

Summary

Maintaining protein homeostasis (proteostasis) is crucial to cellular function, organismal health, and stress resilience. As roughly one third of the proteome is targeted to the endoplasmic reticulum (ER), and given its sophisticated surveillance systems, the ER serves as a central hub for protein quality control. The ER-resident intramembrane protease RHBDL4 is a proteostasis factor that has been assigned a broad functional spectrum in the control of protein quality and quantity. However, until recent, a lack of *in vivo* systems has prevented from understanding the physiological role of RHBDL4.

In this thesis, while further investigating the role of RHBDL4 in modulating secretion dynamics within the early secretory pathway, I contributed to the characterisation of the COPII adapter protein TMED7, which we recently identified as a client of RHBDL4-mediated ER-associated degradation (ERAD). Importantly, I established an *ex cellulo* assay that allowed the detection of substrate fragments generated by endogenous RHBDL4. Furthermore, we demonstrate that RHBDL4-dependent proteolysis of TMED7 is of physiological relevance to the regulation of TLR4-mediated innate immunity.

RHBDL4 processes a broad spectrum of substrates, but how the protease recognises its diverse set of substrates for cleavage is incompletely understood. I aimed to understand which substrate properties govern the processing of physiological substrates by RHBDL4 and contributed to revealing that the TMED7 cleavage site is defined by a specific sequence motif. Moreover, my data indicate that RHBDL4 selects orphan TMED7 for cleavage, potentially due to altered transmembrane dynamics being recognised by RHBDL4 or promoting local unfolding, or enabled relocation of the cleavage site to the RHBDL4 active site.

Despite the importance of RHBDL4 in proteostasis and innate immunity, surprisingly little is known about how RHBDL4 is controlled. Using a combination of immunoprecipitation, steady-state, and kinetic analysis in Hek293T cells, I demonstrate that processing of TMED7 by ectopic and endogenous RHBDL4 is controlled by substrate ubiquitination.

To gain further mechanistic insight, I employed a proteomics-based approach to define the interactome of endogenous RHBDL4. This revealed interactions with several canonical ERAD factors and components of the ubiquitination machinery. Validation experiments confirmed that RHBDL4 forms distinct E3 ubiquitin ligase-containing ERAD complexes, likely organised in regulatory multiprotein modules. Immunoprecipitation and kinetic assays in a panel of E3 ubiquitin ligase-deficient Hek293T cells further suggests that a complex E3 ubiquitin ligase network controls RHBDL4-dependent processing of TMED7.

In summary, this thesis supports a model in which RHBDL4 substrate selection is determined by an interplay between direct recognition of substrate features by the protease and E3 ubiquitin ligase-mediated recognition within the RHBDL4 ERAD complex. Together, these mechanisms safeguard the fidelity of irreversible proteolysis by RHBDL4 and link its activity to the regulation of TLR4-mediated innate immunity.

Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Proteinhomöostase (Proteostase) ist entscheidend für Zellfunktion, Gesundheit und Stressresistenz. Das endoplasmatische Retikulum (ER) verfügt über ausgeklügelte Überwachungssysteme und dient als Zentrum für die Qualitätskontrolle von Proteinen. Durch ihr breites Funktionsspektrum in der Kontrolle von Proteinqualität und -quantität ist die Intramembranprotease RHBDL4 ein wichtiger Proteostasefaktor im ER. Ihre physiologische Relevanz war jedoch bislang unklar.

Um die Rolle von RHBDL4 im frühen sekretorischen Weg besser zu verstehen, habe ich in dieser Arbeit zur Charakterisierung des COPII-Adapterproteins TMED7 beigetragen, welches wir zuvor als Substrat des durch RHBDL4 vermittelten ER-assoziierten Abbauwegs (ERAD) identifiziert haben. Insbesondere habe ich ein *ex cellulo* System zum Nachweis von durch endogenes RHBDL4 erzeugten Substratfragmenten etabliert. Weiterhin haben wir gezeigt, dass die Spaltung von TMED7 durch RHBDL4 wichtig für die Regulation der TLR4 abhängigen angeborenen Immunantwort ist.

Da bisher kaum bekannt ist, wie RHBDL4 seine Substrate erkennt, zielte diese Arbeit auf ein besseres Verständnis von Substrateigenschaften ab, die die Spaltung von physiologischen Substraten durch RHBDL4 bestimmen. In diesem Kontext habe ich zu der Charakterisierung der TMED7 Spaltstelle beigetragen, die durch ein spezifisches Sequenzmotif gekennzeichnet ist. Außerdem prozessiert RHBDL4 vermutlich vereinzelte TMED7 Moleküle, die nicht durch Komplexpartner gebunden werden. Möglicherweise wird dies durch das Erkennen einer veränderten Dynamik der Transmembrandomäne, durch lokales Entfalten der Proteinstruktur oder dadurch, dass die Schnittstelle in das aktive Zentrum der Protease gelangen kann, ermöglicht. Trotz seiner wichtigen Rollen ist unklar, wie RHBDL4 reguliert wird. Experimente in Hek293T Zellen zeigten, dass Substratubiquitinierung den RHBDL4 vermittelten Abbau fördert. Um den zugrundeliegenden Mechanismus besser zu verstehen, habe ich das Proteininteraktom von endogenem RHBDL4 mittels Massenspektrometrie analysiert. Dadurch wurden mehrere zentrale ERAD Faktoren und Komponenten der Ubiquitinierungsmaschinerie als Interaktionspartner identifiziert. Validierungsexperimente bestätigten, dass RHBDL4 mit E3 Ubiquitin Ligasen interagiert und ERAD Komplexe bildet, die vermutlich regulatorische Module bilden. Eine Kombination aus Immunpräzipitationen und kinetischen Assays in E3 Ubiquitin Ligase Knockout Zellen führte weiterhin zu der Vorstellung, dass ein komplexes Netzwerk aus E3 Ubiquitin Ligasen den RHBDL4 abhängigen Abbau von TMED7 kontrolliert.

Zusammengefasst geht aus dieser Dissertation ein Modell hervor, in dem die Erkennung von RHBDL4 Substraten durch ein Zusammenspiel von direkter Erkennung von Substrateigenschaften durch die Protease und Erkennung durch E3 Ubiquitin Ligasen im RHBDL4 Komplex bestimmt wird. Die hier beschriebenen Mechanismen stellen die Genauigkeit irreversibler Proteolyse sicher und bringen RHBDL4 in Verbindung mit der Regulation der TLR4 vermittelten angeborenen Immunantwort.