

ABSTRACT

Acyl protein thioesterase 1 and 2 (APT1, APT2) are key players of the regulation of reversible palmitoylation, thereby affecting protein localization, function and stability. Pathways which are already known to be dependent on functional de-/palmitoylation are GPCR pathways working in concert with heterotrimeric G-proteins and signaling pathways mediated by small GTPases. In this study, the impact of impaired depalmitoylation on migration and motility, mediated by the chemokine receptor CXCR4, was investigated in malignant B cell lines unravelling a role for APT1 in this process. Knockdown (KD) of APT1 in Nalm-6 cells led to a more motile and activated phenotype in unstimulated condition, indicated by increased migration, development of lamellipodia and constitutive phosphorylation of ERK1/2. Decreased RhoA activity appeared to further promote the more motile phenotype in these cells. Although the CXCR4 surface expression was decreased in APT1KD cells in respect to their cell size, internalization after SDF-1 stimulation proceeded to a higher extent. Altogether, it was demonstrated that APT1 is involved in the regulation of SDF-1 dependent and independent migration, while impaired depalmitoylation affects the involved signaling pathways on multiple sites.

Another main aspect which was investigated in this study is the impact of de-/palmitoylation in the regulation of intercellular communication of B cells with focus on the two isoforms of Rab27. Rab27a/b could be identified as palmitoylated on the C-terminal XCXC motif, while the latter cysteine is palmitoylated preferentially. Site-directed mutagenesis revealed that lipid modification of both cysteines is crucial for correct localization and function, suggesting a combination of geranylgeranylation (GG) and palmitoylation. Evidence for a potential interaction between Rab27a and APT1 was demonstrated via FLIM-FRET microscopy, suggesting an alternative Rab activation cycle.

Moreover, the effect of impaired depalmitoylation on protein targeting to extracellular vesicles (EVs) was investigated. Inhibition of APT1 and APT2 function by Palmostatin B (PB) led to increased sorting of potentially palmitoylated proteins into EVs. Knockdown of APT1 and APT2, respectively, revealed differential roles for both proteins on protein sorting and vesicle release. While APT1 is implicated in protein sorting, APT2 is rather involved in the regulation of vesicle release. In summary, the results provide evidence for a regulatory role of palmitoylation in ESCRT independent protein sorting and EV release.

KURZZUSAMMENFASSUNG

Die Acyl-Protein-Thioesterasen 1 und 2 (APT1, APT2) spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation der reversiblen Depalmitoylierung. Dabei beeinflussen sie die Lokalisation, Funktion und Stabilität von Proteinen. Signalwege die von funktionierender De-/Palmitoylierung abhängig sind, sind u.a G-Protein-gekoppelte Rezeptor vermittelte Signale die über heterotrimere G-Proteine weitergeleitet werden und kleine GTPasen-vermittelte Signalkaskaden. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von verminderter Depalmitoylierung auf Migration und Motilität, vermittelt durch den Chemokinrezeptor CXCR4, in malignen B-Zelllinien untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass APT1 bei der Regulation dieser Prozesse eine Rolle spielt. Knock-down (KD) von APT1 in Nalm-6 Zellen führte zu einem motileren und aktivierteren Phänotyp, selbst ohne vorherige Stimulation der Zellen. Dieser zeigte sich durch eine erhöhte Migration der Zellen, Ausbildung von Lamellopodien und eine konstitutive Phosphorylierung von ERK1/2. Eine verminderte RhoA Aktivität schien dabei die erhöhte Motilität zu begünstigen. Obwohl die Oberflächenexpression von CXCR4 unter Berücksichtigung der Zellgröße in APT1KD Zellen vermindert war, wurde der Rezeptor durch Stimulation mit SDF-1 in höherem Maße internalisiert. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass APT1 in die Regulation von SDF-1-abhängiger und -unabhängiger Migration involviert ist, wobei eine verminderte Depalmitoylierung die betreffenden Signalwege an verschiedenen Stellen beeinflusst.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der Einfluss von De-/Palmitoylierung auf die Regulation der interzellulären Kommunikation von B-Zellen mit Hinblick auf die beiden Isoformen von Rab27 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass Rab27a/b am C-terminalen XCXC Motiv palmitoyliert sind, wobei eine Präferenz für die Palmitoylierung des letzten Cysteins besteht. Mittels gerichteter Mutagenese wurde gezeigt, dass die Lipidmodifikation beider Cysteine für eine korrekte Lokalisation und Funktion entscheidend ist, was auf eine Kombination von Geranylgeranylierung und Palmitoylierung schließen lässt. Mittels FLIM-FRET Mikroskopie konnte eine mögliche Interaktion von Rab27a mit APT1 gezeigt werden, was auf die Existenz eines alternativen Rab Aktivierungszyklus schließen lässt.

Darüber hinaus wurde der Effekt der verminderten Depalmitoylierung auf die Sortierung von Proteinen in extrazelluläre Vesikel (EVs) untersucht. Die Inhibierung von APT1 und APT2 mittels Palmostatin B (PB) führte dies zu einer verstärkten Sortierung von potentiell palmitoylierten Proteinen in EVs. Der KD von APT1 oder APT2 zeigte, dass beide Proteine auf verschiedene Weise in die Regulation von Proteinsortierung und Vesikelsekretion involviert sind. Dabei steht APT1 in Zusammenhang mit Proteinsortierung, wohingegen APT2 eher an der Sekretion von Vesikeln beteiligt ist. Zusammenfassend liefern diese Ergebnisse Hinweise auf eine regulatorische Rolle der Palmitoylierung für ESCRT-unabhängige Proteinsortierung und Vesikelsekretion.