



S-ACILACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA TIPO II EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS POR

Sabrina Vanesa Chumpen Ramirez

Director: Dr. Javier Valdez Taubas

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA (CIQUIBIC-CONICET)

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

2016

Director de Tesis:

Dr. Javier Valdez Taubas

Comisión de Tesis:

Dra. Marta Hallak

Dra. Fabiana Oliva

Dra. Cecilia Álvarez

Evaluador Externo:

Dra. María Corvi

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi director de tesis, el Dr. Javier Valdez, por darme un lugar en su laboratorio y la oportunidad de realizar esta tesis doctoral. Agradezco sus enseñanzas, su confianza, la libertad para dejarnos aprender a nuestra manera y su paciencia durante todos estos años. Muchas gracias por transmitir ese entusiasmo infinito por la ciencia.

Agradezco también a los miembros de mi comisión de tesis, la Dra. Marta Hallak, la Dra. Cecilia Álvarez y la Dra. Fabiana Oliva por demostrar siempre interés y entusiasmo en mis resultados. Valoro mucho sus aportes durante este proceso, incluso durante la escritura de esta tesis, ya que también fue una instancia importante de aprendizaje.

Agradezco a la Dra. María Corvi por mostrar interés en mi trabajo y estar presente en la defensa del mismo. Muchas gracias.

Agradezco mucho al Dr. Maccioni con quien no solo compartimos el laboratorio sino también discusiones productivas, para las cuales siempre está bien predispuesto. Es fuente de inspiración constante para todos nosotros. Valoro mucho su interés y aportes en este trabajo de tesis.

Por supuesto agradezco a mis compañeros de laboratorio, Aye, Consu, Gonza y Luz. Me encantó trabajar con ustedes. Aye, muchas gracias por todo, por tu amistad, tus enseñanzas, por tener y transmitir confianza a mis resultados, por creer en mí y en mi trabajo. Ha sido un privilegio trabajar a tu lado. Muchas gracias por seguir estando a la distancia. Consu, gracias por tu compañerismo y buena predisposición, por buscarle el lado positivo a las cosas e inspirarme confianza cada vez que la necesité, muchas gracias por la amistad brindada, la valoro y aprecio mucho. Gonza, gracias por la buena onda de todos los días, por tu frescura y amistad, gracias por hacer de nuestro laboratorio un lugar tan agradable. Luz, la peque del grupo, gracias por tu alegría y por transmitir tanto entusiasmo al laboratorio, sin duda los días son más divertidos cuando estás presente. A los que todavía están y también a los que ya se fueron Dani, Rodri y Euge, ha sido un placer y un privilegio trabajar con compañeros como ustedes pero aún más con amigos como ustedes, los quiero mucho, gracias por hacer de éste, el mejor lugar de trabajo.

A mi gran amiga Fabi, gracias por estar siempre a mi lado, por acompañarme en este proceso incluso a la distancia. Agradezco cada momento compartido, tu amistad, tu simpleza y tu ayuda siempre desinteresada. Muchas gracias amiga.

A las amigas que hice en el ciqui, Lau, Rosa, Chani, Laurita, Lu, Ceci, Mauge, muchísimas gracias por todos los buenos momentos compartidos.

Agradezco al laboratorio de Betty Caputto, no solo por ser buenos compañeros sino también por ser tan buenos amigos y compartir tantos momentos lindos conmigo.

Agradezco a todos los miembros del CIQUIBIC, becarios, profes, personal no docente, Piti, Dani, Susi, Gabi, Ceci, Carlitos y Marce, gracias por estar siempre dispuestos a ayudar. Gracias por ser una gran familia y un excelente grupo de trabajo.

Gracias a mis amigas incondicionales, Andrew, Vane, Pichi, Pao y Pri, por la paciencia y por estar siempre presentes, aunque yo suelo ser de una de las que a veces está ausente. Muchas gracias chicas, las quiero mucho.

A mi familia, porque son un pilar fundamental en mi vida, gracias por acompañarme en este camino. A mis hermanas, Lucía y Casandra, y a mi hermano Lizandro, gracias por mostrar siempre su amor incondicional. A mi sobrina Solcito por alumbrar nuestras vidas, incluso cuando los días son grises. A mis padres Marta y Lizandro, por acompañarme en mis decisiones y darme siempre la confianza para seguir adelante. Gracias por enseñarme desde siempre a valorar la educación y aun más, muchas gracias por valorar tanto mi esfuerzo.

Al resto de mi familia, mi tía Vita, mis primos y sobrinos, gracias por demostrar siempre su apoyo y confianza en mí, son sin duda parte fundamental de mi vida. Aunque ya no estén con nosotros, agradezco mucho a mis abuelos, a mi abuela por confiar siempre en mí y mi capacidad para hacer esto, y a mi abuelo por transmitir siempre su entusiasmo por la lectura, el conocimiento y el estudio de cosas nuevas, fue una fuente de inspiración muy importante.

No puedo olvidarme de la persona que elegí para compartir este camino, Gonza, gracias por acompañarme de cerca durante todo este proceso, gracias por la paciencia y el buen humor que siempre superaron mis momentos difíciles. Gracias por entender lo significa todo esto, aun cuando estas páginas te resultaron incomprensibles.

Gracias Alicia por integrarme en tu familia y formar parte de la mía. Gracias por tu ayuda incondicional, buena predisposición y por estar siempre presente.

Nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda de las Instituciones, agradezco profundamente al CONICET por la beca doctoral otorgada, a la Facultad de Ciencias Químicas y al CIQUIBIC por brindarme un lugar de trabajo, sin el cual, hoy no tendría la formación que tengo.

Muchas gracias.

Tabla de contenido

Lista de Publicaciones.....	i
Lista de Abreviaturas	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	v
INTRODUCCIÓN	- 1 -
Maquinaria de glicosilación celular	- 2 -
Familia de las glicosiltransferasas.....	- 4 -
Tráfico de las glicosiltransferasas hacia el complejo de Golgi	- 6 -
Localización sub-Golgi de las glicosiltransferasas	- 7 -
Complejos funcionales de las glicosiltransferasas	- 8 -
Modificaciones post-traduccionales de las glicosiltransferasas	- 9 -
Otras proteínas transmembrana tipo II: SNAREs transmembrana.....	- 10 -
S-acilación de proteínas	- 10 -
Sustratos de la S-acilación	- 11 -
Familia de las proteínas DHHC	- 12 -
Otros miembros de la familia DHHC.....	- 14 -
Funciones de la S-acilación.....	- 16 -
PLANTEO GENERAL DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS	- 19 -
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	- 22 -
CAPÍTULO I: S-ACILACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA TIPO II EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS.....	- 23 -
I A. S-acilación de glicosiltransferasas de gangliósidos en células de mamíferos.....	- 23 -
1. Las glicosiltransferasas de mamíferos poseen cisteínas conservadas en su región N- terminal	- 23 -
2. Las cisteínas conservadas de las glicosiltransferasas de gangliósidos están S-aciladas en células CHO-K1	- 25 -
3. Las glicosiltransferasas son sustrato de la S-acilación.....	- 29 -
4. La S-acilación del Ntd de GalNAc-T ocurre en el retículo endoplásmico.....	- 31 -
5. Ensayos Funcionales de la S-acilación en glicosiltransferasas de gangliósidos	- 33 -
5A. La S-acilación no afecta sustancialmente la localización subcelular de las glicosiltransferasas.	- 33 -
5B. Sial-T4 forma parte de un complejo funcional de manera independiente a su estado de S-acilación.....	- 35 -
5C. La actividad de Sial-T4 no estaría sustancialmente afectada por la S-acilación de la proteína.....	- 37 -
6. Estudio de DHHC4 como posible Palmitoiltransferasa de proteínas transmembrana tipo II	- 38 -

6A. Generación de un anticuerpo contra DHHC4 humana.....	- 40 -
6B. Ensayos funcionales de DHHC4	- 41 -
7. Discusión.....	- 43 -
I B. S-acilación de SNAREs transmembrana en células de mamíferos	- 47 -
1. Introducción	- 47 -
2. La sobreexpresión de DHHC4 afecta de manera diferencial el estado de S-acilación de Sintaxina 6 y Sintaxina 1A.....	- 48 -
3. Discusión.....	- 50 -
CAPÍTULO II: ESTUDIOS DE LA ESPECIFICIDAD EN LA S-ACILACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 52 -
1. Introducción	- 52 -
2. La función de Pfa4 no puede ser reemplazada por otras PATs.....	- 53 -
3. La mutación de posiciones determinantes de especificidad (PDEs) en el dominio DHHC genera falta de función en Swf1.....	- 55 -
4. Discusión.....	- 57 -
CONCLUSIONES	- 61 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 64 -
Capítulo I.....	- 65 -
Líneas celulares utilizadas.....	- 65 -
Plásmidos	- 65 -
Transfección de Células	- 66 -
Ensayo de intercambio del grupo acilo por biotina (ABE)	- 66 -
Microscopía de Fluorescencia.....	- 67 -
Ensayo de Co-inmunoprecipitación	- 68 -
Actividad <i>in vitro</i> de Sial-T4.....	- 69 -
Ensayo de Pegilación Directa.....	- 69 -
Capítulo II y Anexo I	- 70 -
Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizadas.....	- 70 -
Plásmidos	- 70 -
Ensayos de Crecimiento.....	- 71 -
Detección de las PATs	- 71 -
Ensayo de biotilación directa	- 71 -
Ensayo de intercambio del grupo acilo por biotina (ABE) e Inmunoprecipitación	- 72 -
Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y Western blot	- 72 -
Anticuerpos utilizados en Western blot	- 73 -
Lista y secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo	- 73 -

ANEXO I: APORTES AL ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA REACCIÓN DE LA S-ACILACIÓN.....	- 75 -
1. Introducción	- 75 -
2. La mutación de la cisteína conservada en Pfa4 no provoca pérdida total de la función-	76 -
-	
3. Las mutantes DHHA y DHHR no están S-aciladas	- 78 -
4. Discusión.....	- 79 -
BIBLIOGRAFÍA	- 82 -

Lista de Publicaciones

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis doctoral fueron publicados en las siguientes revistas:

- **Specificity of transmembrane protein palmitoylation in yeast**

González Montoro A., Chumpen Ramirez S., Quiroga R., Valdez Taubas J.

PLoSOne. 2011. 24; 6(2):e16969.

- **The canonical DHHC motif is not absolutely required for the activity of the yeast S-acyltransferases Swf1 and Pfa4**

González Montoro A., Chumpen Ramirez S. and Valdez Taubas J.

JBC.2015 Sep 11;290(37):22448-59. doi: 10.1074/jbc.M115.651356.

Lista de Abreviaturas

ABE	Ensayo de intercambio de acilo por biotina
APT	Proteína Acil Tioesterasa
BFA	Brefeldina A
CHO-K1	Células de Ovario de Hamster Chino
COP	Complejo proteico de cubierta
DHHC-CRD	Dominio rico en cisteínas Asp-Hs-His-Cis
GalNAc-T	UDP-GalNAc:lactosilceramida/GM3/GD3 β -1,4-N-acetilgalactosaminil transferasa
Gal-T2	UDP-Gal:glucosilceramida β -1,4-galactosiltransferasa
GFP	Proteína Fluorescente Verde (Green Fluorescent Protein)
GTPasa	Proteína con actividad hidrolítica de GTP
HA	Nonapéptido (YPYDVPDYA) de la proteína hemaglutinina del virus influenza
mCherry	Proteína fluorescente monomérica Cherry
Ntd	Dominio NH ₂ -terminal
PAT	Palmitoiltransferasa
RFP	Proteínas Fluorescente Roja (Red Fluorescent Protein)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato de sodio)
shRNA	ARN pequeño de doble cadena
Sial-T1	CMP-NeuAc:lactosilceramida sialiltransferasa
Sial-T2	CMP-NeuAc:GM3 sialiltransferasa
Sial-T4	CMP-NeuAc: GA1/GM1/GD1b/GT1c sialiltransferasa
SNAREs	Receptores de proteínas solubles de unión al factor sensible a la N-etilmaleimida
DC	Dominio citoplasmático
TGN	red de trans Golgi
TMD	Dominio transmembrana

Resumen

Las glicosiltransferasas residentes en el complejo de Golgi, son proteínas transmembrana tipo II encargadas de catalizar la adición de residuos de azúcar sobre lípidos o proteínas. La función de estas enzimas es crucial, ya que determina desde el correcto plegamiento de las proteínas, hasta la síntesis de los glicoesfingolípidos que componen la membrana plasmática. La síntesis de glicoesfingolípidos sialilados o gangliósidos ha sido ampliamente estudiada, ya que éstos se han visto involucrados en procesos fisiológicos relevantes, como la diferenciación celular y la transducción de señales pero también han sido relacionados a la patogénesis de trastornos neurológicos como el síndrome de Guillain-Barré.

Observaciones realizadas en nuestro laboratorio sugirieron la presencia de residuos de cisteínas que podrían estar S-aciladas en numerosas glicosiltransferasas, lo que impulsó el estudio de esta modificación ya que, hasta el momento, no ha sido reportado ningún tipo de modificación lipídica en miembros de esta familia.

La S-acilación de proteínas es una modificación post-traduccional que consiste en la adición de una molécula lipídica de cadena larga sobre residuos de cisteína, a través de un enlace tioéster. Esta es la única modificación lipídica reversible y, por lo tanto, susceptible a ser regulada. En los últimos años el interés por la S-acilación ha incrementado ya que esta modificación se ha visto involucrada en numerosos procesos de gran relevancia biológica, como la transducción de señales y la transmisión sináptica pero también en procesos patológicos, como el retardo mental y distintos tipos de cáncer. Esta modificación permite el anclaje estable de proteínas solubles a las membranas biológicas pero para proteínas transmembrana, el rol de la S-acilación no es tan claro y en muchos casos se desconoce.

La S-acilación de otras proteínas transmembrana tipo II, como las SNAREs transmembrana, ha sido identificada en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* pero solo para una de ellas se ha determinado el rol de esta modificación. Las SNAREs transmembrana también están S-aciladas en mamíferos pero la información respecto a la función de esta modificación es muy escasa. Si bien no está descrita una secuencia consenso para la S-acilación, la modificación de este tipo de proteínas ocurre sobre cisteínas que se encuentran localizadas en el borde citoplasmático, adyacentes al dominio transmembrana.

Mediante ensayos *in silico* evidenciamos la presencia de cisteínas conservadas en el dominio N-terminal de numerosas glicosiltransferasas, cercanas al borde transmembrana. Esta localización característica, sugirió que podrían ser sustratos de la S-acilación. Nuestros resultados experimentales indican que miembros de esta familia son modificados sobre esos residuos conservados, lo que nos permite postular a la S-acilación como una modificación lipídica novedosa en la familia de las glicosiltransferasas. Además, encontramos que la modificación de GalNAc-T y muy posiblemente la de otros miembros, ocurre en el retículo endoplásmico. Esto es importante ya que no se conoce la palmitoiltransferasa que cataliza la S-acilación de

proteínas transmembrana tipo II en células de mamíferos y nuestros estudios apuntan como principal candidato a DHHC4, una Palmitoiltransferasa localizada en el retículo endoplásmico. En este trabajo mostramos que DHHC4 es capaz de reconocer y S-acilar a cisteínas con la localización característica en SNAREs transmembrana, por lo cual, es muy posible que sea la aciltransferasa encargada de modificar otras proteínas transmembrana tipo II, incluyendo las glicosiltransferasas.

Abstract

Glycosyltransferases are type II transmembrane proteins that catalyze the transfer of sugar residues to lipids and proteins. They are crucial to the cell homeostasis because glycosylation determines the proper folding of proteins and the synthesis of glycosphingolipids that compose the plasma membrane. Sialylated glycosphingolipids or gangliosides are involved in many physiological processes, like cell differentiation and signal transduction, but also to pathological processes like the Guillain-Barré syndrome, and thus they have been extensively studied.

Our observations suggest that many glycosyltransferases possess cysteine residues that could in principle be S-acylated. This is interesting because lipid modifications in this protein family have not been reported.

Protein S-acylation is a widespread posttranslational modification that consists in the attachment of long chain fatty acids, often palmitate, to cysteine residues through a thioester bond. S-acylation is the only lipid modification that is reversible and thus susceptible to regulation. The interest in this modification has increased in recent years because it is involved in many biological processes such as signal transduction and synaptic transmission, as well as pathological processes like mental retardation and different kinds of cancer.

S-acylation is necessary for the attachment of proteins to biological membranes but for transmembrane proteins, the role of S-acylation is not clear and in many cases it has not been determined.

S-acylation of other type II transmembrane proteins, like transmembrane SNAREs, has been reported in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* but the role of this modification is only known for one of them. S-acylation was also identified in mammalian transmembrane SNAREs but the functional consequences are also poorly understood.

We show evidence that many glycosyltransferases possess conserved cysteines sharing the localization of S-acylated cysteines present in transmembrane SNAREs. We demonstrate that members of ganglioside glycosyltransferases family are modified and postulate the S-acylation as a novel lipid modification present in glycosyltransferases family. We also found that S-acylation of GalNAc-T, and probably the modification of other members, occur at the endoplasmic reticulum. The palmitoyltransferase that modify type II transmembrane proteins it is not known, but our results point as the principal candidate to DHHC4, a palmitoyltransferase localized at the endoplasmic reticulum. We show that DHHC4 can modify cysteine residues at the transmembrane border of SNAREs, so it is possibly the acyltransferase involved in the S-acylation of glycosyltransferases.

INTRODUCCIÓN

El cerebro de los vertebrados se encuentra altamente enriquecido en glicoesfingolípidos (GSLs), compuestos por ceramida y un mono- u oligosacárido de cadena corta, especialmente en gangliósidos que se caracterizan por contener grupos de ácido siálico. Los gangliósidos están involucrados en numerosos procesos fisiológicos como el crecimiento, la diferenciación, la migración celular y la apoptosis, ya que son intermediarios en la transducción de señales y modulan las interacciones entre las células de un tejido y entre las células con su matriz extracelular [1-3]. También actúan como receptores de virus y toxinas como las toxinas colérica, tetánica y botulínica y como receptores de lectinas y anticuerpos [4-7], por lo que se han visto involucrados en numerosas patologías humanas. Particularmente, el síndrome neuropatológico de Guillain-Barré es causado por la acción de anticuerpos que reconocen al gangliósido GM1 generando una respuesta autoinmune a nivel del sistema nervioso central [8, 9].

Dos patologías humanas han sido asociadas a alteraciones en la biosíntesis de gangliósidos. En una de ellas, la ausencia de la enzima Sial-T2, que sintetiza al gangliósido GM3, estaría asociada a un síndrome epiléptico infantil con alteraciones en el desarrollo y ceguera [10], mientras que la otra es una neuropatía hereditaria que se cree que estaría causada por la acumulación masiva de un precursor [11]. A pesar de que son los únicos casos en que se ha ligado la biosíntesis de gangliósidos a la patogénesis de enfermedades humanas, estudios en ratones genéticamente modificados con deficiencias en la biosíntesis de gangliósidos presentan fenotipos que incluyen desde alteraciones en el mantenimiento y reparación en el tejido nervioso hasta resistencia a la insulina (revisado en [12]).

Debido a estas implicancias, sobre todo a nivel del sistema nervioso central, el estudio de las enzimas involucradas en el metabolismo y la biosíntesis de gangliósidos ha sido intenso [13-16]. La caracterización de las mismas ha contribuido al entendimiento de la expresión diferencial de estos esfingolípidos durante el desarrollo cerebral pero para muchas de estas enzimas los mecanismos que regulan su función, desde su correcto plegamiento hasta como se determina su localización subcelular, solo han sido parcialmente resueltos.

Maquinaria de glicosilación celular

La glicosilación de proteínas y la síntesis de glicolípidos comienzan en el retículo endoplásmico y continúan en el complejo de Golgi, donde se encuentran distribuidas las glicosiltransferasas y glicosidasas que catalizan la transferencia y remodelación de los grupos azúcar [17, 18]. La N-glicosilación de proteínas comienza en el lumen del retículo endoplásmico con la transferencia de una estructura de N-glicano inicial (Glc3Man9GlcNAc2) sobre la cadena lateral de una asparagina, contenida en la secuencia consenso Asparagina-x-Serina/Treonina [19] de las proteínas nacientes, donde x es cualquier aminoácido excepto prolina. Esta estructura es posteriormente modificada mediante remoción de algunos grupos azúcar y la adición de otros en

el lumen del retículo endoplásmico y del aparato de Golgi. En menor medida ocurre la *O*-glicosilación que comienza en el complejo de Golgi y la transferencia de los grupos azúcar ocurre sobre grupos hidroxilo (OH) de las cadenas laterales de serinas o treoninas.

