

Summary

The secretory pathway is one of the major trafficking pathways within the cell and its deregulation is associated with various diseases. The rhomboid intramembrane protease RHBDL4 is localized to the endoplasmic reticulum (ER), which represents the starting point of the secretory pathway. However, its cellular role and physiological function are only partially understood.

In a screen for endogenous RHBDL4 substrates, members of the p24 cargo receptor family were identified. In collaboration with a previous PhD student in the group, Julia D. Knopf, I characterized the p24 protein TMED7 as an endogenous RHBDL4 substrate. RHBDL4-mediated cleavage of TMED7 reduces the trafficking and consequently signaling of the TMED7 cargo toll-like receptor 4 (TLR4), which acts as an innate immune receptor. Thereby, RHBDL4 protects the organism from excessive TLR4 signaling. This has pathophysiological relevance, as a mutation in RHBDL4 that abrogates its regulation of TMED7 is linked to the Kawasaki syndrome, an inflammatory disorder that primarily affects children.

The identification of p24 proteins as RHBDL4 substrates provided a potential explanation for a previous finding from the group regarding induced ER export of pro transforming growth factor (TGF) α by catalytically active RHBDL4. While investigating the potential link between p24 processing and RHBDL4-mediated proTGF α ER export, I instead discovered a novel unconventional secretory mechanism involving the p24 protein TMED9 and GRASP65, which acts independently of RHBDL4. However, the physiological relevance of the mechanism remains to be shown.

In addition to the p24 proteins another group of cargo receptors was identified in the RHBDL4 substrate screen, the ER Golgi intermediated compartment (ERGIC) protein family. All three members are cleaved by RHBDL4 and in addition, two trafficking pathways linked to ERGICs are negatively regulated by RHBDL4, suggesting that processing of cargo receptors might be a broader mechanism for fine-tuning protein trafficking and secretion. In support of this hypothesis, an unbiased secretome analysis in RHBDL4 knockout cells revealed that lysosomal precursors were increasingly secreted upon loss of RHBDL4. I provide initial evidence that this effect is dependent on the processing of the lysosomal cargo receptor SORT1 by RHBDL4.

In summary, this thesis uncovered two different mechanisms that regulate protein trafficking, both of which are dependent on cargo receptors. Collectively, the results strongly support a model in which RHBDL4 fine-tunes specific trafficking pathways through the proteolytic processing of cargo receptors.

Zusammenfassung

Der Sekretionsweg ist einer der wichtigsten Transportwege innerhalb der Zelle, und seine Deregulierung wird mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht. Die Rhomboid-Intramembranprotease RHBDL4 ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert, das den Ausgangspunkt des sekretorischen Weges darstellt. Ihre zelluläre Rolle und physiologische Funktion sind jedoch nur teilweise bekannt.

In einem Screening für endogene RHBDL4-Substrate wurden Mitglieder der p24-Cargo-Rezeptorfamilie identifiziert. In Zusammenarbeit mit einer früheren Doktorandin der Gruppe, Julia D. Knopf, habe ich das p24-Protein TMED7 als endogenes RHBDL4-Substrat charakterisiert. Die durch RHBDL4 vermittelte Spaltung von TMED7 reduziert den Transport und damit die Signalaktivität des TMED7-Cargos Toll-like Rezeptor 4 (TLR4), der als Immunrezeptor fungiert. Auf diese Weise schützt RHBDL4 den Organismus vor einer übermäßigen TLR4 Signalaktivität. Dies hat pathophysiologische Bedeutung, da eine Mutation in RHBDL4, die die Regulierung von TMED7 aufhebt, mit dem Kawasaki-Syndrom in Verbindung gebracht wird, einer Entzündungsstörung, die vor allem Kinder betrifft.

Die Identifizierung von p24-Proteinen als RHBDL4-Substrate lieferte eine mögliche Erklärung für eine frühere Entdeckung der Gruppe bezüglich des induzierten ER-Exports von pro Transforming Growth Factor (TGF) α durch katalytisch aktives RHBDL4. Bei der Untersuchung des möglichen Zusammenhangs zwischen der Spaltung von p24-Proteinen und dem RHBDL4-vermittelten proTGF α -ER-Exports entdeckte ich stattdessen einen neuen unkonventionellen Sekretionsweg, an dem das p24-Protein TMED9 und GRASP65 beteiligt sind und der unabhängig von RHBDL4 abläuft. Die physiologische Relevanz dieses Weges muss jedoch noch nachgewiesen werden.

Zusätzlich zu den p24-Proteinen wurde im RHBDL4-Substrat-Screening eine weitere Gruppe von Cargo-Rezeptoren identifiziert, die ER Golgi Intermediate Compartment (ERGIC) Proteinfamilie. Alle drei Mitglieder werden von RHBDL4 gespalten, und darüber hinaus werden zwei mit den ERGICs verbundene Transportwege durch RHBDL4 negativ reguliert, was darauf hindeutet, dass die Verarbeitung von Cargo-Rezeptoren ein umfassenderer Mechanismus zur Feinabstimmung von Protein-Transport und -Sekretion sein könnte. Zur Untermauerung dieser Hypothese ergab eine unvoreingenommene Sekretomanalyse in RHBDL4-Knockout-Zellen, dass lysosomale Vorläuferproteine unter Knockout von RHBDL4 verstärkt sezerniert wurden. Wir liefern erste Beweise dafür, dass dieser Effekt von der Spaltung des lysosomalen Cargo-Rezeptors SORT1 durch RHBDL4 abhängt.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zwei verschiedene Mechanismen zur Regulierung des Proteintransports aufgedeckt, die beide von Cargo-Rezeptoren abhängig sind. Insgesamt

sprechen die Ergebnisse für ein Modell, in dem RHBDL4 durch die proteolytische Verarbeitung von Cargo-Rezeptoren spezifische Transportwege fein abstimmt.