Forschungsvorhaben zielte darauf ab, die spezifischen Zelltypen zu identifizieren, die an der Neurodegeneration beteiligt sind, und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären, die zum Krankheitsphänotyp beitragen. Zu diesem Zweck wurde ein proteomischer Ansatz verfolgt, mit dem Ziel, potenzielle therapeutische Strategien zur Bekämpfung der Krankheit aufzudecken. Nach der Kreuzung des neu entwickelten *eSpg7KO*-Mausmodells mit einer *UCHL1-eGFP*-transgenen Maus wurde eine transgene *eSpg7KO*-Mauslinie generiert, die ein eGFP in kortikalen Motoneuronen exprimiert. Mittels Lichtmikroskopie, Elektronenmikroskopie und korrelativer Licht-Elektronenmikroskopie wurde der motorische Kortex und das Rückenmark von SPG7-defizienten Mäusen der Linien *eSpg7KO* und *eSpg7KO;UCHL1-eGFP* untersucht, um das Ausmaß der Degeneration und der mitochondrialen Beteiligung in bestimmten neuronalen Bahnen zu bestimmen. In der Folge konnte die Beteiligung des Kortikospinaltrakts ausgeschlossen und der Beitrag primärer propriozeptiver Afferenzen zum Phänotyp von HSP7 bei der *eSpg7KO*-Maus festgestellt werden.

Mittels Proteomanalysen von Fibroblasten menschlicher Patienten und murinen Geweben, einschließlich lasergestützter mikrodissasierter Stanzungen von motorischem Kortex und Kleinhirn-Astrozyten, die durch FACS-Sortierung angereichert wurden, wurde ein Vergleich aller proteomischen Datensätze ermöglicht. Dies half dabei, wiederkehrende Proteine und mögliche Substratkandidaten von SPG7 zu identifizieren, darunter den Zinktransporter SLC30A9 und die MPC-Untereinheiten MPC1 und MPC2.

Schließlich lieferten Experimente, die parallel an *Sarm1KO;eSpg7KO*-Mäusen durchgeführt wurden, Einblicke in die Rolle von SARM1 bei der mit SPG7 assoziierten Erkrankung. Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten, dass das Kleinhirn der Maus das einzige Gewebe ist, bei dem die Löschung von SARM1 den Phänotyp vorübergehend verbessert.