Por su parte, las glicosiltransferasas de lípidos catalizan la síntesis de glicoesfingolípidos. Estos últimos, están compuestos por una ceramida, que es una esfingosina unida a un ácido graso, y un mono- u oligosacárido de cadena corta. Particularmente, aquellos que contienen uno o más grupos de ácido siálico se denominan gangliósidos y su síntesis está catalizada por las glicosiltransferasas de gangliósidos (GGTs). Estas enzimas transfieren glúcidos a partir de dadores nucleótido azúcar que son importados desde el citoplasma (Revisado en [20]). La biosíntesis de gangliósidos se divide en cuatro vías que se clasifican en las series o-, a-, b- y c- de acuerdo a la cantidad de residuos de ácido siálico adicionados sobre la primera galactosa del gangliósido (Figura 1).

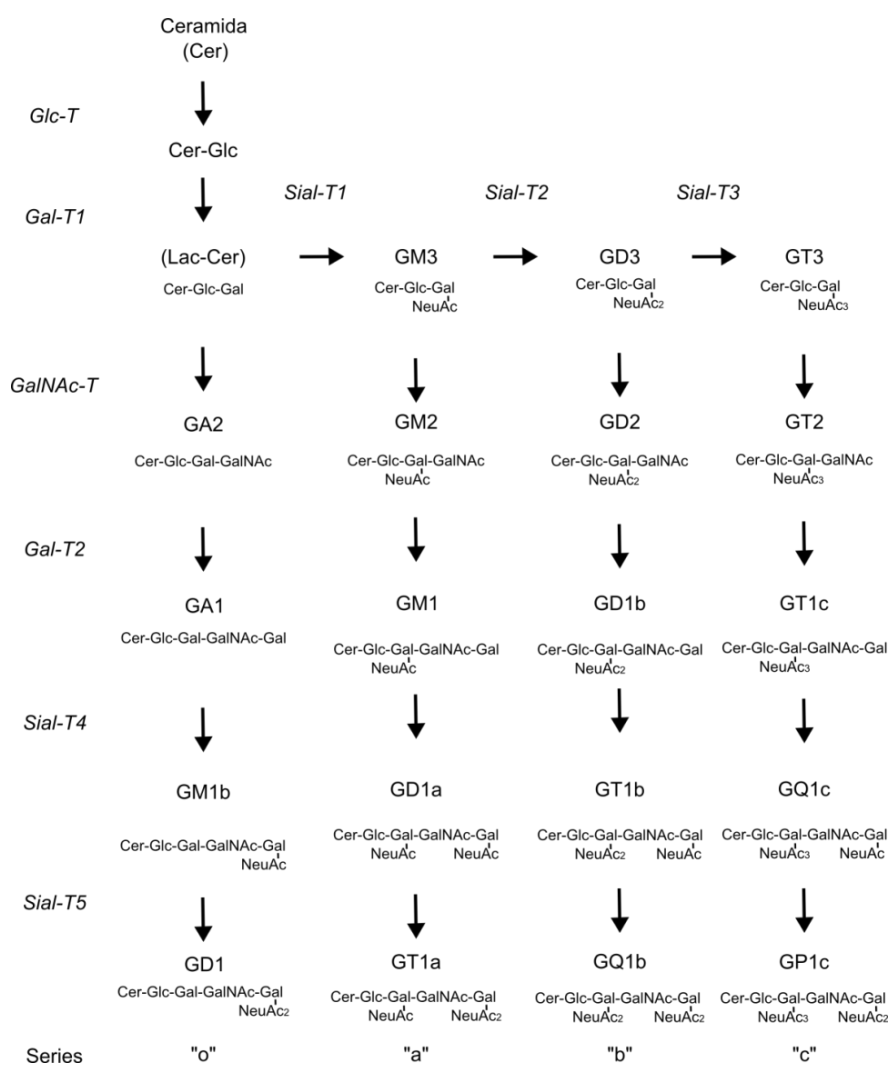


Figura 1. Esquema de la vía de biosíntesis de las series -o-, -a-, -b y -c de gangliósidos. Glc-T, UDP-Glc: ceramida glucosiltransferasa; Gal-T1, UDP-Gal: glucosilceramida galactosiltransferasa; Gal-T2, UDP-Gal: GA2/GM2/GD2/GT2 galactosiltransferasa; GalNAc-T, UDP-GalNAc:

LacCer/GM3/GD3/GT3 *N*-acetilgalactosaminiltransferasa; Sial-T1, CMP-NeuAc: lactosilceramida sialiltransferasa; Sial-T2, CMP-NeuAc: GM3 sialiltransferasa; Sial-T3, CMP-NeuAc: GD3 sialiltransferasa; Sial-T4, CMP-NeuAc: GA1/GM1/GD1b/GT1c sialiltransferasa; Sial-T5, CMP-NeuAc: GM1b/GD1a/GT1b/GQ1c sialiltransferasa. Las series están nombradas de acuerdo a los grupos de ácido neurámico (NeuAc) incorporados en la primer galactosa (Gal) del gangliósido, serie “o”: sin grupos NeuAc; serie “a”: un grupo NeuAc; serie “b”: dos grupos NeuAc; serie “c”: tres grupos NeuAc. Los gangliósidos están nombrados de acuerdo a Svennerholm [21].

Familia de las glicosiltransferasas

La mayoría de las glicosiltransferasas localizadas en el complejo de Golgi son proteínas transmembrana tipo II. Las proteínas transmembrana pueden ser politópicas de membrana, cuando poseen múltiples pasos transmembrana, o pueden tener un único dominio transmembrana. En este último caso, se clasifican en proteínas transmembrana tipo I, cuando su extremo N-terminal es luminal o extracitoplasmático y en proteínas transmembrana tipo II, cuando su extremo N-terminal está orientado hacia el citoplasma (Figura 2).

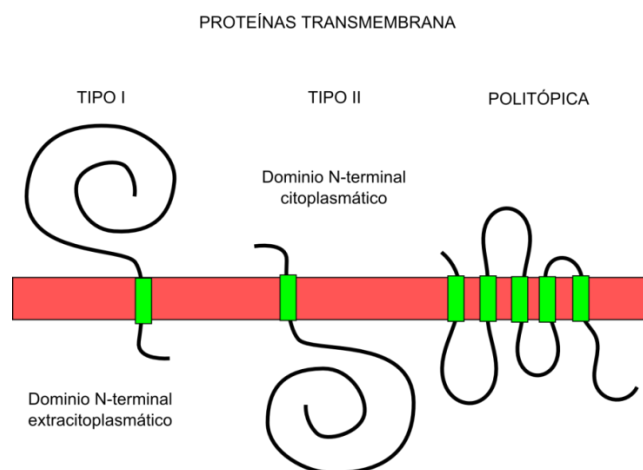


Figura 2. Esquema de la topología de proteínas transmembrana tipo I, tipo II y politópicas de membrana.

Para el caso de las glicosiltransferasas el dominio N-terminal incluye un tallo citoplasmático corto (DC) y un dominio transmembrana (TM) que están conectados al dominio catalítico luminal a través de una región espaciadora denominada “Stem” [13] (Figura 3).

Algunas de estas enzimas permanecen como proteínas monoméricas pero muchas otras forman homodímeros, a través de puentes disulfuro entre cisteínas que pueden estar localizadas en cualquier dominio de la proteína, es decir en la región citoplasmática, en la región luminal o incluso en el dominio transmembrana [22].

La relación entre dimerización y actividad enzimática varía de acuerdo a la proteína. En general, aquellas que poseen puentes disulfuro fuera de su dominio catalítico permanecen activas tanto

en su estado dimérico como monomérico. No obstante, se ha reportado que mientras algunas requieren de la dimerización para su actividad, otras se ven inhibidas en esta condición (revisado en [22]).

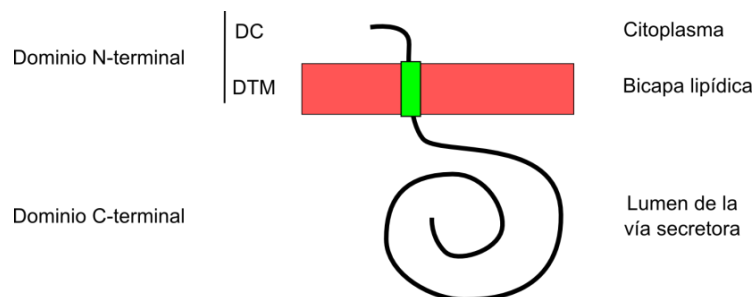


Figura 3. Esquema de la topología de las glicosiltransferasas. El dominio N-terminal incluye al dominio citoplasmático (DC) y al dominio transmembrana (DTM). El dominio catalítico C-terminal se encuentra orientado hacia el lumen o región extra-citoplasmática.

La formación de hetero-oligómeros también ha sido descrita en esta familia de proteínas. Inicialmente, se propuso que la oligomerización constituiría un mecanismo de retención en el complejo de Golgi [23] pero estudios posteriores revelaron la importancia de estos complejos en la eficiencia de la catálisis enzimática [24, 25].

Las glicosiltransferasas se encuentran principalmente localizadas en el complejo de Golgi pero un porcentaje minoritario de algunas de ellas se localiza además en la membrana plasmática [26-28]. Esta localización ectópica permitiría la remodelación de gangliósidos directamente sobre la membrana regulando la disponibilidad de los mismos y, por lo tanto, afectando la interacción con otras células o con la matriz extracelular [26, 28].

Por otra parte, se ha visto que el dominio luminal (catalítico) de muchas glicosiltransferasas es secretado al medio extracelular en forma soluble luego de la proteólisis de su dominio N-terminal [29-33]. Se ha propuesto que esta proteólisis ocurriría en las regiones distales del complejo de Golgi, dado los patrones de glicosilación presentes en los dominios secretados. Estas formas solubles, expresadas a niveles endógenos, están presentes y permanecen activas en los fluidos corporales (Revisado en [13]).

Los mecanismos que regulan la liberación de los dominios lumenales o la localización en la membrana plasmática no han sido establecidos por completo. Para el caso de la β -1,4 galactosiltransferasa se ha propuesto que la glicosilación determinaría su localización ectópica, ya que el patrón de glicosilación es diferente al de la enzima retenida en el complejo de Golgi [26]. Sin embargo, no se ha establecido con exactitud si este fenómeno es la causa o una consecuencia del tráfico de la enzima a través de la vía secretora.

Tráfico de las glicosiltransferasas hacia el complejo de Golgi

Luego de su síntesis en el retículo endoplásmico, las glicosiltransferasas son transportadas hacia el complejo de Golgi mediante transporte vesicular. Se ha postulado que este transporte estaría mediado por componentes del complejo COPII que interaccionan específicamente con las proteínas cargo [34, 35]. En este proceso está involucrada la GTPasa Sar1 que se une a la membrana del retículo cuando está en su forma Sar1-GTP activada e induce la formación de los sitios de salida del retículo endoplásmico [36-38]. Allí interacciona con proteínas cargo específicas y recluta a los componentes del complejo de cubierta II, Sec23 y Sec24, que conforman las vesículas COPII [39-41] junto a otros componentes citosólicos [42, 43]. Las glicosiltransferasas poseen un motivo dibásico en su dominio citoplasmático. Para las GTs de gangliósidos, se ha demostrado que este motivo permite su interacción con Sar1 [44, 45], de modo que son selectivamente transportadas hasta el complejo de Golgi en donde contribuyen a la maduración de proteínas y con la síntesis de esfingolípidos.

El complejo de Golgi está constituido por una serie de cisternas apiladas organizadas en regiones denominadas *cis*-, *medial*- y *trans*-, que se consideran proximales al inicio de la vía secretora, y una región distal denominada TGN (*trans* Golgi Network), desde donde se distribuyen las proteínas hacia la membrana plasmática y los endosomas (Revisado en [46]). Las vesículas COPII que llegan desde el retículo endoplásmico funden con las membranas del *cis*-Golgi (*cis* Golgi Network) y depositan las moléculas cargo que transitan desde esta región hacia el TGN para su posterior salida del complejo de Golgi. Este transporte ha sido denominado anterógrado, mientras que el tráfico en la dirección contraria mediado por vesículas COPI ha sido denominado transporte retrógrado (revisado en [47]). Los dos mecanismos propuestos para el transporte de lípidos y proteínas se encuentran esquematizados en la Figura 4.

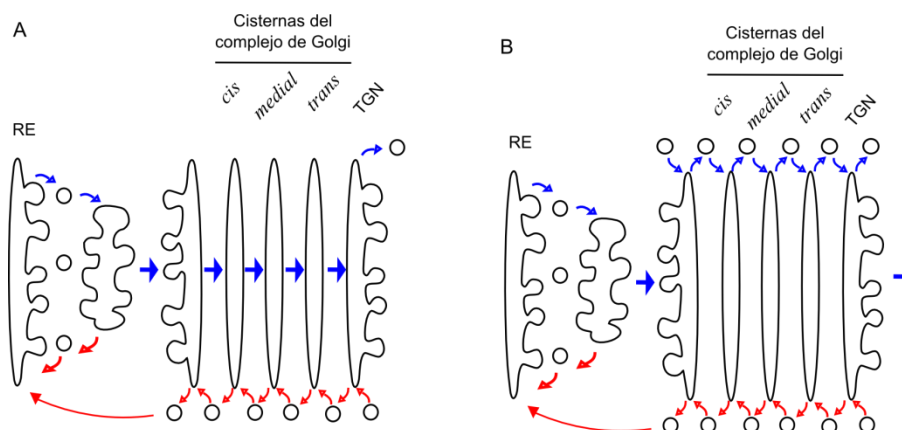


Figura 4. Representación esquemática de los modelos propuestos para el transporte de lípidos y proteínas. **A.** Modelo de maduración cisternal. Cada cisterna del complejo de Golgi madura a medida que migra en sentido *cis* a *trans*. Las proteínas residentes en cada cisterna son mantenidas a través de transporte vesicular retrógrado mediado por las vesículas COPI. **B.** Modelo de transporte vesicular. Las

cisternas del complejo de Golgi son estáticas y el tráfico de lípidos y proteínas ocurre mediante vesículas COPII que dirigen el transporte anterógrado y vesículas COPI que dirigen el transporte retrógrado. (Molecular Biology of the Cell, 4ta edición).

El mecanismo mediante el cual las enzimas residentes del complejo de Golgi quedan retenidas mientras que otras continúan su camino en la vía exocítica, ha sido objeto de estudio durante muchos años y han sido postulados diversos mecanismos que estarían involucrados en este proceso. Para el caso de las glicosiltransferasas, estudios en levaduras revelan la presencia de un motivo conservado en su dominio citoplasmático, que estaría implicado en el mecanismo de retención de las mismas [48]. No obstante, este motivo solo está presente en el 12% de las glicosiltransferasas de mamíferos, por lo que no sería el mecanismo principal de retención en células eucariotas superiores (Revisado en [20]). Inicialmente, se postularon dos modelos para explicar este fenómeno. Por un lado, Bretscher y Munro observaron que el espesor de las membranas biológicas aumenta con el incremento gradual en las concentraciones de colesterol y esfingolípidos, desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática. A su vez, las proteínas residentes en el complejo de Golgi poseen en general, un dominio transmembrana más corto que las residentes en membrana plasmática. Esto llevó a postular que el dominio transmembrana determinaría el transporte y retención en el complejo de Golgi. La presencia de dominios transmembrana largos en membranas de poco espesor sería energéticamente desfavorable por la exposición de aminoácidos hidrofóbicos en el espacio citoplasmático, de modo que éstos serían segregados hacia regiones con altas concentraciones de colesterol y esfingolípidos, en donde el espesor de la membrana es mayor. Posteriormente, serían transportadas hacia la membrana plasmática [49].

Por otra parte, se sugirió el modelo conocido como “Kin recognition” para explicar la retención de las glicosiltransferasas en el complejo de Golgi. Este modelo postula que las enzimas formarían grandes agregados con otros miembros de la familia que impedirían su entrada en las vesículas exocíticas y por lo tanto su salida de esta organela [23].

Estudios recientes postulan que el dominio hidrofóbico de proteínas transmembrana tipo II determinaría la retención o exclusión del complejo de Golgi. En general, hemi-dominios exoplásmicos (la mitad del dominio transmembrana que está hacia el lado luminal o extracitoplasmático) cortos y voluminosos determinarían la retención en el complejo de Golgi, mientras que dominios largos y menos voluminosos determinarían la localización en la membrana plasmática [50, 51].

Localización sub-Golgi de las glicosiltransferasas

Se ha postulado que el procesamiento y la maduración de proteínas serían secuenciales durante su paso por la vía secretora. Las glicosiltransferasas involucradas estarían distribuidas en el complejo de Golgi, desde la región *cis*- hacia la región *trans*-, de acuerdo al orden en el que

actúan en la vía de procesamiento [52], aunque se ha demostrado cierto grado de solapamiento entre ellas [23]. Esta situación es diferente para las glicosiltransferasas que sintetizan glicolípidos. En este caso, las enzimas actúan secuencialmente pero este orden no depende necesariamente de su distribución espacial sino de su afinidad por los sustratos donores y aceptores (revisado en [20]). La localización de las glicosiltransferasas de gangliósidos se ha visto distribuida en regiones proximales del complejo de Golgi, como por ejemplo para Gal-T1, Sial-T1 y Sial-T2, y en regiones distales para otras como GalNAc-T y Gal-T2 [14] aunque esta localización puede variar en distintas líneas celulares [53].

Estudios en células CHO-K1 utilizando los dominios N-terminales de Sial-T2 y GalNAc-T revelaron que la localización sub-Golgi está determinada por los tallos citoplasmáticos de estas enzimas y que los dominios transmembrana no estarían involucrados. El intercambio entre los dominios citoplasmáticos de estas dos proteínas determina la localización proximal o distal de las mismas en el complejo de Golgi [54]. Esto sugiere un rol dual del tallo citoplasmático ya que no solo contiene el motivo dibásico, sino que además contiene la información que determina la localización sub-Golgi. Uliana y colaboradores postularon que la localización de Sial-T2 en la región proximal del Golgi podría estar mediada por un mecanismo de retención activo, a través de la interacción de su dominio citoplasmático con otra proteína proximal que no interaccionaría con GalNAc-T. Hasta el momento, este mecanismo no ha sido identificado como tampoco lo ha sido una secuencia específica determinante de esta localización.

Complejos funcionales de las glicosiltransferasas

La formación de complejos funcionales ha sido demostrada para glicosiltransferasas de gangliósidos que actúan sucesivamente en la biosíntesis de estos glicolípidos. Específicamente, las enzimas GalNAc-T y Gal-T2, concentradas en la región distal del complejo de Golgi, interaccionan físicamente para formar un complejo funcional que cataliza la síntesis de producto con mayor eficiencia que la de sus componentes aislados [55]. Las glicosiltransferasas Gal-T1, Sial-T1 y Sial-T2, concentradas en la región proximal del complejo de Golgi, también forman un complejo multienzimático en células CHO-K1 [24]. La formación de complejos específicos varía de acuerdo a la línea celular como así también la localización subcelular. A diferencia de lo reportado en células CHO-K1, Sial-T2 se localiza en la misma región que GalNAc-T en células F-11A e interacciona físicamente con ella y no con Sial-T1 [53].

La interacción física entre estas enzimas permanece en ausencia de sus dominios catalíticos lumenales y para el complejo GalNAc-T/Gal-T2 se ha demostrado que ocurre incluso en ausencia del dominio citosólico [55]. Esto sugiere que el dominio transmembrana participa, al menos en parte, de la formación de estos complejos aunque la participación de los dominios C-terminales no puede descartarse.

También se ha reportado la presencia homo-dímeros para algunas glicosiltransferasas que, al igual que los complejos mencionados anteriormente, se forman en el retículo endoplásmico. Se ha postulado que muchos de ellos estarían formados mediante puentes disulfuro entre cisteínas localizadas tanto en la región luminal como en la región transmembrana (Revisado en [22]). No obstante, no han sido identificadas secuencias específicas como tampoco modificaciones post-traduccionales que pudieran mediar la formación de los hetero-complejos entre las glicosiltransferasas de gangliósidos mencionados anteriormente.

Modificaciones post-traduccionales de las glicosiltransferasas

N-glicosilación. Las glicosiltransferasas al igual que muchas otras proteínas son glicosiladas post-traduccionalmente [56]. La glicosilación de proteínas asiste al plegamiento correcto de las mismas a través del sistema de chaperonas calnexina-calreticulina (Revisado en [57]). También se ha reportado que podría afectar la solubilidad o polaridad de las proteínas y que estaría involucrada en las interacciones entre receptores y ligandos que desencadenan las vías de señalización intracelular [58] o regulan los procesos de endocitosis y exocitosis [59].

Para el caso de las glicosiltransferasas de gangliósidos (GGTs) se ha demostrado que la N-glicosilación sería fundamental para su actividad y localización subcelular [16, 60-62], ya que muchas de ellas quedan retenidas en el retículo endoplásmico en ausencia de esta modificación, posiblemente como consecuencia del reconocimiento por parte de la maquinaria de control de calidad presente en esta organela [63].

