

## Abstract

Protein S-palmitoylation is a post-translational modification that regulates the function, trafficking, localization, and stability of a multitude of proteins. This reversible modification involves the covalent attachment of the 16-carbon fatty acid palmitic acid to cysteines and is catalyzed by the 23 ZDHHC S-acyltransferases in humans. Dysregulation of protein S-palmitoylation has been associated with many human diseases, such as neurological and immunological disorders and cancer. The regulatory role of palmitoylation in cancer is especially of great interest as several cancer-associated proteins require this lipidation for proper subcellular localization and functionality. Therefore, the development of new molecular tools to interfere with protein palmitoylation could be useful in the study of the cellular and pathogenic role of protein palmitoylation and represent a potential therapeutic approach. In this regard, so-called cell-permeable DC peptides were investigated, which consist of the cell-penetrating peptide sC18\* fused to a potential palmitoylation motif "X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>DHHCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>" derived from the ZDHHC palmitoyltransferases with the aim to competitively interfere with the palmitoylation of substrate proteins.

Three promising DC peptide candidates were further characterized within this thesis regarding their bioactivity. All DC peptides displayed cytotoxic effects and high cellular internalization into various cell lines and 3D breast cell spheroids dependent on the cysteine within the DHHC motif. Further investigations to study the role of the cysteine, using the peptide DC-2 as a model peptide, excluded cellular uptake dependent on cell surface thiols or peptide dimerization via disulfide formation in the extracellular space. In fact, the high internalization of the peptide was shown to be dependent on an intact DHHC motif and a functional intracellular palmitoylation machinery. In addition, all three DC peptides were palmitoylated *in vitro*, demonstrating that the chosen motif indeed served as a palmitoylation motif. Inside the cell, DC-2 partially localized to the Golgi and ER, the main subcellular sites of palmitoyltransferases. Finally, the effect of DC-2 on palmitoylated proteins was investigated. A whole-cell proteome analysis revealed that DC-2 mainly reduced the abundance of reported palmitoylated proteins. Moreover, DC-2 seemed to affect EGF receptor activation and the subcellular localization of the small GTPase HRas, which could be linked to DC-2 potentially interfering with the palmitoylation of these proteins. Together, these results highlight the potential of DC-2 to manipulate proteins requiring palmitoylation, making it a promising candidate with possible therapeutic potential to further explore in the future.

## Zusammenfassung

Protein S-Palmitoylierung ist eine posttranslationale Modifikation, die die Funktion, den Transport, die Lokalisierung und die Stabilität einer Vielzahl von Proteinen reguliert. Diese reversible Modifikation beinhaltet die kovalente Bindung der 16-Kohlenstoff langen Fettsäure Palmitinsäure an Cysteine und wird im Menschen durch die 23 ZDHHC S-Acyltransferasen katalysiert. Eine Dysregulation der Protein-S-Palmitoylierung wurde mit vielen menschlichen Krankheiten in Verbindung gebracht, unter anderem neurologische und immunologische Erkrankungen und Krebs. Insbesondere die regulatorische Rolle der Palmitoylierung bei Krebs ist von großem Interesse, da mehrere mit Krebs assoziierte Proteine diese Lipidierung für eine korrekte subzelluläre Lokalisierung und Funktionalität benötigen. Daher könnte die Entwicklung neuer molekularer Werkzeuge zur Beeinflussung der Proteinpalmitylierung bei der Untersuchung der zellulären und pathogenen Rolle der Proteinpalmitylierung nützlich sein und einen möglichen therapeutischen Ansatz darstellen. Diesbezüglich wurden sogenannte zellpermeable DC Peptide untersucht, die aus dem zellpenetrierenden Peptid sC18\* bestehen, das an ein potenzielles Palmitylierungsmotiv „X<sub>1</sub>X<sub>2</sub>DHHCX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>“ gebunden ist, welches von den ZDHHC Palmityltransferasen abgeleitet ist, mit dem Ziel, die Palmitylierung von Substratproteinen kompetitiv zu stören.

Drei vielversprechende DC Peptidkandidaten wurden im Rahmen dieser Arbeit näher auf ihre Bioaktivität untersucht. Alle DC Peptide zeigten zytotoxische Effekte und eine hohe zelluläre Internalisierung in verschiedene Zelllinien und 3D-Brustzellspheroide, abhängig vom Cystein innerhalb des DHHC-Motivs. Weitere Untersuchungen zur Rolle des Cysteins unter Verwendung des Peptids DC-2 als Modellpeptid schlossen eine zelluläre Aufnahme in Abhängigkeit von Zelloberflächen-Thiolen oder eine Peptiddimerisierung durch Disulfidbildung im extrazellulären Raum aus. Tatsächlich wurde nachgewiesen, dass die hohe Internalisierung des Peptids von einem intakten DHHC-Motiv und einer funktionierenden intrazellulären Palmitylierungsmaschinerie abhängt. Darüber hinaus wurden alle drei DC Peptide *in vitro* palmityliert, was darauf hindeutet, dass das gewählte Motiv tatsächlich als Palmitylierungsmotiv diene. In der Zelle lokalisierte DC-2 unter anderem am Golgi-Apparat und Endoplasmatischen Retikulum, den wesentlichen subzellulären Lokalisationen der Palmityltransferasen. Schließlich wurde die Wirkung von DC-2 auf palmitylierte Proteine untersucht. Eine Proteomanalyse ergab, dass DC-2 die Menge von berichteten palmitylierten Proteinen hauptsächlich verringerte. Darüber hinaus schien DC-2 die Aktivierung des EGF-Rezeptors und die subzelluläre Lokalisierung der kleinen GTPase HRas zu beeinflussen, was damit zusammenhängen könnte, dass DC-2 möglicherweise die Palmitylierung dieser Proteine stört. Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial von DC-2, Proteine zu manipulieren, die eine Palmitylierung benötigen, und machen es zu einem

vielversprechenden Kandidaten mit möglichem therapeutischem Potenzial für zukünftige Forschung.