Fosforilación. Otra modificación post-traduccionales identificada en las glicosiltransferasas es la fosforilación. Esta modificación se ha reportado tanto en la región citoplasmática [64] como en la región luminal de miembros de esta familia. En este último caso se ha propuesto que podría estar catalizada por la Caseína kinasa II residente en el complejo de Golgi [65]. La incorporación de fósforo radioactivo fue demostrada para las GGTs Sial-T1, Sial-T2, Sial-T3 y GalNAc-T mediante ensayos *in vitro* [66, 67]. Se ha postulado que la fosforilación de GalNAc-T y Sial-T4 cumpliría un rol regulatorio en la síntesis de GM1. Estudios en células de neuroblastoma de rata revelaron que la activación de las kinasas PKC (Proteína Kinasa C) y PKA (Proteína Kinasa A) provoca una estimulación en la actividad de GalNAc-T y una inhibición de la actividad de Sial-T4 [68]. Como resultado, la fosforilación provocaría un incremento en los niveles de GM1 en la célula, lo cual resulta interesante ya que la regulación en la composición de gangliósidos se ha visto implicada en los procesos de diferenciación celular [69-74].

Hasta el momento no han sido reportadas otras modificaciones post-traduccionales en la familia de las glicosiltransferasas.

Otras proteínas transmembrana tipo II: SNAREs transmembrana

Las SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide Attachment Protein Receptor) son proteínas cruciales en el proceso de fusión de membranas. Estas proteínas aportan la fuerza necesaria y la especificidad en la fusión de vesículas con las membranas blanco [75, 76]. Muchas de ellas son proteínas transmembrana tipo II con un dominio citoplasmático helicoidal que les permite unirse específicamente a otras SNAREs, de esta manera, forman un complejo altamente estable, crítico para la fusión de las membranas [75].

Muchas SNAREs transmembrana poseen residuos de cisteína del lado citoplasmático, adyacentes al borde transmembrana o embebidos en el mismo, que están S-aciladas [77-79]. En nuestro laboratorio, se ha descrito que la S-acilación de SNAREs transmembrana en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está catalizada por un única enzima, Swf1. La función de la S-acilación en estas proteínas no se conoce, excepto para la SNARE endosomal Tlg1, en la cual jugaría un rol importante en su estabilidad previniendo su reconocimiento por parte de la maquinaria de ubiquitinación y posterior degradación en la vacuola [77].

En cuanto a SNAREs de mamíferos, solo para Sintaxina 7 se ha propuesto que la S-acilación sería necesaria para su reciclado entre endosomas y la membrana plasmática [80]. La enzima involucrada en su modificación aún no ha sido identificada, aunque se presume que podría ser más de una.

Un estudio global del palmitoil-proteoma de *S. cerevisiae* sugiere que Swf1 sería capaz de modificar a dos manosiltransferasas, aunque esto no ha sido corroborado de manera independiente. Para glicosiltransferasas de mamíferos no se han reportado modificaciones lipídicas, aunque es interesante que muchas de ellas posean cisteínas que podrían ser sustrato de la S-acilación (ver resultados del capítulo I).

S-acilación de proteínas

La S-acilación de proteínas es una modificación post-traducciona que consiste en la adición de moléculas lipídicas de cadena larga sobre residuos de cisteína a través de un enlace tioéster. Por lo general, el lípido adicionado es palmitato (C16), motivo por el cual esta modificación es comúnmente llamada palmitoilación (Figura 5).

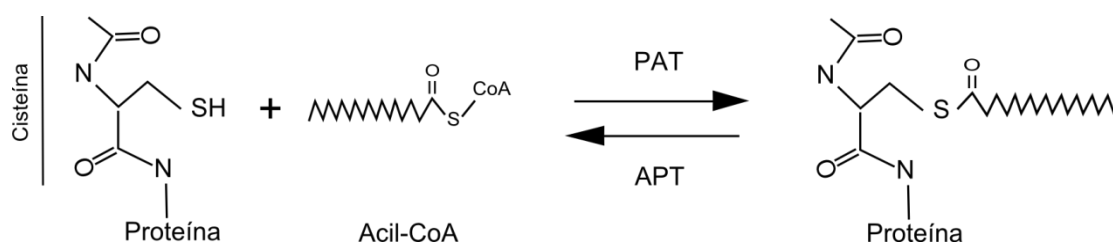


Figura 5. Esquema de la S-acilación y de-acilación de proteínas. PAT: Palmitoiltransferasa (Protein Acyl Transferase), APT: Tioesterasa (Acyl Protein Thioesterase), Acil-CoA: sustrato donador, Proteína: sustrato aceptor.

La S-acilación, a diferencia de otras modificaciones lipídicas descritas, es reversible y por lo tanto susceptible a ser regulada. La de-acilación de proteínas está catalizada por tioesterasas solubles que escinden el enlace tioéster entre el palmitato y la cisteína. Las primeras enzimas identificadas fueron denominadas APT1 [81] y APT2 [82]. Recientemente las enzimas de la familia ABHD17 fueron identificadas como nuevas tioesterasas que catalizarían la de-acilación de sustratos no reconocidos por las APTs [83].

Otra característica particular de la S-acilación es que se encuentra tanto en proteínas periféricas como integrales de membrana, mientras que otras modificaciones lipídicas, como la N-miristoilación y la prenilación, están presentes casi exclusivamente en proteínas periféricas.

Las primeras proteínas S-aciladas fueron descritas hace más de 40 años [84, 85] pero las enzimas que catalizan esta modificación no fueron descubiertas hasta el año 2002. Inicialmente se creyó que esta modificación ocurría de manera espontánea en las células ya que, debido a la alta reactividad del palmitoil-CoA, algunos péptidos y proteínas son capaces de autoacilarse *in vitro* en ausencia de factores celulares [86, 87]. Esto, junto a numerosas dificultades para identificar y purificar una enzima con actividad palmitoiltransferasa, promovió durante muchos años la idea de que la S-acilación ocurría sin necesidad de una catálisis enzimática pero finalmente, fueron ensayos genéticos en *S. cerevisiae* los que permitieron identificar a las primeras palmitoiltransferasas. Estas enzimas son proteínas integrales de membrana localizadas en distintos compartimentos celulares que se caracterizan por poseer un dominio rico en cisteínas con el motivo conservado DHHC (Ácido Aspártico-Histidina-Histidina-Cisteína). En *S. cerevisiae* existen siete palmitoiltransferasas mientras que en humanos se han identificado veintitrés miembros de esta familia.

Sustratos de la S-acilación

Estudios globales de los palmitoil-proteomas han permitido la identificación de numerosos sustratos en distintos organismos, líneas celulares y tejidos de diversas especies [78, 79, 88-92]. En un trabajo reciente, Blanc y colaboradores estiman que el porcentaje de proteínas sustrato de la S-acilación en el proteoma humano es aproximadamente un 10% siendo la gran mayoría proteínas periféricas de membrana [93]. En estos casos, la S-acilación suele estar acompañada de otra modificación lipídica, como la farnesilación o la N-miristoilación, que permiten la interacción transiente con la membrana en la que se encuentra su palmitoiltransferasa. Alternativamente, algunas proteínas poseen un dominio polibásico que cumple esta función. El anclaje estable de proteínas periféricas a las membranas biológicas ocurre luego de la S-acilación, aunque otros roles más complejos también han sido reportados.

Por otra parte, proteínas integrales de membrana también están S-aciladas pero la función de esta modificación no es tan clara. No obstante, se ha visto asociada a su localización subcelular, su función, interacción con otras proteínas y estabilidad de las mismas (ver la sección “Funciones de la S-acilación”).

Blanc y colaboradores estiman que cerca del 16 % de las proteínas S-aciladas corresponde a proteínas con un único paso transmembrana, entre estas, las proteínas transmembrana tipo I estarían particularmente enriquecidas. Los autores postulan que para proteínas transmembrana en general, la S-acilación ocurriría principalmente en el extremo C-terminal de las mismas [93] pero esto no incluye a proteínas transmembrana tipo II, ya que esta modificación ocurre del lado citoplasmático y el extremo C-terminal en este tipo de proteínas es luminal o extracitoplasmático. En estos casos se ha visto que la S-acilación suele ocurrir sobre residuos de cisteína que se encuentran del lado citoplasmático, adyacentes al dominio transmembrana o incluso embebidos en el mismo. A pesar de que se conoce la palmitoiltransferasa que modifica proteínas transmembrana tipo II en *S. cerevisiae* (Swf1) [77], su ortólogo en mamíferos aún no ha sido identificado.

Familia de las proteínas DHHC

Las Palmitoiltransferasas o PATs (Protein Acyl Transferasas) son una familia de proteínas caracterizadas por poseer un dominio rico en cisteínas (CRD: Cystein Rich Domain), de unos 50 aminoácidos, con el motivo DHHC (Ácido Aspártico-Histidina-Histidina-Cisteína) conservado [94]. Estas enzimas catalizan la transferencia de un grupo acilo a partir del sustrato donador Acil-CoA hacia cisteínas presentes en numerosas proteínas que actúan como sustrato aceptor. El descubrimiento de las primeras PATs fue a través de ensayos genéticos en *S. cerevisiae*. Mediante un rastreo genético, Robert Deschenes demostró que Erf2 es necesaria para la S-acilación de la GTPasa Ras en esta levadura [95]. En ese trabajo se describió que Erf2 es una proteína localizada en el retículo endoplásmico, con cuatro pasos transmembrana y con un dominio rico en cisteínas conteniendo el DHHC. Erf2 interacciona físicamente con Erf4, una proteína soluble necesaria para la actividad palmitoiltransferasa de la enzima tanto *in vivo* como *in vitro*, de modo que ambas formarían un complejo con actividad palmitoiltransferasa sobre Ras [95, 96]. Por otra parte, Akr1 fue identificada como la PAT necesaria para la S-acilación de la Caseína Kinasa Yck2 (Yeast Casein Kinase), también en *S. cerevisiae*. Al igual que Erf2, Akr1 es una proteína con múltiples pasos transmembrana, seis en este caso, y contiene un dominio rico en cisteínas con el motivo DHYC (Ácido Aspártico-Histidina-Tirosina-Cisteína) [97].

En ambos trabajos se estableció la relación enzima-sustrato mediante ensayos *in vitro* y se demostró que Erf2/Erf4 y Akr1 son capaces de catalizar la S-acilación de Ras y Yck2, respectivamente, como así también su autoacilación. Además mostraron que la mutación de la

cisteínas de los motivos DHHC y DHYC por alaninas (DHHA y DHYA) inhibe la S-acilación de los sustratos y la autoacilación, lo que llevó a postular que éste sería el sitio catalítico de las palmitoiltransferasas y que la reacción ocurriría en dos pasos, una autoacilación de la PAT en la cisteína del motivo DHHC y la posterior transferencia del acilo hacia el sustrato aceptor.

La caracterización de estas enzimas permitió establecer a la S-acilación como una modificación enzimática e impulsó la búsqueda de nuevo miembros de la familia de proteínas DHHC tanto en levaduras como en eucariotas superiores.

La topología de estas enzimas se estudió utilizando como modelo a Akr1 [98] y se estableció que el dominio DHYC se encuentra del lado citoplasmático, entre el segundo y tercer dominio transmembrana, característica compartida por todas las PATs [94] (Figura 6).

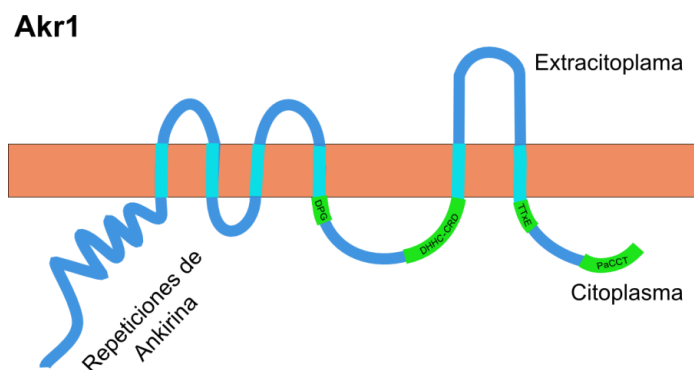


Figura 6. Topología de Akr1 de *Saccharomyces cerevisiae*. Topología de la S-aciltransferasa Akr1 determinada experimentalmente por Politis y colaboradores [98]. En este esquema fue incluido el motivo conservado en el dominio C-terminal de las Palmitoiltransferasas (PaCCT) [99].

Además del dominio DHHC, estas proteínas presentan otras regiones altamente conservadas, como el motivo DPG (Ácido Aspártico-Prolina-Glicina) cercano al dominio transmembrana dos y el motivo TTxE (Treonina-Treonina-x-Ácido Glutámico) adyacente al dominio transmembrana cuatro [94], de los cuales no se conoce la función. El motivo PaCCT (Palmitoyltransferases Conserved C-terminus), presente en el extremo C-terminal de las palmitoiltransferasas, fue descrito en nuestro laboratorio y consiste en dieciséis aminoácidos conservados. La función de este motivo no se conoce pero Gonzalez-Montoro y colaboradores mostraron que es necesario para la actividad palmitoiltransferasa de al menos dos PATs de *S. cerevisiae* [99].

Con la identificación del dominio DHHC se postuló que éste podría ser un sitio de unión a metales por su similitud a dominios de unión a zinc previamente descritos [100]. Sin embargo, no fue hasta el año 2014 que logró demostrarse esta hipótesis. Estudios realizados en nuestro laboratorio permitieron establecer al dominio DHHC como un sitio de unión a zinc con una estructura no descrita hasta el momento. Mediante un rastreo genético en *S. cerevisiae*, Gonzalez-Montoro y colaboradores identificaron mutantes de Swf1 carentes de actividad palmitoiltransferasa. A fin de estudiar la función de estos aminoácidos esenciales, llevaron a

cabo un modelado estructural por homología *in silico* del dominio DHHC de Swf1 que predijo una estructura del tipo de dedos de zinc con dos bolsillos, cada uno coordinando un átomo de este metal. Mediante la medición por espectrometría de masas de los moles de zinc presentes en muestras del dominio purificado, demostraron que el DHHC es un sitio de unión a zinc con una relación 2:1 del metal con respecto a la proteína. En este caso, la unión a metales cumple un rol estructural no involucrado en la función catalítica [101].

Con respecto al lípido transferido, se ha reportado que la S-acilación de proteínas es heterogénea en tejidos y células en cultivo pero el palmitato es el principal lípido adicionado [102-104]. Estudios de la especificidad de las PATs con respecto al acil-CoA que transfieren, han arrojado resultados consistentes con la variabilidad encontrada *in vivo*. La especificidad de Erf2/Erf4 se evaluó mediante ensayos de competencia *in vitro* en los que se analizó la capacidad de acil-CoAs fríos para competir con palmitoil-CoA radioactivo por su incorporación en el sustrato Ras [95]. Acil-CoAs de cadena larga, saturados e insaturados (C16:0, C16:1, C18:0, C18:1) fueron los que lograron mayor inhibición en la incorporación de radioactivo.

Un estudio más reciente sugiere que las PATs de mamíferos DHHC2 y DHHC3 tendrían una especificidad diferencial con respecto al acil-CoA que transfieren. Se mostró que DHHC2 sería capaz de autoacilarse y transferir acil-CoAs de cadena larga (entre 14 y 20 carbonos de largo) mientras que DHHC3 solo podría hacerlo eficientemente utilizando miristoil-CoA (C:15) y palmitoil-CoA (C:16) [105].

Ensayos con glicoproteínas virales sugieren que existiría una S-acilación diferencial de las cisteínas dependiendo de su posición con respecto al dominio transmembrana, siendo palmitoiladas aquellas que se encuentren del lado citoplasmático, fuera del TMD y esteroiladas aquellas que se encuentren dentro del TMD y embebidas en la membrana [106, 107]. Los autores sugieren que la S-acilación de estas cisteínas podría estar catalizada por enzimas diferentes, con distintas especificidades en el reconocimiento del lípido transferido y de la localización de la cisteína a modificar [107].

Otros miembros de la familia DHHC

Swf1, Pfa3, Pfa4, Pfa5 y Akr2 son los miembros restantes de familia DHHC de *S. cerevisiae* pero para las dos últimas aún no se conoce la función.

Pfa3 está localizada en la membrana vacuolar y cataliza la S-acilación de Vac8, una proteína soluble y N-miristoilada que se encuentra en la membrana de las vacuolas y que es requerida en los procesos de fusión y herencia vacuolar [108, 109]. La ausencia de Pfa3 *in vivo* disminuye los niveles de S-acilación de Vac8 pero no la elimina completamente, sin embargo, estos niveles reducidos son suficientes para provocar una fragmentación vacuolar en condiciones de estrés [110].

Pfa4 está localizada en el retículo endoplásmico y cataliza la S-acilación de sustratos con múltiples pasos transmembrana, como las Permeasas de Aminoácidos [78] y la Sintetasa 3 de quitina (Chs3) [111]. Chs3 cataliza la síntesis de la quitina, un polisacárido de N-acetilglucosamina presente en la pared celular de las levaduras. Esta enzima requiere de la S-acilación para su transporte hacia la membrana plasmática, donde ejerce su función. En ausencia de Pfa4, Chs3 no es S-acilada y queda retenida en el retículo endoplásmico, lo que impide la síntesis de quitina [111].

Finalmente, Swf1 es la palmitoiltransferasa que modifica a SNAREs transmembrana en levaduras. En el año 2005 Valdez-Taubas y Pelham mostraron que en ausencia de esta enzima o en presencia de una mutante inactiva (DHHA), las SNAREs Snc1, Syn8 y Tlg1 no son S-aciladas *in vivo* [77].

Un estudio posterior del palmitoil-proteoma de *S. cerevisiae* mostró que Swf1, es necesaria para la modificación de otras SNAREs transmembrana, además de las descritas inicialmente, y de dos manosiltransferasas [78]. A pesar de que no se conoce una secuencia consenso para esta modificación, en todos estos casos la S-acilación ocurre sobre cisteínas adyacentes al dominio transmembrana. Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que esta topología es un requerimiento para el reconocimiento por parte de Swf1 [112].

En cuanto a las PATs de mamíferos (denominadas DHHC1-24), el primer análisis global fue realizado en el año 2004. Fukata y colaboradores estudiaron la incorporación de palmitato sobre PSD-95 y SNAP-25 en células HEK293 y Cos7, sobreexpresando cada uno de los miembros de la familia DHHC [113]. PSD-95 es una proteína de andamiaje neuronal que acopla receptores con enzimas de señalización en las membranas post-sinápticas, función para la cual requiere de la S-acilación [114]. Este análisis reveló un incremento sustancial en los niveles de palmitato incorporado por PSD-95 ante la sobreexpresión de DHHC2, -3, -7 y -15, siendo DHHC15 la que logró un mayor incremento. Por su parte, SNAP-25, una SNARE implicada en la liberación de neurotransmisores [115], mostró un incremento en la incorporación de palmitato ante la sobreexpresión de estas PATs pero también ante la sobreexpresión de DHHC2 y DHHC17, lo que llevó a postular que algunos miembros tendrían cierta especificidad por el sustrato que modifican.

En el año 2004 también se reportó que DHHC3 cataliza la S-acilación de la subunidad $\gamma 2$ de los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA)_A [116] y que DHHC17, también llamada HIP14 (Huntingtin Interacting Protein 14), modifica a la proteína Huntingtina [117]. DHHC17 es una PAT neuronal localizada en el aparato de Golgi que fue inicialmente identificada por su interacción con Huntingtina (htt), proteína implicada en la patogénesis de la enfermedad de Huntington. Huang y colaboradores mostraron además que HIP14 tiene actividad palmitoiltransferasa sobre el dominio N-terminal de htt y otras proteínas neuronales como GAD-65, Sinaptotagmina I, SNAP-25 y PSD-95 [117]. En estos estudios se reportó que estas PATs también serían capaces de autoacilarse *in vitro*.

Funciones de la S-acilación

Para el caso de las proteínas solubles, la S-acilación ha sido ampliamente asociada a su anclaje estable en membranas, ya que aumenta su hidrofobicidad y por lo tanto su afinidad por las membranas biológicas. Sin embargo, otros roles más complejos también han sido reportados para este tipo de sustratos, como por ejemplo la partición a dominios específicos [118].

La S-acilación de sustratos solubles por lo general ocurre sobre cisteínas que se encuentran próximas a regiones que interactúan con las membranas, ya sea por la presencia de una modificación lipídica previa, como N-miristoilación o prenilación, o a la presencia de un dominio polibásico. Esta interacción es débil y transiente pero suficiente para permitir el encuentro con la PAT transmembrana.

Se ha postulado que la S-acilación podría cumplir un rol regulatorio en este tipo de sustratos, ya que la vida media de esta modificación es mucho menor que la vida media de muchas proteínas, sugiriendo la existencia de ciclos de S-acilación/de-acilación. Un caso bien estudiado es el de las proteínas H-Ras y N-Ras. Estas proteínas son GTPasas pequeñas involucradas en la regulación del crecimiento, diferenciación y muerte celular [119-121]. La S-acilación regularía el flujo constante de Ras entre la membrana plasmática y el sistema de endomembranas y, mediante ciclos de S-acilación/de-acilación, mantendría su distribución subcelular [122-124].

Este ciclo también ha sido descrito para otras proteínas solubles como GAD-65, la sintetasa del ácido γ -aminobutírico (GABA) [82, 125] y para PSD-95 [126]. En este último caso, se ha propuesto que la S-acilación regularía la fuerza y la plasticidad sináptica en las neuronas.

Por otra parte, proteínas transmembrana con uno o múltiples pasos transmembrana también son sustratos de la S-acilación. Para este tipo de proteínas la función de esta modificación no es tan evidente ya que no requieren de modificaciones lipídicas para su anclaje en las membranas biológicas. Sin embargo, algunas de ellas como canales iónicos y receptores de membrana, son modificados sobre cisteínas que se encuentran en los dominios citoplasmáticos alejados de las membranas, de manera similar a la S-acilación de proteínas periféricas. En estos casos se ha propuesto que la S-acilación generaría un sitio adicional de interacción con las membranas [127] y, al igual de lo que ocurre en proteínas solubles, podrían sufrir ciclos de S-acilación/de-acilación, como se ha descrito para el receptor de manosa-6-fosfato [128].

Por otra parte, se ha postulado que la S-acilación de proteínas transmembrana podría regular su interacción con dominios específicos de las membranas incrementando su afinidad por aquellos ricos en colesterol y esfingolípidos [129], aunque también se ha reportado que podría tener un efecto negativo en la partición a estos dominios. El receptor de la toxina del ántrax TEM8, por ejemplo, es segregado fuera de los dominios ricos en colesterol, donde se encuentra su ubiquitina ligasa, cuando está S-acilado. De este modo, en ausencia de esta modificación, el receptor particiona a estos dominios donde es ubiquitinado para su posterior degradación en los lisosomas [130]. Este tipo de regulación también ha sido reportada para proteínas como la chaperona Calnexina y la Tiroredoxina transmembrana TMX, en las que la S-acilación regularía

su afinidad por un dominio específico de la membrana del retículo endoplásmico asociada a las mitocondrias [131]. Estos efectos podrían relacionarse a la afinidad del palmitato por los dominios lipídicos [132] o a cambios conformacionales en las proteínas [133].

Otra función importante de la S-acilación en proteínas transmembrana incluye la regulación de las interacciones proteína-proteína. Para el caso de la chaperona Calnexina, esta modificación cumple otro rol importante regulando su interacción con miembros de un súper complejo que incluye al translocón, al ribosoma y a una oligosacariltransferasa [134]. El receptor de manosa-6-fosfato también necesita estar S-acilado para interactuar con el complejo retrómero y poder reciclar desde endosomas tardíos hacia Golgi. En ausencia de esta modificación, el receptor es transportado hacia los lisosomas donde es degradado [128, 135]. De este modo, la S-acilación afecta de manera indirecta el tráfico y la estabilidad de esta proteína.

Otro ejemplo son los complejos multiproteicos de tetraspaninas e integrinas que requieren de la S-acilación para su formación [133], aunque en otros casos, como el de proteína de adhesión celular neural (NCAM), su dimerización se ve disminuida cuando la proteína está S-acilada [136].

También se ha reportado una inter-modulación entre la S-acilación y otras modificaciones post-traduccionales, como fosforilación y ubiquitinación. En este último caso, jugaría un rol indirecto en la estabilidad de las proteínas, como se ha visto por ejemplo para la SNARE endosomal de *S. cerevisiae*, Tlg1. Esta SNARE está acilada sobre dos cisteínas adyacentes al dominio transmembrana y la ausencia de esta modificación es reconocida por la ubiquitina ligasa Tul1, lo que resulta en su ubiquitinación y posterior degradación en la vacuola [77]. Algo similar ocurre con la proteína relacionada al receptor de lipoproteína 6 (LRP6) [137], con rodopsina [138], con el receptor CCR5 [139] y con el receptor de la toxina del ántrax TEM8 [130]. Sin embargo, para la ubiquitina ligasa Gp78 ocurre lo contrario, la S-acilación de esta proteína promueve la disminución de su vida media [140].

La regulación entre fosforilación y S-acilación ha sido reportada para los canales de potasio BK. Estos canales son S-acilados en su dominio STREX promoviendo su interacción con la membrana. Esto a su vez, provoca un cambio conformacional en la proteína que impide que sea fosforilada e inhibida por la quinasa PKC. Otra quinasa, PKA, fosforila la versión S-acilada del canal provocando su de-acilación. De esta manera, el dominio STREX pierde su unión a la membrana y el canal es nuevamente susceptible a ser fosforilado e inhibido por PKC [141].

Finalmente, la función de la S-acilación en proteínas transmembrana también ha sido implicada en la conformación de la proteína. En *S. cerevisiae*, la sintetasa de quitina Chs3 se localiza en la membrana plasmática pero queda retenida en el retículo endoplásmico cuando no está S-acilada. Se ha propuesto que esta modificación sería necesaria para el plegamiento correcto de la enzima y, en su ausencia, la maquinaria de control de calidad de proteínas del retículo endoplásmico impediría su salida hacia la membrana plasmática [111].

Por otro lado, un estudio reveló que la S-acilación es capaz de afectar la orientación de péptidos sintéticos reconstituidos en liposomas y se ha propuesto que podría afectar la inclinación de los

dominios transmembrana respecto al plano de la membrana [142]. Un ejemplo de esto es LRP6. Esta proteína se localiza en la membrana plasmática y está S-acilada en una o dos cisteínas adyacentes a su único dominio transmembrana. En este caso, el DTM sería más largo que el promedio y, debido a que el espesor de la membrana del retículo endoplásmico es menor al de la membrana plasmática, en ausencia de la S-acilación quedarían expuestos residuos hidrofóbicos al medio acuoso. Esto sería energéticamente desfavorable y, por lo tanto, reconocido por la maquinaria de control de calidad del retículo endoplásmico. Por el contrario, la S-acilación provocaría una inclinación del DTM capaz de aliviar este problema [137].

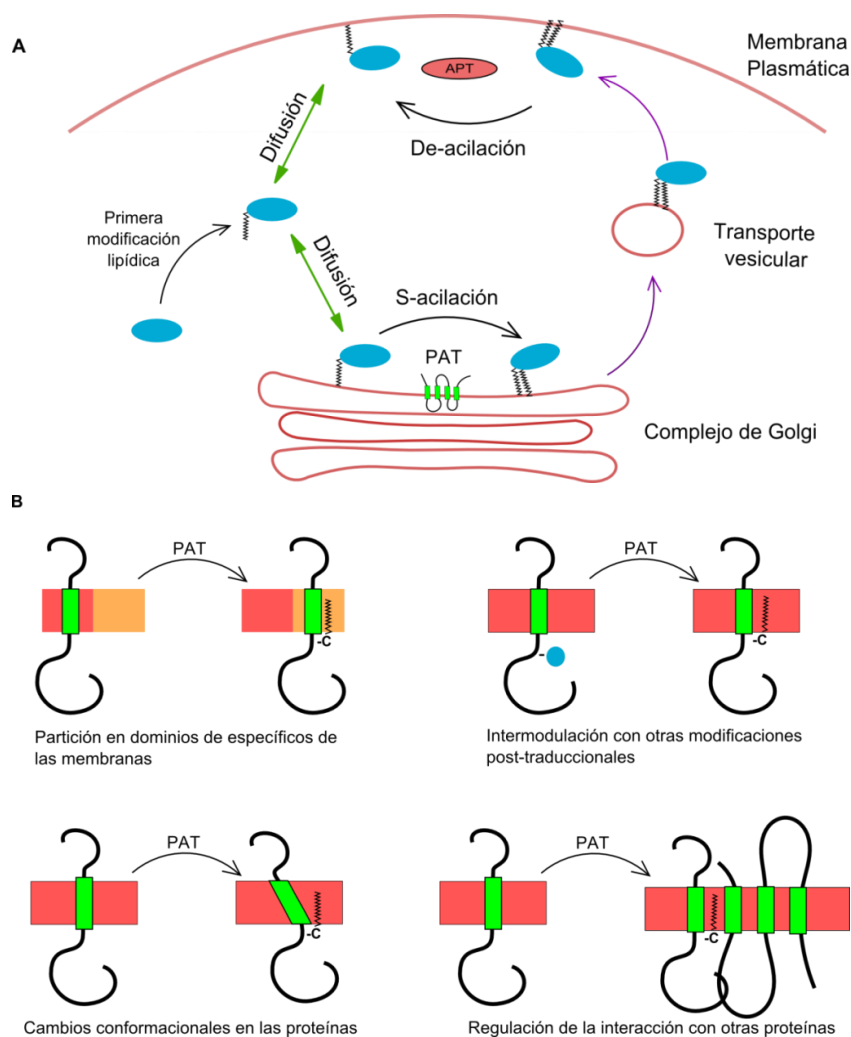


Figura 7. Representación esquemática de las funciones de la S-acilación. A. Ciclo de S-acilación/de-acilación en proteínas solubles. B. Funciones de la S-acilación descritas para proteínas integrales de membrana.

PLANTEO GENERAL DEL PROBLEMA Y OBJETIVOS

La S-acilación de proteínas es una modificación post-traduccional importante que participa en numerosos procesos de relevancia biológica. Estudios de los palmitoil-proteomas han contribuido a su identificación en proteínas cruciales para el funcionamiento normal de la célula. Muchas de ellas se encuentran enriquecidas a nivel del sistema nervioso central y el rol de la S-acilación es clave en procesos de transmisión y plasticidad sináptica. Incluso, la ausencia de algunas palmitoiltransferasas ha sido asociada al desarrollo de neuropatías como la esquizofrenia y el retardo mental.

El conocimiento de los sustratos de S-acilación y la función de esta modificación en las proteínas aceptoras ha sido creciente en los últimos años pero para muchas de ellas, el rol que desempeña la S-acilación aún se desconoce.

Las glicosiltransferasas catalizan la glicosilación de lípidos y proteínas. Aquellas involucradas en la síntesis de gangliósidos cumplen un rol fundamental en los procesos de desarrollo y diferenciación celular, ya que determinan la composición de gangliósidos específicos presentes en la membrana plasmática. Las SNAREs transmembrana por su parte, presentan la misma topología que las glicosiltransferasas y se encuentran S-aciladas, aunque la información respecto al rol de su modificación es muy escasa. En el caso de las glicosiltransferasas, al presente no se ha estudiado si están modificadas mediante la adición de lípidos.

Tanto las SNAREs como las glicosiltransferasas son cruciales en procesos neuronales, de modo que el estudio de los mecanismos involucrados en su regulación, localización u otros factores que puedan afectar su función resulta muy importante. El rol de la S-acilación en proteínas transmembrana no es tan claro pero se ha visto relacionado a la función, estabilidad y localización subcelular de las proteínas como así también en interacciones proteína-proteína [133]. Para la gran mayoría de las proteínas transmembrana tipo II se desconoce la función de la S-acilación e incluso, en algunas como las glicosiltransferasas no ha sido estudiado. Es por eso que nos planteamos como objetivo general para este trabajo de tesis:

Estudiar la S-acilación de proteínas transmembrana tipo II, específicamente glicosiltransferasas y SNAREs, en células de mamíferos en cultivo; las enzimas involucradas en la catálisis de este proceso y las consecuencias funcionales de la S-acilación en estas proteínas.

Como Objetivos Específicos nos proponemos:

- Determinar el estado de S-acilación de glicosiltransferasas de mamíferos y estudiar los efectos de esta modificación en la función y en la localización sub-celular de estas proteínas.
- Identificar las enzimas involucradas en la S-acilación de proteínas transmembrana tipo II, específicamente SNAREs transmembrana y glicosiltransferasas en caso de que estuvieran S-aciladas.

- Contribuir al estudio de las relaciones estructuras-función de las Palmitoiltransferasas, utilizando como modelo de estudio la levadura *S. cerevisiae*. Las estrategias de este objetivo incluyen un análisis de la especificidad de la S-acilación de proteínas transmembrana.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO I: S-ACILACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA TIPO II EN CÉLULAS DE MAMÍFEROS

La S-acilación de SNAREs transmembrana en células de mamíferos ha sido reportada en un estudio del palmitoil-proteoma neuronal en el año 2008 [79] y en células epiteliales humanas [80]. Esta modificación ocurre sobre residuos de cisteína que se encuentran del lado citoplasmático de la proteína, adyacentes al dominio transmembrana o incluso dentro del mismo. A pesar de que no se han descrito motivos de reconocimiento para la S-acilación, esta localización de las cisteínas parece ser característica en proteínas S-aciladas con un solo paso transmembrana.

Nuestras observaciones sugirieron que miembros de la familia de las glicosiltransferasas podrían estar S-aciladas, ya que muchas de ellas poseen cisteínas con la localización mencionada anteriormente, de modo que nos enfocamos en la identificación de la S-acilación como modificación post-traducciona l en estas enzimas, utilizando como modelo a las glicosiltransferasas de gangliósidos.

I A. S-acilación de glicosiltransferasas de gangliósidos en células de mamíferos

1. Las glicosiltransferasas de mamíferos poseen cisteínas conservadas en su región N-terminal

Mediante el análisis de la secuencia de numerosas glicosiltransferasas, observamos que muchas de ellas poseen residuos de cisteína en su dominio N-terminal con una localización similar a aquellas S-aciladas en SNAREs transmembrana (Figura 8). Esto sugiere que miembros de la familia de las glicosiltransferasas podrían ser sustratos de la S-acilación.

Utilizando el software Clustal Omega de la base de datos Uniprot, se realizó un alineamiento de secuencias de las GGTs Sial-T1, Sial-T2, GalNac-T y Sial-T4 expresadas en distintos organismos. Este ensayo reveló que los residuos de cisteínas candidatos a ser S-acilados se encuentran conservados (Figura 9).

Debido a la alta reactividad de este aminoácido, se ha propuesto que a lo largo de la evolución solo se habrían conservado aquellas cisteínas que cumplen una función específica, como la formación de puentes disulfuro por ejemplo [143], de modo que la presencia de estos residuos sugiere que tendrían un rol conservado en esta familia de proteínas.

Glicosiltransferasa	Dominio citoplasmático	Dominio transmembrana	Nº de Acceso	Especie
ST3GAL2	MK C SLR	VWFLSVAFLLVFIMSLIFTYS	Q16824	Humano
ST3GAL2	MK C SLR	VWFLSMAFLLVFIMSLIFTYS	Q11205	Rata
ST3GAL3	MGLLVFVR	NLLLAL C LFLVLGFLYYSAW	P97325	Ratón
ST3GAL4	M C PAGWK	LLAMLALVLVVMVWYSIS	P61130	Chimpancé
ST6GAL1	MVHINVLLK	FM C VLVVILIALTVCLW	Q92182	Gallo
ST6GAL2	MKPHLKQWRQ	GML C GVFAWGLFFVVFIFYFT	A5D7T4	Bovino
ST6GALNAC1	MRS C LWR C RHLSQ	VQWSLLAVLVFFLFALPSFI	Q9NSC7	Humano
ST6GALNAC2	MGSPRWKR	F C FLLLAFTSLLLYG	Q92184	Gallo
ST6GALNAC3	MA C ILKRR	SVIAVSFIAAFLFLVRLV	Q8NDV1	Humano
ST6GALNAC4	MKAPGR	LVLIL C SVVFSAVYILLCCW	Q9H4F1	Humano
ST6GALNAC5	MKTLMRHG	LAV C LVLTMTCTSLLVYSSL	Q9QYJ1	Ratón
ST8SIA1	MKLQSRMWL C PRTR	LPVGASALGFLICWLYVFP	Q6DNG6	Xenopus
ST8SIA3	MRN C KMARV	ASVLGLVMLSVALLILSLISYVSL	O43173	Humano
ST8SIA4	MRSIRKR	WTI C TISLLIFY	Q92187	Humano
ST8SIA5	MRYADPSANRDLLGN	TLLFIFI C AFALVTLLQQILY	P70126	Ratón
GALNT1	MRKFAY C K	VVLATSLIWLDMFLLLYF	Q29121	Cerdo
GALNT2	MRRRSR	MLL C FAFLWVLGIAYMY	Q10471	Humano
GALNT4	MAVRWTWAGK S C	LLLALLTLAYILVEFSVSTLYAS	O08832	Ratón
GALNT11	MGSITV	RYF C YGC L FTSATWTVLLFIYFN	Q921L8	Ratón
GALNT13	MRRF	VY C KVVLTATSLMWVLDVFLLY	Q8CF93	Ratón
GALNT15	MLLRKRYRHRP	C RQLQLLLMLGCVLMMVAMLH	Q8N3T1	Humano
GALNT18	MV C TRKTKTLVS	T C VILSGMTNIICLLYVGWVTNY	Q8K1B9	Ratón
B4GALNT1	MWLGRRA	L C ALVLLACASLGLLYA	Q00973	Humano
B3GALNT2	MRNWL	LL C P C VLGAALHLWLRL	Q8NCR0	Humano
MGAT3	MKMRRYK	LFLM C MAGLCLISFL	Q09327	Humano
GBGT1	MHRRR	LALGLGF C LLAGTSLSVLVVY	Q8N5D6	Humano
GALNACT2	MRVSTIRSGRI	C RAL C LLVLLPLLYLLA	Q8MV48	Drosophila
pGANT8	M C LDIWRHKKK	VLPLLLMAIGSHIYYLYTL	Q9VUT6	Drosophila
pGANT35A	MMQIKR	LL C K S CGLGTLLVAVVWLLALLF	Q8MVS5	Drosophila
B4GALT1	MRFREQFLGSSAAMPGATLQRA C R	LLVAV C ALHLGVTLYVYLSG	P15535	Ratón
B4GALT2	MSRLLGGTLERV C KA	VLL C LLHFLVAVILYFDVYA	O60909	Humano
B4GALT3	MLRLLER P C	TLALLVGSQAVMMYLSLGGF	O60512	Humano
B4GALT4	MGFNLFHLSYK	FRLLLLTLCLTVVGWATSNYFVGAI	O60513	Humano
B4GALT7	MFPSRRKAAQLPWEDGRSGLLSGGLPRK C S	VFHLFVA C LSLGFSSLLWLQL	Q9UBV7	Humano
B3GALT1	MASKVS	C LYVLTVCWASALWYLSIT	Q9Y5Z6	Humano
B3GALT2	MLQWRRRH C CFAKMTWNKRSLFR	THLIGVLSLVLVFLFAMFLFNH	O43825	Humano
B3GNT4	MLPPQPSAAHQGRGGRSGLLPKGPAML C	RL C WLVSYSLAVLLGCLLFL	Q9COJ1	Humano
B3GALT5	MAFPKMR	LMIY C LLVLGALCLYFSMYSL	Q9Y2C3	Humano
B3GALT5	MKRFYGG	LLVSMCMFLTVYRYV	Q8L7F9	Arabidopsis
B3GALT6	MKLLRRAWRRR	AALGLGTAL C GAALLYLARCAA	Q96L58	Humano
FUT1	MWTPSRRQ	L C L T FLLV C VLSAGSFFF	O09160	Ratón
SEC1	MPSDS C LLSLTVLQRLRAI C	PPLSTFYLFVIFVSTIFHC	P97353	Ratón
FUT3	MYPPGCAKVK C SWHH	C LPGLLQLLALCFYSYL	Q11126	Bovino
FUT3	MDPLGAAPQWPWRR	C LAALLFQLLVAVCFYSYL	P21217	Humano
FUT5	MDPLGPAKPQWLWRR	C LAGLLFQLLVAVCFYSYL	Q11128	Humano
FUCTA	MRRPKISLKK	YFYTLI C ALLIFGFSL	Q9VUL9	Mosca
KTR2	MQI C KVFLTQVKK	LLFVSL C LIAQTCWLALV	P33550	Levadura
KTR5	MLLIRRTINAFLG C IH	C NLTAT C ILIAFVITMYVVLV	P53966	Levadura
KTR7	MAIRLNPKVRRFLDK C RQKRYG	FLFLG C IFAILYCMGTWPFFA	P40504	Levadura
MNN1	MLALRRFILNQRSLRS	C TIPILVAGALIIILVLFQLV	P39106	Levadura

Figura 8. Secuencia del dominio N-terminal de glicosiltransferasas. Recopilación parcial de la secuencia de los dominios N-terminales de glicosiltransferasas que poseen residuos de cisteínas cercanos al dominio transmembrana o embebidos en el mismo. Las cisteínas que podrían ser sustrato de la S-acilación se encuentran resaltadas. La recopilación de las secuencias fue realizada a partir de la base de datos Uniprot.

	Dominio Citoplasmático	Dominio Transmembrana	
Q9UNP4 HUMAN		MRRPSLLLKD ILKCTLLVFGVWIL-YILKL	SialT1
Q70D51 BOVIN		MRRPNLLLKD ILKCTLLLFGVWILFYILKL	
Q6KB55 PANTR		MRRPSLLLKD ILKCTLLVFGVWIL-YILKL	
E2R0E6 CANLF		MRRPNLLLKD ILKCTLLVFGVWIL-YILKL	
F7A1D7 MACMU		MRRPSLLLKD ILKCTLLVFGVWIL-YILKL	
O88829 MOUSE		MRRPSLLIKD ICKCTLVAFGVWLL-YILIL	
Q68G12 RAT		MRRPSLLLKD ILKCTLVVFGVWLL-YILKL	
Q92185 HUMAN	MSEFCRARRQTSRGAMAVLAWKFPRTLPM	GASAIQVVICNLYIFPV	SialT2
Q6ZXD2 BOVIN	MSEFCRARRHTSRGAMAVLAWKFPRTLPM	GASAIQVVICNLYVFPV	
P61642 PANTR	MSEFCRARRQTSRGAMAVLAWKFPRTLPM	GASAIQVVICNLYIFPV	
F1PHX4 CANLF	MSEFCRARRHTSRGAMAILAWKFPRTLPM	GASAIQVVICNLYIFPV	
F6SNF2 MACMU	MSEFCRARRQTSRGAMAVLAWKFPRTLPM	GASAIQVVICNLYIFPV	
Q64687 MOUSE	MSEFCRA-LHTSRGAMAMLARKFPRTLPM	GASAIQVVICNLYIFPV	
P70554 RAT	MSEFCRGGP-LHTSRGAMAMLARKFPRTLPM	GASAIQVVICNLYVFPV	
Q00973 HUMAN		MWLGRRR ICALVLLLCASLGLLYAST	GalNAcT
A5PJP7 BOVIN		MRLGRRR ICVVLVLLLCASLGLLYAST	
H2Q6B9 PANTR		MWLGRRR ICALVLLLCASLGLLYAST	
E2QYX4 CANLF		MRLGRRR IYALVLLLCASLGLLYVST	
F6R9K4 MACMU		MWLGRRR ICALVLLVLCASLGLLYAST	
Q09200 MOUSE		MRLDRRA IYALVLLLCASLGLLYSST	
Q10468 RAT		MRLDRRA IYALVLLLCASLGLLYAST	
Q16842 HUMAN		MKCSLR VWFLSVAFLLVFIMSLLFTY	SialT4
Q6H8M9 BOVIN		MKCSLR VWFLSMAFLLVFVMSLLFTY	
Q6KB58 PANTR		MKCSLR VWFLSVAFLLVFIMSLLFTY	
E2RR49 CANLF		MKCSLR VWFLSVAFLLVFIMSLLFTY	
F6XP05 MACMU		MKCSLR VWFLSVAFLLVFIMSLLFTY	
Q11204 MOUSE		MKCSLR VWFLSMAFLLVFIMSLLFTY	
Q11205 RAT		MKCSLR VWFLSMAFLLVFIMSLLFTY	

Figura 9. Alineamiento de los Ntds de las GGTs SialT1, SialT2, GalNAcT y SialT4. El alineamiento de las secuencias primarias de los dominios citoplasmáticos de Sial-T1, Sial-T2, GalNAc-T y Sial-T4 revela la presencia de cisteínas conservadas. El análisis se llevó a cabo utilizando el software Clustal Omega (<http://www.uniprot.org/align/>).

2. Los Ntds de glicosiltransferasas de gangliósidos están S-acilados en células CHO-K1

Para corroborar la hipótesis de que las cisteínas conservadas en el dominio N-terminal (Ntd) de las glicosiltransferasas son S-aciladas, se realizó el método de intercambio del grupo acilo por biotina (descripto más adelante), utilizando construcciones que expresan los Ntds de Sial-T1, Sial-T2, GalNAc-T y Sial-T4, fusionados a la proteína fluorescente amarilla (Yellow Fluorescent Protein o YFP) o a la proteína monomérica Cherry (Figura 10 A). Como control negativo del ensayo, solo se construyeron Ntds mutantes de GalNAc-T y Sial-T4 fusionados a mCherry, en los cuales las cisteínas (C) candidatas a ser modificadas fueron reemplazadas por alaninas (A) (Figura 10 B). GalNAc-T posee dos cisteínas en su dominio N-terminal, ambas embebidas en el dominio transmembrana. Una de ellas se localiza en la posición 9 cercana al borde citoplasmático y la otra está más alejada, localizada en la posición 17. Para determinar si uno o ambos residuos están S-acilados se construyeron los simples mutantes de GalNAc-T, C9A y C17A y la doble mutante C9A/C17A como control negativo. En el caso de Sial-T4 se mutó la

única cisteína citoplasmática presente en el dominio N-terminal, en la posición 3 de la proteína, generando la mutante C3A (Figura 10 B).

Los Ntds han sido ampliamente caracterizados y se sabe que se comportan de la misma manera que la proteína completa en cuanto a localización subcelular en el complejo de Golgi e interacción con otros miembros de la familia [54, 55].

	Dominio Citoplasmático	Dominio Transmembrana
A		
Sial-T1	MRRPSLLIKD	ICK C TLVAFGVWLLYLIL
Sial-T2	MSP C GRARRQTSRGAMAVLAWKFPRTLPM	GASAL C VVV L CWLYIFPV
GalNAc-T	MWLGRRR	L C ALVLLLA C ASLGLLYA
Sial-T4	MK C SLR	VWFLSVAFLLVFIMSLLFY
B		
GalNAc-T C9A	MWLGRRR	L A ALVLLLA C ASLGLLYA
GalNAc-T C17A	MWLGRRR	L C ALVLLLA A ASLGLLYA
GalNAc-T C9A/C17A	MWLGRRR	L A ALVLLLA A ASLGLLYA
Sial-T4 C3A	MK A SLR	VWFLSVAFLLVFIMSLLFY

Figura 10. Esquema de la secuencia de los dominios citoplasmáticos de las GGTs utilizados. A. Secuencia de los dominios citoplasmático y transmembrana de Sial-T1, Sial-T2, GalNAc-T y Sial-T4. Las cisteínas conservadas están remarcadas en negrita. **B.** Secuencia de los Ntds mutantes de GalNAc-T y Sial-T4, en lo cuales las cisteínas (C) fueron reemplazadas por alanina (A).

Originalmente, la identificación de proteínas S-aciladas se realizaba mediante marcado metabólico con H³-palmitato. Sin embargo, debido a los largos tiempos de exposición requeridos y a las dificultades en la detección de proteínas con bajos niveles de expresión, se han desarrollado otros métodos más robustos, más rápidos y menos costosos para la identificación de nuevas proteínas S-aciladas, como el ensayo de intercambio del grupo acilo por biotina o ABE (por su siglas en inglés: Acyl-Biotin Exchange) [144]. En este trabajo utilizamos una versión modificada del ABE [78] para determinar el estado de S-acilación de los Ntds (Figura 11). El método consiste en tres pasos:

1. Incubación de las proteínas con N-etilmaleimida (NEM). Este compuesto reacciona con los grupos tioles libres de las cisteínas bloqueando aquellas que no están S-aciladas.
2. Incubación de la muestra en presencia de Hidroxilamina a pH 7.4 y el agente biotinilante, HPDP-Biotina (N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio) propionamida). La Hidroxilamina a pH neutro rompe el enlace tioéster entre el acilo y el tiol de las cisteínas, dejando libre aquellas que estaban modificadas. El HPDP-Biotina reacciona con las cisteínas libres que originalmente estaban modificadas. Como control se incubó la mitad de la muestra en ausencia de hidroxilamina, donde no debería ocurrir marcación con biotina.
3. Incubación de las muestras con estreptavidina unida a una matriz de agarosa para la captura y posterior elución de las proteínas biotiniladas.

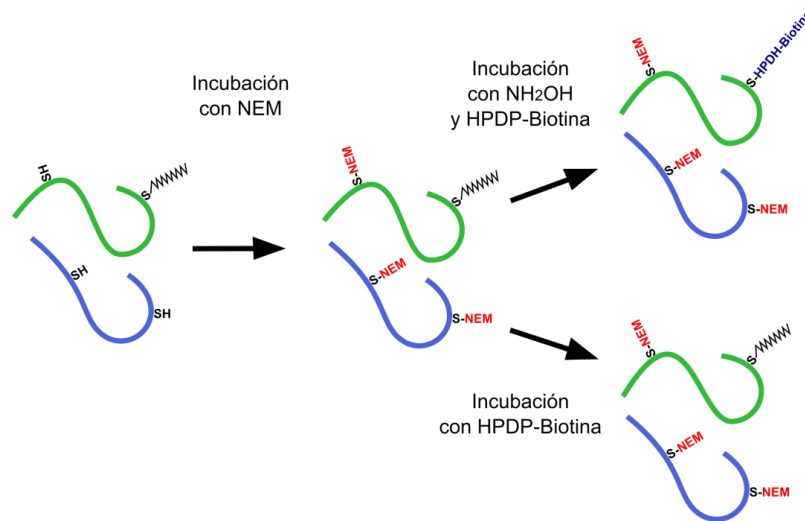


Figura 11. Esquema del ensayo de intercambio del grupo acilo por biotina (ABE). El esquema representa proteínas S-aciladas (verde) y no S-aciladas (azul) presentes en un extracto proteico. Las muestras son tratadas con N-etilmaleimida (NEM) para bloquear los grupos tiol libres. Luego se incubó la mitad de la muestra con hidroxilamina y HPDP-Biotina para marcar las cisteínas S-aciladas. Como control se incubó la otra mitad de la muestra sin hidroxilamina pero con HPDP-biotina. Las muestras biotiniladas son purificadas mediante cromatografía de afinidad con estreptavidina-agarosa.

Una vez eluidas, las muestras proteicas son analizadas mediante SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo específico contra la proteína de interés.

La identificación de proteínas S-aciladas mediante ABE no es trivial ya que la técnica requiere de numerosos pasos de precipitación de las proteínas (ver materiales y métodos) que en muchos casos han dificultado la detección de aquellas con bajos niveles de expresión o con tendencia a la agregación, como ocurre para muchas glicosiltransferasas estudiadas en este trabajo de tesis.

Para la identificación de S-acilación en las proteínas de interés, se transfectaron células CHO-K1 con las construcciones indicadas y luego de 18 horas post-trasfección se procesaron de acuerdo al protocolo del ABE. El análisis mediante Western blot revela que las muestras tratadas con hidroxilamina presentan una señal correspondiente a las proteínas de interés, que es específica ya que está ausente en las muestras control sin hidroxilamina (Figura 12 A).

Para el caso del Ntd de GalNAc-T, el ABE de las mutantes revela que solo la cisteína en la posición 9 está S-acilada, debido a que no se aprecia señal cuando está mutada (Ntd GalNAc-T C9A-Cherry), mientras que la mutación en la cisteína 17 (Ntd GalNAc-T C17A-Cherry) no afecta la S-acilación de la proteína. Como es de esperarse, la doble mutante Ntd GalNAc-T C9A/C17A-Cherry no está S-acilada (Figura 12 B). Como control positivo de este ensayo se observó el estado de S-acilación de Caveolina, una proteína que está S-acilada en esta línea celular [145], utilizando un anticuerpo anti-Caveolina para revelar el Western blot. Por otra parte, el resultado del ABE para el Ntd mutante Sial-T4 C3A-Cherry es negativo, confirmando

que la señal positiva observada para el Ntd salvaje (Ntd Sial-T4-Cherry) se debe a la S-acilación de la única cisteína ubicada en la posición 3 (Figura 12 C).

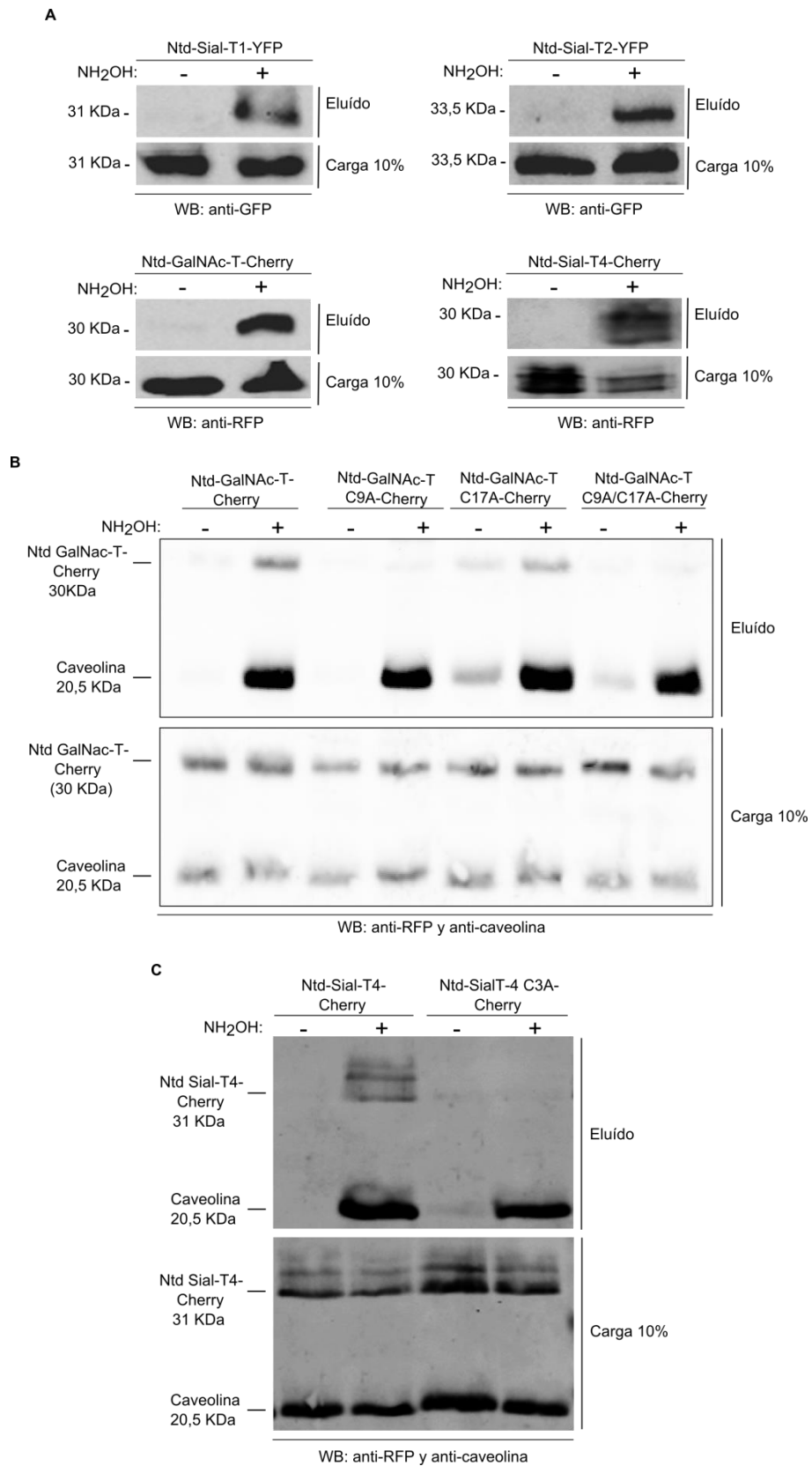


Figura 12. Ensayo de ABE de los Ntds de las GGTs en células CHO-K1. Muestras proteicas provenientes de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan las construcciones indicadas, se procesaron de acuerdo al ensayo de ABE en presencia (+) o ausencia (-) de hidroxilamina (NH_2OH). Las muestras proteicas fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de Western blot. El control de carga corresponde al 10% del total de la proteína incubada con estreptavidina-agarosa. **A.** Ensayo de ABE de los Ntds de Sial-T1-YFP, Sial-T2-YFP, GalNAc-T-Cherry y Sial-T4-Cherry. Los Western blots fueron revelados con un anticuerpo específico anti-GFP (Green Fluorescent Protein) que reconoce a YFP (Yellow Fluorescent Protein) o anti-RFP (Red Fluorescent Protein) que reconoce a la proteína mCherry. **B.** Ensayo de ABE del Ntd GalNAc-T-Cherry y los Ntds mutantes en las cisteínas, GalNAc-T C9A-Cherry, GalNAc-T C17A-Cherry y GalNAc-T C9A/C17A-Cherry. El Western blot se reveló con anti-RFP y anti-Caveolina para control positivo del ensayo. **C.** Ensayo de ABE del Ntd Sial-T4-Cherry y del Ntd mutante Sial-T4 C3A-Cherry. El Western blot se reveló con un anticuerpo anti-RFP y anti-Caveolina.

Estos resultados indican que las cisteínas presentes en el dominio N-terminal de las glicosiltransferasas son sustratos de la S-acilación.

3. Las glicosiltransferasas son sustrato de la S-acilación

Para corroborar que la S-acilación es una modificación presente en las glicosiltransferasas analizamos el estado de S-acilación de Sial-T4 en su versión de proteína completa, rotulada con el epítipo HA en su extremo C-terminal (Sial-T4-HA). Como control negativo del ensayo se utilizó la versión mutante de la cisteína en la posición 3 en el contexto de la proteína completa y rotulada con HA (Sial-T4 C3A-HA). Estas construcciones se transfectaron en células CHO-K1 y luego de 18 hs post-transfección fueron sometidas al ensayo de ABE de acuerdo al protocolo. El resultado del ABE indica que Sial-T4-HA está S-acilada, no así la mutante Sial-T4 C3A-HA (Figura 13), confirmando la predicción de que la cisteína conservada (C3), presente en el Ntd de Sial-T4 es reconocida y modificada específicamente por la maquinaria de S-acilación celular, en el contexto de la proteína completa.

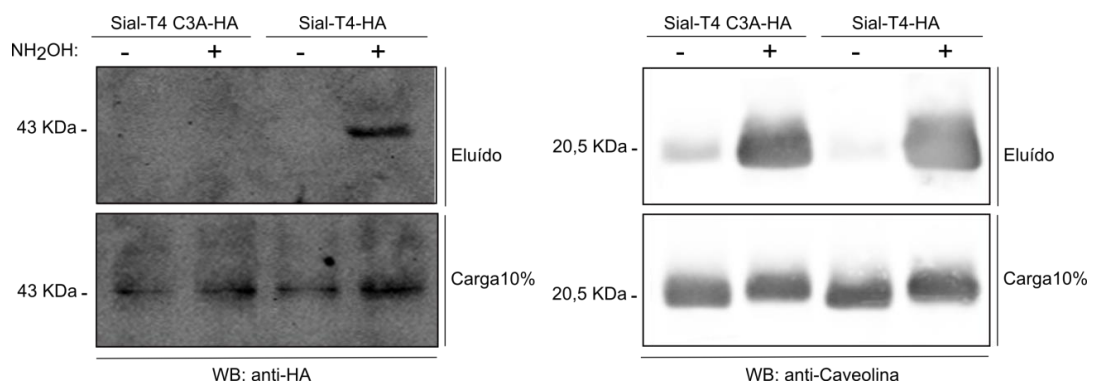


Figura 13. Ensayo de ABE de las proteínas completas Sial-T4-HA y Sial-T4 C3A-HA en células CHO-K1. Extractos proteicos provenientes de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan la proteína Sial-T4-HA o la mutante Sial-T4 C3A-Cherry, se procesaron de acuerdo al ensayo de ABE en

presencia (+) o ausencia (-) de hidroxilamina (NH_2OH). Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-HA (policlonal de conejo generado en nuestro laboratorio) (panel izquierdo). El control de carga corresponde al 10% del total de la proteína incubada con estreptavidina-agarosa. Como control positivo se reveló la misma membrana con un anticuerpo anti-Caveolina (panel derecho). Debido a la gran diferencia de las intensidades entre las proteínas de interés y Caveolina, fue necesario escanear por separado para que la marca de esta última no oculte la marca revelada con el anticuerpo anti-HA.

El control positivo del ensayo, revelado con anti-Caveolina se muestra en un panel separado debido a la gran diferencia en la intensidad de las señales (de las proteínas de interés y caveolina).

Para confirmar que la S-acilación constituye una modificación de las glicosiltransferasas en condiciones fisiológicas, se evaluó el estado de S-acilación de Sial-T2 endógena. En primera instancia se determinó la expresión de esta enzima en células humanas HEK293F (Human Embryonic Kidney Cells), ya que Sial-T2 no está presente en células CHO-K1. La expresión de la proteína se analizó en la fracción de membranas de células HEK293F mediante SDS-PAGE seguido de Western blot, utilizando un anticuerpo comercial contra Sial-T2, que reveló una banda del peso molecular esperado para la enzima (Figura 14 A). Posteriormente, se realizó el ensayo de ABE utilizando estas células y el mismo anticuerpo comercial para su revelado (Figura 14 B). El resultado obtenido fue positivo aunque llamativamente, los niveles detectados son mucho menores al control de carga (menores al 10%). Esto puede deberse a la agregación de la proteína durante los múltiples pasos de precipitación con cloroformo: metanol que requiere la técnica. Sin embargo, no puede descartarse la posibilidad de que los niveles de proteína S-acilada en condiciones fisiológicas sean bajos con respecto al total de la proteína presente en las células.

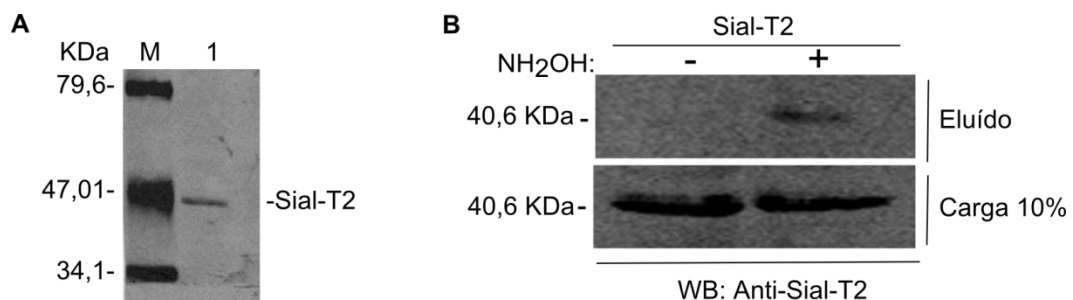


Figura 14. Estudio de la S-acilación de Sial-T2 endógena en células HEK293F. **A.** Western blot de la fracción de membranas de células HEK293F revelado con un anticuerpo comercial anti-Sial-T2. Para este ensayo fueron sembrados aproximadamente 20 μg de proteínas de membranas en el carril 1. La masa molecular teórica para Sial-T2 es 40 KDa y con la glicosilación se estima aproximadamente en 47 KDa. **B.** Ensayo de ABE de la fracción de membranas de células HEK293F. El análisis de las muestras se llevó a cabo mediante SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo específico contra Sial-T2 humana. El control de carga corresponde al 10% del total de la proteína incubada con estreptavidina-agarosa.

Estos resultados indican que Sial-T4, Sial-T2 y, presumiblemente otros miembros de la familia con cisteínas en su dominio N-terminal, son reconocidos y modificados por la maquinaria de S-acilación celular, lo que constituye una modificación lipídica novedosa no descrita hasta el momento en la familia de las glicosiltransferasas.

4. La S-acilación del Ntd de GalNAc-T ocurre en el retículo endoplásmico

En el año 2010 se sugirió que la S-acilación de proteínas ocurre en el complejo de Golgi y que carecería de especificidad [146]. No obstante, numerosos estudios previos y posteriores demuestran que esta modificación también ocurre en otros compartimentos como el retículo endoplásmico, endosomas y la membrana plasmática [80, 134, 147, 148]. A fin de localizar el compartimento donde ocurre la S-acilación de las glicosiltransferasas, se utilizó como modelo una versión trunca del Ntd de GalNAc-T, que carece de su dominio citoplasmático. En este dominio se encuentra un motivo dibásico necesario para su interacción con Sar1 y posterior tráfico hacia el complejo de Golgi en vesículas COPII [44]. De esta manera, la versión mutante queda retenida en retículo endoplásmico y es posible analizar su estado de S-acilación en esta condición.

Para este ensayo se utilizó la versión trunca del Ntd de GalNAc-T fusionada a Cherry y se sobreexpresó de manera transiente en células CHO-K1. Luego de 18 horas post-transfección se procesó la muestra de acuerdo al protocolo del ensayo de ABE y se analizó mediante Western blot. El resultado de este ensayo indica que la mutante retenida en el retículo endoplásmico está S-acilada. Esto sugiere que al menos una Palmitoiltransferasa capaz de reconocerla se encuentra localizada en esta organela (Figura 15).

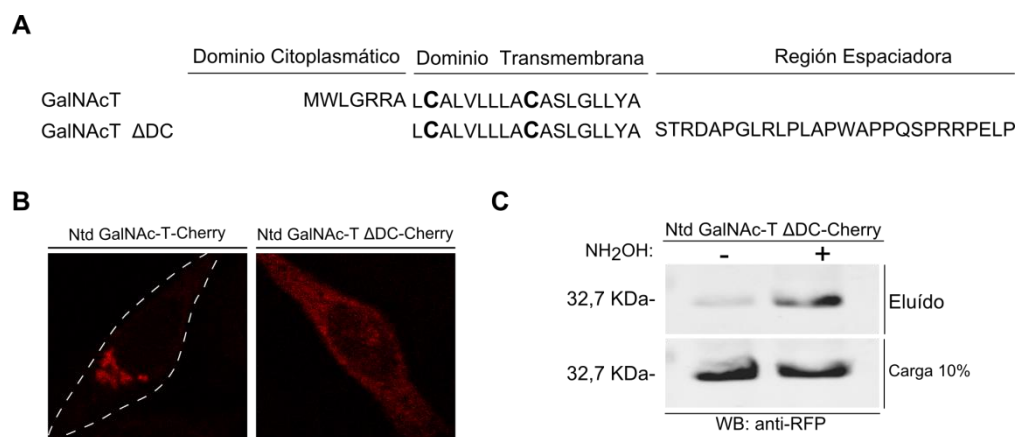


Figura 15. Estudio del estado de S-acilación del Ntd mutante Δ DC de GalNAc-T-Cherry. A. Secuencia primaria del Ntd de GalNAc-T y del Ntd mutante GalNAc-T Δ DC utilizados en este ensayo. **B.** Localización subcelular descrita para los Ntds de GalNAc-T, en el complejo de Golgi para la versión salvaje (Ntd GalNAc-T-Cherry) y en el retículo endoplásmico para la versión mutante (Ntd GalNAc-T

Δ DC-Cherry) en células CHO-K1. C. Ensayo de ABE del Ntd mutante GalNAc-T Δ DC-Cherry en células CHO-K1. El Western blot fue relevado con un anticuerpo específico anti-RFP.

Además, estudiamos el estado de S-acilación de una mutante de Sial-T4 que queda retenida en el retículo endoplásmico debido a la mutación en sus sitios de glicosilación [62]. Se transfectaron células CHO-K1 con la mutante de la enzima fusionada a un epítipo de HA, Sial-T4 N92/211Q-HA, o con la versión salvaje, Sial-T4-HA y, 18 horas post-transfección, se procesaron de acuerdo al protocolo del ABE. Notese que la migración electroforética de las proteínas es diferente (Figura 16, control de carga en el panel izquierdo) debido a la ausencia de glicosilación en la proteína mutante, que disminuye su masa molecular. El resultado de este ensayo indica que Sial-T4 N92/211Q-HA no está S-acilada (Figura 16), sugiriendo que la enzima que cataliza la S-acilación de Sial-T4 se encuentra localizada en un compartimento diferente al retículo endoplásmico. No obstante, es importante destacar que la glicosilación de estas enzimas es necesaria para su correcto plegamiento, de modo que no podemos descartar la posibilidad de que la ausencia de S-acilación en esta mutante sea consecuencia de un plegamiento defectuoso de la proteína. El control positivo del ensayo revelado con anti-Caveolina, se muestra en un panel separado debido a la diferencia entre la intensidad de la señal de interés y la intensidad de la señal control.

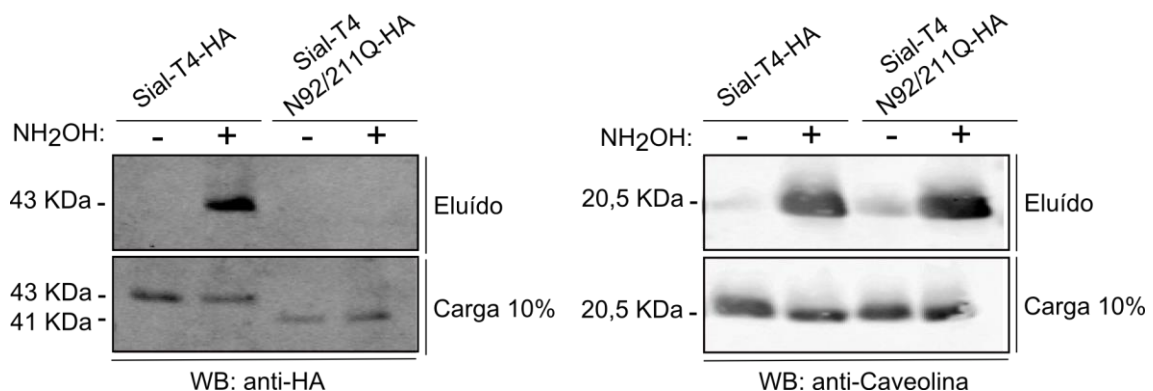


Figura 16. Ensayo de ABE de Sial-T4-HA y de la mutante Sial-T4 N92/211Q-HA en células CHO-K1. Extractos proteicos provenientes de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan la proteína Sial-T4-HA o la mutante de glicosilación, Sial-T4 N92/211Q-HA, se procesaron de acuerdo al ensayo de ABE en presencia (+) o ausencia (-) de hidroxilamina (NH₂OH). Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-HA (panel izquierdo). El control de carga corresponde al 10% del total de la proteína incubada con estreptavidina-agarosa. Como control positivo del ensayo se reveló la misma membrana con un anticuerpo anti-Caveolina (panel derecho). Debido a la gran diferencia de las intensidades entre las proteínas de interés y Caveolina, fue necesario escanear por separado para que la marca de esta última no ocultara la marca revelada con el anticuerpo anti-HA.

Estos resultados indican que en el retículo endoplásmico se encuentra al menos una palmitoiltransferasa capaz de reconocer y modificar a las glicosiltransferasas, pero también es

posible que otros miembros de esta familia sean modificados por PATs localizadas en otros compartimentos.

5. Ensayos Funcionales de la S-acilación en glicosiltransferasas de gangliósidos

5A. La S-acilación no afecta sustancialmente la localización subcelular de las glicosiltransferasas.

Las glicosiltransferasas se encuentran localizadas en el complejo de Golgi y se ha propuesto que estarían organizadas a lo largo de la vía secretora de acuerdo a su función en la vía de síntesis. Se ha descrito que estas enzimas se encuentran glicosiladas y que esta modificación sería importante para su correcto plegamiento y salida de retículo endoplásmico hacia el complejo de Golgi [60, 62]. Esta salida está mediada por Sar1, capaz de reconocer e interactuar con un motivo dibásico presente el dominio citosólico de las GTs, permitiendo su anclaje a vesículas COPII. No obstante, los mecanismos que mantienen la localización específica y diferenciada de cada glicosiltransferasa, una vez que llegan al complejo de Golgi, no se conocen. Estudios realizados en el laboratorio del Dr Hugo Maccioni, sugieren que serían los dominios citoplasmáticos los que determinan la localización diferencial de estas enzimas [54].

Hasta el momento no se han reportado otras modificaciones distintas a la glicosilación que pudieran afectar la localización de estas proteínas, de modo que estudiamos la localización subcelular del Ntd no acilable GalNAc-T C9A-Cherry en comparación al Ntd GalNAc-T-YFP salvaje, mediante un análisis de colocalización en 3D por microscopía confocal (Figura 17).

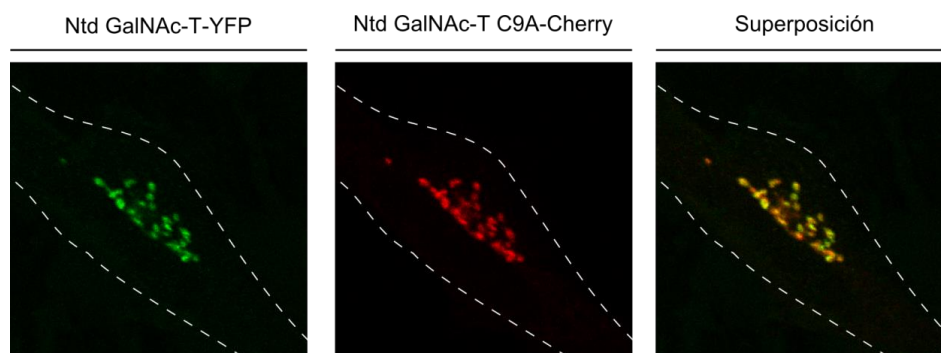


Figura 17. Estudio de la localización de la mutante no acilable GalNAc-T C9A-Cherry. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan el Ntd GalNAc-T-YFP y el Ntd mutante GalNAc-T C9A-Cherry. El último panel muestra en color amarillo la superposición de las señales fluorescentes. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal FV1000 utilizando un objetivo 60x.

Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo para determinar el coeficiente de superposición o colocalización de Manders (MCC) [149] de las señales de emisión de las proteínas fluorescentes, que permitió establecer el grado de colocalización de la mutante con respecto a la versión salvaje. Este coeficiente puede tomar valores entre 0 (para proteínas que no colocalizan) y 1 (para proteínas que colocalizan perfectamente). El MCC obtenido para los Ntds GalNAc-T C9A-Cherry y GalNAc-T-YFP es $0,99 \pm 0,026$ utilizando un $n=10$. Este resultado sugiere que, en las condiciones ensayadas, la S-acilación no sería esencial para que la proteína alcance su localización en el complejo de Golgi. Sin embargo, diferencias en la localización sub-Golgi de las glicosiltransferasas no pueden ser detectadas mediante este tipo de análisis. Para determinar si la ausencia de S-acilación provoca un cambio en la localización sub-Golgi de esta proteína, se transfectaron células en las mismas condiciones del ensayo anterior y se incubó con Brefeldina A (BFA) antes de su fijación. BFA es un metabolito tóxico producido por el hongo *Penicillium brefeldianum* que impide el tráfico vesicular desde el retículo endoplásmico hacia el complejo Golgi mediante la inhibición de la GTPasa Arf1 [150, 151]. En estas condiciones la región proximal del complejo Golgi se fusiona con el retículo endoplásmico. Por otro lado, el TGN fusiona con los endosomas de reciclado colapsando en una estructura perinuclear [152]. De esta manera, es posible diferenciar proteínas con localización proximal, que adquieren un patrón de distribución reticular, de aquellas distales concentradas en una estructura perinuclear definida. Se ha descrito que la localización de GalNAc-T es en el *trans* Golgi pero en condiciones de sobreexpresión como las utilizadas en este ensayo, la presencia de BFA provoca una distribución tanto en la estructura perinuclear como reticular (Figura 18). El resultado de este análisis muestra que en presencia de BFA, la distribución de la mutante no acilable es igual a la distribución de la proteína S-acilada con un MCC de $0,98 \pm 0,016$. Esto sugiere que la S-acilación no determinaría la localización sub-Golgi de esta proteína.

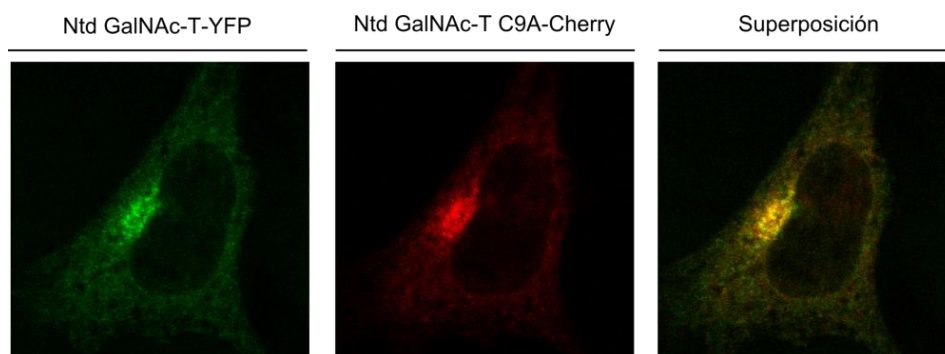


Figura 18. Estudio de la localización del Ntd GalNAc-T C9A-Cherry en presencia de BFA. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan el Ntd GalNAc-T-YFP y el Ntd mutante GalNAc-T C9A-Cherry, en presencia de BFA. El último panel muestra en color amarillo la superposición de las señales fluorescentes. Las células fueron incubadas en presencia de $2 \mu\text{g/mL}$ de BFA durante 30 minutos, antes de su fijación. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal FV1000 utilizando un objetivo 60x.

Mediante co-expresión e inmunofluorescencia del Ntd Sial-T4 C3A-Cherry y la versión salvaje de la proteína completa Sial-T4-HA, observamos que la localización de la mutante no es modificada drásticamente por la falta de S-acilación, tanto en presencia como en ausencia de BFA (Figura 19).

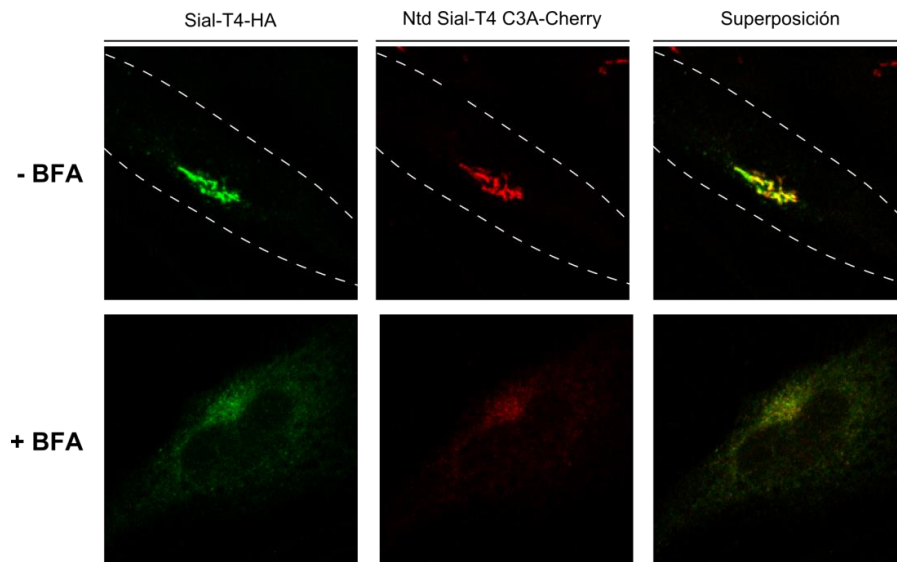


Figura 19. Estudio de la localización de Sial-T4 C3A en células CHO-K1. Microscopía de fluorescencia de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan a la proteína completa Sial-T4-HA y al Ntd mutante Sial-T4 C3A-Cherry. La detección de Sial-T4-HA se llevó a cabo mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo monoclonal anti-HA y un anticuerpo secundario acoplado a un fluorescente (anti-mouse 488 Alexa). Las células fueron tratadas con 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BFA (+ BFA, panel inferior) o con el solvente como control (- BFA, panel superior), durante 30 minutos antes de su fijación. Las imágenes fueron tomadas en el microscopio confocal FV1000, con un objetivo 60x.

Estos resultados indican que la S-acilación no determina la localización de estas glicosiltransferasas. No obstante, el ensayo de ABE de Sial-T2 endógena (Figura 14) sugiere que los niveles de enzima S-acilada podrían ser mucho menores al total de la proteína, de modo que, si es cierta la hipótesis de que la S-acilación afecta solo a una porción minoritaria de cada glicosiltransferasa, es posible que en las condiciones de sobreexpresión en las que se llevaron a cabo estos experimentos, sea difícil evidenciar un fenotipo aberrante en su ausencia.

5B. Sial-T4 forma parte de un complejo funcional de manera independiente a su estado de S-acilación

Se ha propuesto que la maduración de productos glicosilados en el complejo de Golgi sería el resultado de la distribución en gradiente que presentan las glicosiltransferasas en esta organela. Esta distribución permitiría la síntesis de productos glicosilados de manera secuencial, en la que el producto de una glicosiltransferasa es el sustrato de la siguiente. Para muchas de estas

enzimas, incluyendo las GGTs, se ha demostrado que la eficiencia de este proceso depende de la formación de complejos funcionales entre aquellas que catalizan pasos secuenciales y que la interacción física entre ellas depende, al menos en parte, de sus dominios N-terminales [20, 55]. Se ha descrito que GalNAc-T forma un complejo con Gal-T2, mientras que Gal-T1, Sial-T1 y Sial-T2 forman un complejo diferente [24].

Por otra parte, SialT4, recientemente caracterizada [62], transfiere ácido siálico al sustrato GM1 para sintetizar principalmente GD1a. Ya que GM1 es producto de Gal-T2 (Figura 1), existe la posibilidad de que Sial-T4 interactúe con esta enzima y forme parte del complejo funcional GalNAc-T/Gal-T2. Debido a que la S-acilación ocurre en los dominios N-terminales, esta modificación podría tener un rol en la formación de los complejos funcionales de las glicosiltransferasas. Evaluamos esta hipótesis mediante ensayos de co-inmunoprecipitación para determinar si existe interacción física entre las glicosiltransferasas de interés. En primer lugar, intentamos establecer si SialT4 forma parte del complejo GalNAc-T/Gal-T2, para luego estudiar el rol de la S-acilación en la formación del mismo. Para ello se utilizaron células CHO-K1 que expresan de manera estable a GalNAc-T-myc y Gal-T2-HA [153]. Esta línea fue transfectada con un vector que expresa a Sial-T4-HA, a la mutante Sial-T4 C3A-HA, a Sial-T2-HA como control negativo (ya que no forma parte del complejo) o a Gal-T2-HA como control positivo, ya que los niveles de Gal-T2-HA expresados establemente son mucho menores a los sobreexpresados en la transfección transiente. En todos los casos se utilizaron vectores que sobreexpresan la proteína completa. Luego de 18 horas post-transfección, se lisaron las células y el extracto de proteínas totales de cada condición se incubó con un anticuerpo específico contra el epítipo myc y con proteína A unida a una matriz de agarosa. En estas condiciones GalNAc-T-myc debería ser reconocida por los anticuerpos y, a través de la proteína A, quedar unida a la matriz de agarosa. De este modo, GalNAc-T precipita con la matriz y cualquier proteína con la que estuviera interactuando físicamente, como Gal-T2-HA, debería co-precipitar con ella. Finalmente, las muestras son eluidas y analizadas mediante SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-HA, a fin de detectar las proteínas co-inmunoprecipitadas. El resultado revela que Sial-T4-HA, al igual que Gal-T2-HA, precipita en este ensayo pero no el control negativo Sial-T1-HA. De igual manera, la mutante Sial-T4 C3A-HA precipita en este ensayo (Figura 20), indicando que en las condiciones ensayadas, Sial-T4 es capaz de interactuar con el complejo en ausencia de la S-acilación.

A pesar de detectar GalNAc-T-myc mediante inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra el epítipo, no pudimos detectarla mediante Western blot. Posiblemente, la proteína se agrega durante el tratamiento de la muestra y esto le impide ingresar al gel de poliacrilamida. Otra alternativa es que el anticuerpo no reconozca la proteína mediante esta técnica.

Este resultado indica que Sial-T4 interactúa con el complejo GalNAc-T/Gal-T2, posiblemente formando parte del mismo, aunque la S-acilación de esta enzima no sería crucial para su interacción.

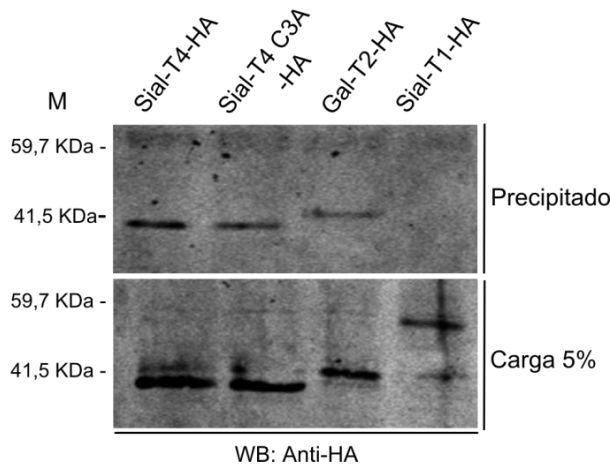


Figura 20 Co-inmunoprecipitación entre GalNAc-T y Sial-T4. Células CHO-K1 que expresan establemente a GalNAc-T-myc fueron transfectadas con vectores que expresan Sial-T4-HA, la mutante Sial-T4 C3A-HA, Gal-T2-HA o Sial-T1-HA. GalNAc-T-myc fue inmunoprecipitada con un anticuerpo específico contra el epítipo c-myc y con el dominio de unión a IgG de la Proteína A, unido a una matriz de agarosa. Para detectar las proteínas co-inmunoprecipitadas con GalNAc-T se analizaron las muestras mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico anti-HA. Como referencia se indica el peso molecular correspondiente a las bandas del marcador utilizado (M).

Es importante destacar que este ensayo no revela si la interacción de Sial-T4 ocurre con GalNAc-T que, de acuerdo a nuestros resultados, estaría S-acilada, o si ocurre con Gal-T2 que no tiene cisteínas en su Ntd y no se acila. Para descartar un rol de la S-acilación en la formación de este complejo está previsto evaluar la interacción entre proteínas no acilables (como la mutante Sial-T4 C3A y Gal-T2, o mutantes no acilables de Sial-T4 y GalNAc-T).

5C. La actividad de Sial-T4 no estaría sustancialmente afectada por la S-acilación de la proteína

Sial-T4 cataliza la adición de ácido siálico sobre el gangliósido GM1 originando principalmente GD1a. Para determinar si la S-acilación afecta la actividad de esta enzima se realizó un ensayo *in vitro* que permite evaluar la capacidad de la mutante Sial-T4 C3A-HA, de incorporar un análogo fluorescente del ácido siálico al sustrato GM1. En este ensayo se utilizan como fuente de enzima, extractos proteicos provenientes de células CHO-K1 transfectadas con vectores que sobreexpresan la enzima salvaje o la mutante C3A, en sus versiones de proteína completa. Los extractos se incuban en presencia del sustrato donador CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc y del sustrato aceptor GM1 [62]. Transcurrida la reacción, el producto se analiza mediante HP-TLC y el producto, GD1a fluorescente, se revela mediante irradiación con luz UV. La cantidad de proteína total, medida por el ensayo colorimétrico de Bradford, es la misma en cada condición, sin embargo, la cuantificación del producto se realizó relativizando la intensidad de la fluorescencia a la cantidad de enzima específica sobreexpresada, ya que los niveles de transfección o de expresión podrían no ser iguales. Para ello se realizó un Western blot de cada muestra sembrando la misma cantidad de proteína total.

La cuantificación del producto fluorescente revela que no existen diferencias significativas en la cantidad de producto obtenido con la mutante C3A en comparación a la proteína salvaje, sugiriendo que esta enzima es activa independientemente a su estado de S-acilación. No

obstante, no podemos descartar en efecto de la S-acilación sobre la actividad enzimática, ya que este ensayo fue realizado en presencia de concentraciones saturantes de sustrato y a tiempos de incubación que posiblemente superan a los tiempos de velocidad inicial. Si la enzima mutante catalizara la reacción a una velocidad menor o tuviera menor afinidad por el sustrato, se estaría contrarrestando esta deficiencia con las condiciones del ensayo, por lo tanto solo podemos concluir que la S-acilación no es esencial para la actividad enzimática pero no podemos descartar que tenga un efecto en la misma y, por lo tanto, un rol *in vivo*.

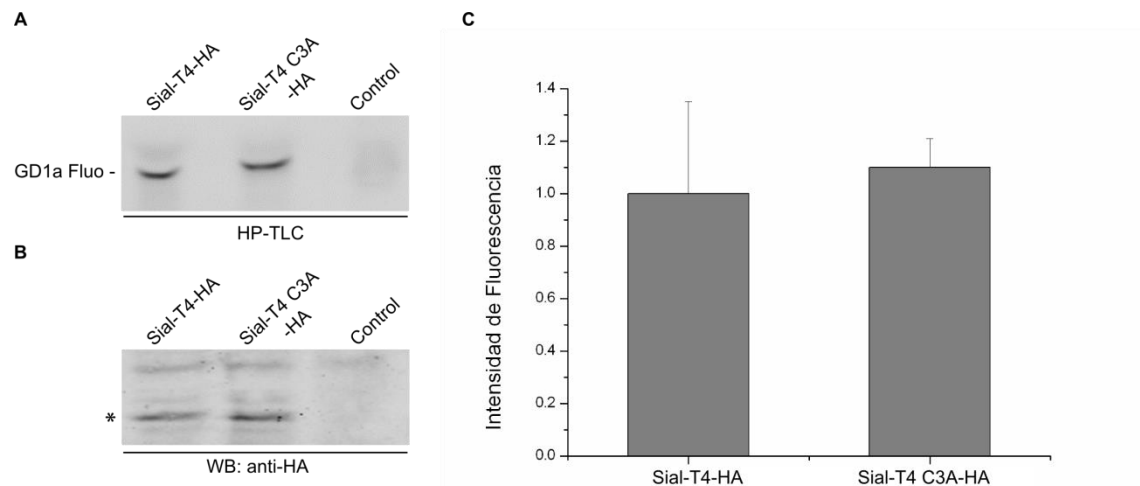


Figura 21. Análisis de la actividad enzimática de la mutante Sial-T4 C3A. La actividad enzimática fue analizada *in vitro* utilizando extractos proteicos de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan Sial-T4-HA o a la mutante Sial-T4 C3A-HA. Como control negativo se utilizó el extracto de células sin transfectar. El ensayo consiste en incubar las muestras en presencia del sustrato aceptor GM1 y del sustrato donador CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc, un análogo fluorescente de CMP-NeuAc, para luego analizar la formación de producto GD1a fluorescente. **A.** HP-TLC del producto de la reacción. La corrida se llevó a cabo utilizando los solventes A: Cloroformo: Metanol, 4:1 y B: Cloroformo: Metanol: CaCl₂ 0,2% 15:6:2 y se reveló mediante exposición a luz UV. **B.** Western blot de las muestras utilizadas para la reacción *in vitro* revelado con un anticuerpo específico contra el epítipo HA. Se sembraron 20 µg de proteínas totales en cada carril. La banda correspondiente a las versiones salvaje o mutante de Sial-T4-HA, está indicada con un asterisco (*). **C.** Cuantificación de la intensidad de producto fluorescente formado, normalizado a la cantidad de proteína específica presente en cada muestra y normalizado a la condición incubada con la proteína salvaje (n=4). La cuantificación no incluye a la condición control ya que los niveles de producto fluorescente formado no son detectables. Los softwares utilizados para la cuantificación fueron ImageJ y OriginPro8.

6. Estudio de DHHC4 como posible Palmitoiltransferasa de proteínas transmembrana tipo II

Se ha descrito que Swf1 es la Palmitoiltransferasa que cataliza la modificación de proteínas transmembrana tipo II en *S. cerevisiae* [77, 78] pero su ortólogo en mamíferos aún no ha sido identificado.

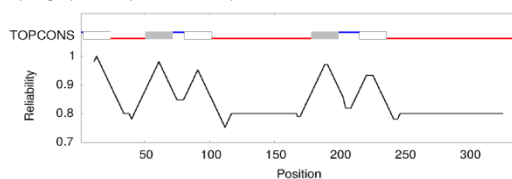
La predicción de ortólogos mediante comparación de secuencia no es muy confiable en la familia de las PATs, ya que fuera del dominio DHHC y de los motivos conservados presentan muy poca homología de secuencia, incluso entre ortólogos ya descritos. No obstante, existen otras características que podrían ser relevantes; como por ejemplo la topología de la enzima. Swf1 es la única PAT de levaduras que posee cinco pasos transmembrana y en mamíferos solo DHHC4 presenta esta misma topología, lo que podría ser importante para el reconocimiento de sustratos específicos (Figura 21).

Por otra parte, está descrito que las PATs poseen puntos determinantes de especificidad (PDEs) en su secuencia [112]. Estos son aminoácidos específicos ubicados en determinadas posiciones de la secuencia que son característicos de cada familia de ortólogos. Precisamente, DHHC4 comparte los mismos determinantes de especificidad que Swf1, sugiriendo que estas enzimas podrían reconocer el mismo tipo de sustrato.

A pesar de que existe cierta controversia respecto a la localización de Swf1 [77, 154], observaciones realizadas en nuestro laboratorio indican que esta enzima está localizada en la membrana del retículo endoplásmico cuando está sobreexpresada (no es posible detectarla a niveles endógenos) y estudios de la S-acilación de sus sustratos revelan que la modificación ocurre en esta organela [155]. La localización de DHHC4 ha sido reportada en esta misma organela y estaría determinada por la presencia del motivo de retención en retículo endoplásmico, KKXX (K= Lisina), en su extremo C-terminal. Ésta, junto con DHHC6, son las únicas PATs que poseen este motivo [156]. Nuestros resultados sugieren que GalNAc-T es modificada por una enzima localizada en el retículo endoplásmico, de modo que es posible que DHHC4 esté involucrada en este proceso.

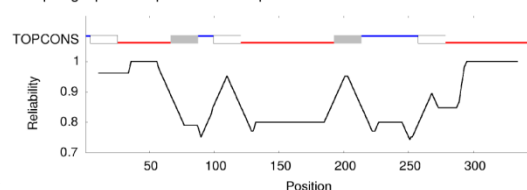
A

Topología predicha por TOPCONS para Swf1



TOPCONS TM1: 2-23, TM2: 50-71, TM3: 84-105, TM4: 176-197, TM5: 214-235

Topología predicha por TOPCONS para DHHC4



TOPCONS TM1: 5-26, TM2: 65-86, TM3: 100-121, TM4: 196-217, TM5: 256-277

Dominio transmembrana (TM)
 Dominio extracitoplásmico
 Dominio citoplásmico

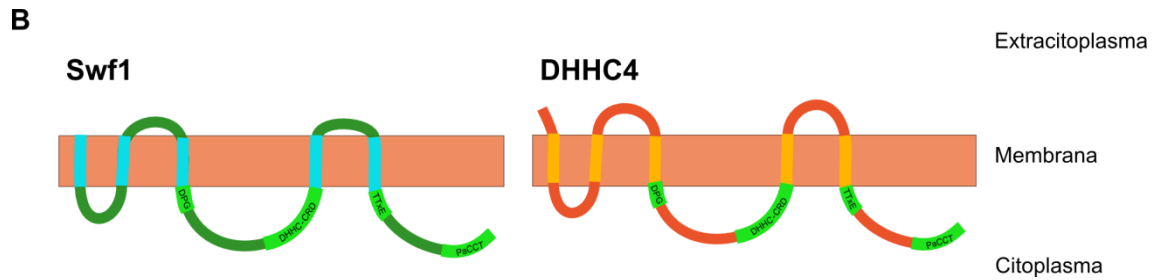


Figura 22. Predicción de la topología de Swf1 y DHHC4. A. Predicción de la probabilidad de localización de los dominios de Swf1 y DHHC4 en el espacio citoplasmático, extracitoplasmático y transmembrana determinadas por el programa TOPCONS [157]. La posición de los dominios transmembrana TM 1-5 está detallada en la figura. B. Representación esquemática de Swf1 y DHHC4 de acuerdo a la topología predicha.

6A. Generación de un anticuerpo contra DHHC4 humana

A fin de detectar versiones no rotuladas de DHHC4 decidimos generar un anticuerpo utilizando como antígeno, al fragmento citoplasmático C-terminal de DHHC4 humana, posterior al dominio transmembrana número cinco. Este dominio se expresó en *Escherichia coli* BL21 (DE3) como proteína de fusión a la Glutación-S-Transferasa de *Schistosoma japonicum* (GST) y se purificó mediante cromatografía de afinidad con una columna de Glutación-agarosa. Se utilizó esta proteína de fusión para inmunizar conejos blancos de Nueva Zelanda.

La inmunoreactividad de los sueros obtenidos post-inmunización fue determinada mediante Western blot, utilizando lisados de células HEK293F transfectadas con un vector que expresa a DHHC4 fusionada a GFP (Figura 23), a fin de identificar la proteína de interés con otro anticuerpo.

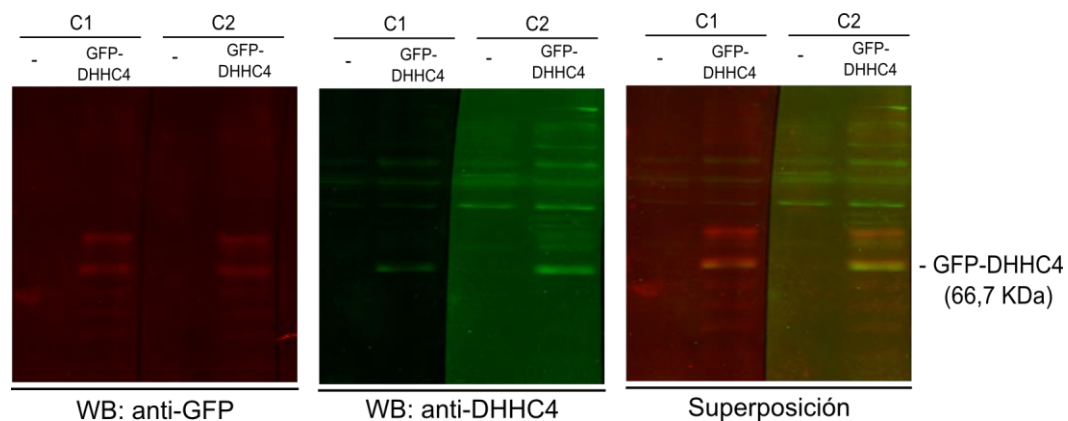


Figura 23. Análisis de la inmunoreactividad del anticuerpo anti-DHHC4. Se determinó la inmunoreactividad del anticuerpo generado mediante Western blot utilizando lisados proteicos de células HEK293F transfectadas con un vector que expresa GFP-DHHC4 o células sin transfectar como control negativo (-). Se utilizó el suero de dos conejos (C1 y C2) luego de la tercera inmunización, en una concentración 1:750. El Western blot además fue revelado con un anticuerpo monoclonal anti-GFP de

ratón. La banda de GFP-DHHC4 fue identificada mediante el uso de anticuerpos secundarios IRDye anti rabbit 800 (verde) y anti mouse 680 (rojo), contra IgG de conejo y de ratón, respectivamente, que emiten en dos canales diferentes (Odyssey, LI-COR).

El suero de los conejos inmunizados fue capaz de reconocer una banda con el peso molecular esperado para GFP-DHHC4 (67 KDa) que además es reconocida por el anti-GFP (Figura 23). La detección de esta PAT fue muy dificultosa debido al alto grado de agregación que presenta. El anticuerpo contra GFP revela bandas de menor peso molecular que posiblemente representan productos de degradación y una banda de mayor peso molecular al esperado, que no es reconocida por el anticuerpo generado. De igual manera, bandas de mayor peso molecular al esperado son reveladas por el anticuerpo generado pero no por el anti-GFP. Estas bandas posiblemente representen productos de agregación en los cuales, los dominios reconocidos por los anticuerpos no siempre se encuentren accesibles. Para disminuir este inconveniente, las muestras proteicas no deben ser calentadas pero aun así se observa parte de la muestra agregada que no ingresa al gel. Esto es muy común para proteínas con múltiples pasos transmembrana. El tratamiento de las muestras proteicas para detectar Swf1 de levaduras requiere el mismo procedimiento para evitar la agregación. Por otra parte, el anticuerpo generado fue incapaz de detectar la proteína expresada a niveles endógenos en las líneas celulares humanas HeLa y HEK293F tanto por Western blot como por inmunofluorescencia (no mostrado). Es posible que la inmunoreactividad del anticuerpo sea baja o que los niveles de DHHC4 endógena sean bajos. Para el caso de Swf1 también se desarrolló un anticuerpo policlonal en nuestro laboratorio (Trabajo de tesis de la Dra Gonzalez) que es capaz de reconocer a la proteína sobreexpresada pero no expresada a niveles endógenos, de modo que es posible que los niveles de expresión de estas proteínas sean relativamente bajos.

6B. Ensayos funcionales de DHHC4

Al comienzo de este trabajo de tesis no había información respecto a la función de DHHC4. Su actividad como Palmitoiltransferasa no había sido reportada, mucho menos los sustratos que podría S-acilar. Por tal motivo, decidimos evaluar su capacidad de S-acilación utilizando la SNARE sustrato de Swf1, Tlg1 proveniente de levaduras, que posee dos cisteínas adyacentes al borde de su dominio transmembrana. Analizamos la modificación de esta SNARE en células HEK293F sobreexpresando a DHHC4 humana, en células transfectadas con un vector que contiene la secuencia de un shRNA contra esta PAT o células transfectadas con un vector vacío como condición control. La secuencia del shRNA utilizado fue diseñada contra una de las regiones de DHHC4 que carece de homología con otros miembros de la familia. Esta secuencia fue clonada en el vector pSUPERgfp, de modo que aquellas células transfectadas con el silenciador expresan además la proteína fluorescente verde.

El método utilizado para el análisis fue una biotilación directa con el agente Biotin-BMCC, un análogo de la N-etilmaleimida, capaz de reaccionar con los grupos tioles libres de las cisteínas.

En este ensayo las cisteínas no S-aciladas reaccionan con el agente biotinizante incrementando el peso molecular de la proteína, lo que puede ser detectado por SDS-PAGE seguido de Western blot, como una disminución en su corrida electroforética. En este caso se utilizó un anticuerpo policlonal anti-Tlg1, generado en nuestro laboratorio (Figura 24).

Es importante destacar que este ensayo solo puede realizarse con sustratos que posean como únicas cisteínas aquellas que están modificadas, como Tlg1, de otra manera, el patrón de especies biotinizadas es más complejo y puede dificultar la interpretación del resultado. En aquellas condiciones en las que Tlg1 no esté S-acilada su masa molecular incrementará debido a la incorporación de Biotin-BMCC (0,5 KDa), en comparación a la modificación con palmitato (0,25 KDa).

Este ensayo reveló que en células que sobreexpresan a DHHC4, los niveles de Tlg1 modificados son mayores que en la condición control (que expresaría esta PAT a niveles endógenos). Consistente con esto, en células transfectadas con el silenciador, los niveles de SNARE no acilados y biotinizados son mayores, sugiriendo que la modificación de Tlg1 en estas condiciones estaría catalizada por DHHC4. Como control negativo del ensayo de biotilación se incluyó una mutante no acilable de Tlg1 que tiene mutadas las cisteínas por residuos de alanina. El Western blot revela además, bandas de mayor peso molecular que corresponden a las especies ubiquitinadas de Tlg1. En *S. cerevisiae*, Tlg1 es ubiquitinada cuando no está S-acilada [77], lo que parece ser reproducible en nuestros ensayos con células de mamíferos.

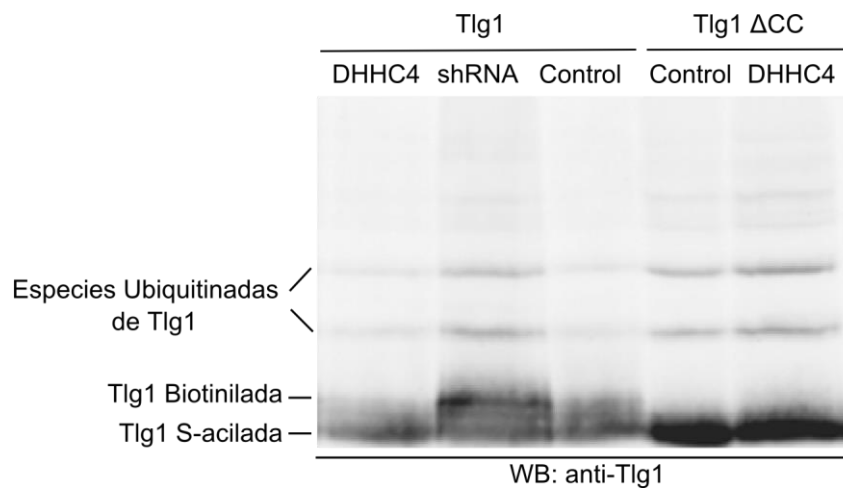


Figura 24. Efecto de DHHC4 en el estado de S-acilación de Tlg1. Ensayo de biotilación directa de Tlg1 en extractos proteicos de células HEK293F co-transfectadas con vectores que expresan a Tlg1 y con vectores que expresan a DHHC4, a un shRNA específico contra DHHC4 o un vector vacío (control). Los últimos dos carriles corresponden al ensayo de biotilación de una mutante no S-acilable de Tlg1 (Tlg1 Δ CC) en presencia de DHHC4 o en la condición control. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal anti-Tlg1.

Este resultado sugiere que DHHC4 es capaz de reconocer sustratos con cisteínas adyacentes al borde transmembrana, sugiriendo que podría ser el ortólogo de Swf1 y posiblemente la enzima involucrada en la S-acilación de las glicosiltransferasas de mamíferos.

Debido a que los cambios en la migración de una proteína biotinilada y S-acilada son muy pequeños, su detección en algunas proteínas con una única cisteína S-acilada, como GalNAc-T y Sial-T4 resulta dificultosa. En estos casos, es conveniente utilizar otros agentes de mayor peso molecular como el PEG-Maleimida (Polietilenglicol-Maleimida) de 5KDa. Para el caso de las GGTs optamos por utilizar el agente pegilante pero aún no tenemos resultados concluyentes ya que, a diferencia de otras proteínas (ver capítulo I B), el comportamiento de las GGTs cuando son pegiladas es mucho más complejo que el esperado, posiblemente debido a la agregación de las mismas en estas condiciones.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que el tiempo de vida media de las PATs no se conoce. Algunos protocolos de silenciamiento sugieren que para varios miembros de esta familia podría ser de varios días [134] pero hasta el momento no ha sido reportado. Nuestros ensayos funcionales de DHHC4 muestran que en las condiciones de silenciamiento utilizadas, aún queda un remanente de Tlg1 S-acilada. Esto podría deberse a que el periodo de tiempo ensayado no es suficiente para silenciar completamente a DHHC4 o también podría deberse a que otra PAT participa en la modificación de la SNARE. Por este motivo, intentamos generar una línea establemente silenciada utilizando el shRNA descrito pero a pesar de numerosos intentos no logramos obtenerla. Debido a que el anticuerpo generado no detecta la proteína endógena mediante Western blot, se realizó un análisis mediante RT-PCR semicuantitativo para corroborar el silenciamiento de DHHC4. El resultado de este ensayo reveló que los pocos clones que sobrevivieron al tratamiento no estaban silenciados (resultados no mostrados), sugiriendo que la función de DHHC4 podría ser esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular.

Por tal motivo, la confirmación de la hipótesis de que DHHC4 participa en la S-acilación de las glicosiltransferasas se está llevando a cabo en colaboración con el laboratorio de la Dra Gisou van der Goot, en el Global Health Institute del EPFL, en Suiza. Este laboratorio cuenta con líneas celulares HAP1 knock out para cada una de las PATs de humanos. HAP1 es una línea celular humana haploide, en las que la inactivación del gen se lleva a cabo utilizando el sistema CRISPR/Cas9 (revisado en [158]). En esta línea celular, el knock out de DHHC4 no es letal pero afecta notablemente la supervivencia y la viabilidad celular.

7. Discusión

En este capítulo mostramos evidencia de que muchas glicosiltransferasas poseen cisteínas conservadas en su dominio N-terminal y una topología que indica que serían sustratos de la S-acilación. Utilizando como modelo dominios N-terminales de glicosiltransferasas de gangliósidos (GGTs), demostramos que estas cisteínas son reconocidas y modificadas por la

maquinaria de S-acilación celular. En el caso de GalNAc-T, mediante el ensayo del ABE determinamos que solo la cisteína cercana al borde citoplasmático está S-acilada, mientras que la otra más alejada no estaría modificada, lo que refuerza la predicción de que las cisteínas localizadas cerca del borde transmembrana son sustratos de la S-acilación. Debido a que el sitio catalítico de las PATs se encuentra orientado hacia el citoplasma, es más probable que sean reconocidas aquellas cisteínas cercanas a la región citosólica, aunque no se puede descartar que cisteínas más alejadas también sean modificadas. Estudios de la S-acilación de proteínas virales con la misma topología muestran que la modificación ocurre en general, sobre residuos cercanos al borde transmembrana del lado citosólico [159].

Además demostramos que Sial-T4 y Sial-T2 están S-aciladas en dos líneas celulares de organismos diferentes y, para el caso de Sial-T2, detectamos esta modificación en la proteína expresada a niveles endógenos.

Estos resultados nos permiten postular a la S-acilación como una modificación post-traducciona novedosa y la primera modificación lipídica identificada en la familia de las glicosiltransferasas.

La mayoría de las Palmitoiltransferasas de mamíferos se encuentran localizadas en el complejo de Golgi pero algunas de ellas también se localizan en el retículo endoplásmico y la membrana plasmática [156, 160]. A fin de determinar el compartimento en el cual ocurre la S-acilación de las glicosiltransferasas utilizamos mutantes que quedan retenidas en el retículo endoplásmico y evaluamos su estado de S-acilación. Para el caso de GalNAc-T observamos que el Ntd mutante está S-acilado en el retículo endoplásmico, no así la mutante Sial-T4 N92A/N211A. Este resultado sugiere que la modificación de estas proteínas está catalizada por enzimas diferentes localizadas en compartimentos distintos. No obstante, la mutación en los sitios de glicosilación de las glicosiltransferasas evita su correcto plegamiento, por lo tanto, no podemos descartar que la falta de S-acilación observada en la mutante se deba a alteraciones en el plegamiento que afectan el reconocimiento de la proteína por parte de la Palmitoiltransferasa. Es necesario realizar estudios adicionales como por ejemplo, determinar el estado de S-acilación de la mutante de glicosilación de GalNAc-T y la mutante en el motivo dibásico de de Sial-T4 para confirmar que la modificación de estas enzimas ocurre en compartimentos diferentes.

A fin de caracterizar el rol de la S-acilación de las glicosiltransferasas estudiamos las consecuencias funcionales que podría tener esta modificación. Analizamos el comportamiento de mutantes no S-acilables, en cuanto a su localización subcelular y su capacidad de interactuar con otros miembros de la familia. Nuestros resultados indican que la S-acilación no determina la localización subcelular de estas proteínas, ya que no se observan cambios significativos en su ausencia. Por otra parte, esta modificación tampoco sería estrictamente necesaria para la interacción física entre ellas, sugiriendo que los complejos funcionales se forman aún cuando no todos sus miembros están S-acilados. Sin embargo, es importante destacar que todos estos ensayos fueron realizados en condiciones de sobreexpresión, de modo

que existe la posibilidad de que cambios sutiles provocados por la falta de S-acilación no puedan ser detectados debido en las condiciones ensayadas.

También se evaluó el efecto directo de la S-acilación sobre la actividad de Sial-T4 *in vitro* utilizando la versión no S-acilable de la misma. En este caso, encontramos que la mutante es capaz de catalizar la formación de producto, lo que sugiere en principio, que esta modificación no es crucial para la actividad enzimática. No obstante, al igual para el resto de los ensayos funcionales, las condiciones de reacción pueden enmascarar fenotipos sutiles generados por la falta de S-acilación, como por ejemplo, alteraciones en los parámetros cinéticos. Estos no podrían ser evidenciados en las condiciones ensayadas que incluyen concentraciones saturantes de sustrato y tiempos largos de incubación (2 horas). Por lo tanto, no podemos descartar un rol *in vivo*, principalmente debido al alto grado de conservación de las cisteínas en esta familia.

Similar a lo observado para las glicosiltransferasas, las SNAREs transmembrana también son capaces de llevar a cabo su función en ausencia de S-acilación [161, 162]. En estos casos, la contribución de esta modificación parece no ser esencial para la actividad de estas proteínas. Sin embargo, estudios en levaduras revelan que la ausencia de Swf1 afecta a procesos de tráfico vesicular y fusión de membranas, como por ejemplo, el tráfico de proteasas vacuolares [163]. Además, esta delección en combinación con mutaciones en genes involucrados en esta misma vía resulta letal [164]. Estas observaciones sugieren un rol importante de la S-acilación mediada por Swf1 que quizás, difícilmente pueda ser evidenciado estudiando la función aislada de sus sustratos. Es posible que la S-acilación en la familia de las glicosiltransferasas tenga consecuencias globales como se ha observado para las SNAREs transmembrana de levaduras.

También es posible que la S-acilación esté involucrada en otro tipo de procesos que no han sido estudiados en este trabajo de tesis. Para algunas glicosiltransferasas se ha descrito que una población de ellas sufriría una proteólisis del dominio N-terminal, con la consecuente liberación del dominio catalítico luminal al medio extracelular en forma soluble [29-33]. En el caso de GalNAc-T, se ha propuesto que sería reconocida por una proteasa ácida similar a Cathepsina D que podría estar localizada en los lisosomas [32] pero el mecanismo por el cual solo una población accedería a este compartimento o sería reconocida por la proteasa, no se conoce. También se ha reportado una localización ectópica de Sial-T2 y GalNAc-T en la membrana plasmática [27] pero el mecanismo por el cual solo un porcentaje menor al 10% accede a esta membrana, mientras que la mayoría queda retenida en el complejo de Golgi, no se ha determinado. Esto es interesante ya que, para muchas proteínas transmembrana, se ha descrito que la S-acilación determinaría su partición hacia dominios especializados de las membranas. La segregación hacia dominios ricos en colesterol y esfingolípidos podría direccionar el tráfico hacia la membrana plasmática u otras organelas a través de su incorporación en las vesículas secretoras. Para el caso de Sial-T2 y GalNAc-T se ha reportado que más del 90% del total de estas proteínas está excluida de microdominios enriquecidos en esfingolípidos (GEM) presentes en las membranas del Golgi [170] y los niveles de enzima detectados en la membrana plasmática representan una población minoritaria que no supera al 10% del total en la célula.

Resulta llamativo que los niveles de Sial-T2 endógena que detectamos en el ensayo del ABE son menores al 10% del total de la proteína, por lo que existe la posibilidad de que los niveles de proteína S-acilada en condiciones fisiológicas sean también bajos. Con estas observaciones, es tentador especular que en condiciones fisiológicas podría existir una población minoritaria en la forma S-acilada capaz de segregarse hacia estos dominios y alcanzar la membrana plasmática. Por otra parte, se ha postulado que las cisteínas presentes en el dominio transmembrana de algunas glicosiltransferasas serían fundamentales para la formación de homodímeros [165-167], de modo que la S-acilación podría constituir un mecanismo de regulación en estas enzimas. Si este fuera el caso, sería difícil predecir la consecuencia de esta modificación, ya que el comportamiento de las glicosiltransferasas es variable. Mientras que algunas son activas como monómeros e inactivas como dímeros [168], otras parecen requerir de la dimerización para su actividad [169].

Finalmente, nos interesamos en la identificación de la Palmitoiltransferasa que está involucrada en la S-acilación de las glicosiltransferasas de mamíferos. Nuestras observaciones apuntan a DHHC4 como principal candidato a ser la enzima que cataliza la S-acilación de proteínas transmembrana tipo II pero no podemos descartar la posibilidad de que otras PATs participen en este proceso. Al comienzo de este trabajo de tesis, la información respecto a DHHC4 era muy escasa, de modo que nos enfocamos en la caracterización de la misma mediante un estudio de su funcionalidad como palmitoiltransferasa. Nuestros resultados apoyan la predicción de que esta enzima sería capaz de reconocer cisteínas con la misma topología presente en las glicosiltransferasas y, por lo tanto, podría ser la encargada de catalizar la S-acilación de proteínas transmembrana tipo II en mamíferos, aunque no descartamos la posibilidad de que más de un miembro de la familia DHHC esté involucrado. Un estudio posterior a nuestros hallazgos postuló que DHHC4 sería capaz de modificar a la proteasa BACE1, una proteína transmembrana tipo I que está S-acilada en cuatro residuos de cisteínas, uno de los cuales se encuentra localizado cerca del borde transmembrana y otro embebido en este dominio. Mediante ensayos de sobreexpresión de las 23 PATs de mamíferos, los autores mostraron que DHHC3, -4, -7, -15 y -20 son las que provocan mayor incorporación de palmitato en esta proteasa [171]. Sería interesante determinar si todas estas PATs son capaces de modificar las cuatro cisteínas o si tienen una preferencia diferencial por los residuos de acuerdo a su localización. Estas cuestiones no fueron abordadas por los autores pero de acuerdo a nuestras predicciones, DHHC4 podría reconocer aquellas cisteínas cercanas al dominio transmembrana de BACE1.

I B. S-acilación de SNAREs transmembrana en células de mamíferos

1. Introducción

La fusión de membranas es crucial para las células eucariotas ya que está implicada en numerosos procesos como el crecimiento celular, la reparación de las membranas y la transmisión sináptica. Centrales en el mecanismo de fusión son las proteínas SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) que aportan especificidad y proveen la fuerza necesaria para acercar las bicapas lipídicas y disparar la fusión de membranas. Estas proteínas forman un complejo en configuración *trans* (localizadas en membranas opuestas) entre dos SNAREs transmembrana y una SNARE periférica. Este complejo formaría un ramillete de cuatro hélices paralelas, dos de ellas provenientes de la SNARE citosólica y las otras dos provenientes de cada SNAREs transmembrana, que utiliza la energía liberada durante su formación para acercar las membranas y gatillar su fusión (revisado en [75]). Una vez terminado el proceso, el complejo se disocia y las SNAREs vesiculares son endocitadas.

Este proceso es de particular importancia a nivel del sistema nervioso central, ya que regula la liberación de neurotransmisores en las sinapsis. Se ha descrito que numerosas proteínas neuronales, incluyendo miembros de la familia SNARE, son S-aciladas [79] y existen reportes de que mutaciones en palmitoiltransferasas como DHHC9 y DHHC15, estarían asociadas a la esquizofrenia y al retardo mental [172, 173].

Muchos miembros de esta familia son proteínas transmembrana tipo II con cisteínas, adyacentes al dominio transmembrana, que están S-aciladas. En *S. cerevisiae*, de las veintitrés SNAREs presentes, ocho están modificadas en cisteínas con esta localización [78, 80].

Las consecuencias funcionales de la S-acilación y las PATs involucradas en este proceso han sido mejor descritas para SNAREs solubles, como SNAP-25 y SNAP-23 [174-176], que necesitan de esta modificación para su anclaje a membranas, pero la información respecto a la S-acilación de SNAREs transmembrana es escasa, especialmente para SNAREs de mamíferos. La función de la S-acilación no es clara en este tipo de proteínas salvo para la SNARE endosomal de levaduras Tlg1, en la cual la ausencia de la modificación provoca una disminución de su vida media [77]. Se ha visto que las SNAREs transmembrana se localizan principalmente en membrana plasmática, TGN y endosomas, todas ellas membranas ricas en esteroides, de modo que se ha postulado que la S-acilación podría jugar un rol en la solubilidad de los TMDs en los dominios ricos en colesterol [77].

Un único trabajo, en el que se estudia la S-acilación de Sintaxina 7 y Sintaxina 8, reporta un rol de esta modificación en una SNARE transmembrana de mamíferos [80, 177]. He y Linder postularon que la S-acilación de Sintaxina 7 es necesaria para su reciclado desde membrana plasmática hacia los endosomas, mientras que para el caso de Sintaxina 8, la ausencia de esta

modificación no afectaría su localización [80]. También postularon que la S-acilación de Sintaxina 7 ocurriría en compartimentos distales de la vía secretora, debido a su sensibilidad a Brefeldina A, mientras que Sintaxina 8 sería S-acilada en compartimentos proximales. Esto resulta interesante ya que, a diferencia de lo observado en levaduras, más de una PAT estaría involucrada en la S-acilación de SNAREs transmembrana en mamíferos.

Como parte de este trabajo de tesis nos interesamos en la identificación de la/las palmitoiltransferasas involucradas en el S-acilación de SNAREs transmembrana en células de mamíferos, específicamente en miembros de la familia de las Sintaxinas.

2. La sobreexpresión de DHHC4 afecta de manera diferencial el estado de S-acilación de Sintaxina 6 y Sintaxina 1A.

Como se mencionó anteriormente, no se conoce la enzima que cataliza la S-acilación de proteínas transmembrana tipo II en células de mamíferos. Creemos que DHHC4 es un buen candidato a cumplir este rol (ver capítulo IA), de modo que evaluamos su capacidad para mediar la S-acilación de las SNAREs Sintaxina 6 (Syn6) y Sintaxina 1A (Syn1A) en células HEK293F. Para realizar este análisis se utilizó el método de pegilación directa que consiste en incubar extractos proteicos con PEG-Maleimida (PEG-M) de 5kDa de peso molecular. En este ensayo, las cisteínas no S-aciladas reaccionan con el agente pegilante y esto puede ser evidenciado como una disminución en la migración electroforética, debido a un incremento de 5 KDa por cisteína no acilada, en el peso molecular de la proteína. Syn6 contiene solo una cisteína en su secuencia que está S-acilada en células neuronales [79] y nuestros estudios indican que también está S-acilada en la línea celular utilizada para este experimento. Syn1A posee tres cisteínas, dos de ellas en el borde transmembrana y una más alejada en el dominio citoplasmático. Se sabe que Syn1A está S-acilada en células neuronales pero no se ha descrito las cisteínas que estarían modificadas.

En las condiciones de sobreexpresión utilizadas para el ensayo de pegilación, es probable que la maquinaria de palmitoilación endógena esté sobrepasada y una población de las SNAREs permanezca no modificada. Esta situación debería ser compensada con la sobreexpresión de la PAT capaz de modificarlas pero no con la expresión de una PAT que no las reconozca como sustratos.

A fin de establecer si DHHC4 afecta el estado de S-acilación de estas SNAREs, se llevó a cabo el ensayo de pegilación directa utilizando extractos proteicos provenientes de células HEK293F, co-transfectadas con vectores que expresan Syn6-HA o Syn1A-HA y las PATs DHHC4, DHHC6 o un vector vacío (control). Las muestras proteicas fueron analizadas mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico contra el epítipo HA. Las PATs utilizadas en este ensayo se encuentran fusionadas a la proteína mCherry en su extremo N-terminal, pero no fueron reveladas ya que, debido a la gran cantidad de cisteínas presentes en estas proteínas el patrón de

pegilación y agregación de las mismas resulta muy complejo y dificulta, en gran parte, su ingreso al gel de poliacrilamida. Su expresión en cada condición fue identificada mediante microscopía de fluorescencia antes de llevar a cabo la pegilación directa (no mostrado).

Para el caso de Syn1A, la figura 25 A muestra que la incubación con PEG-M provoca un cambio en la migración de aproximadamente 15kDa, lo que sugiere que la gran mayoría de la proteína no está S-acilada en esta línea celular. Adicionalmente, la sobreexpresión de DHHC4 y DHHC6 parecen no afectar el estado de S-acilación de la misma.

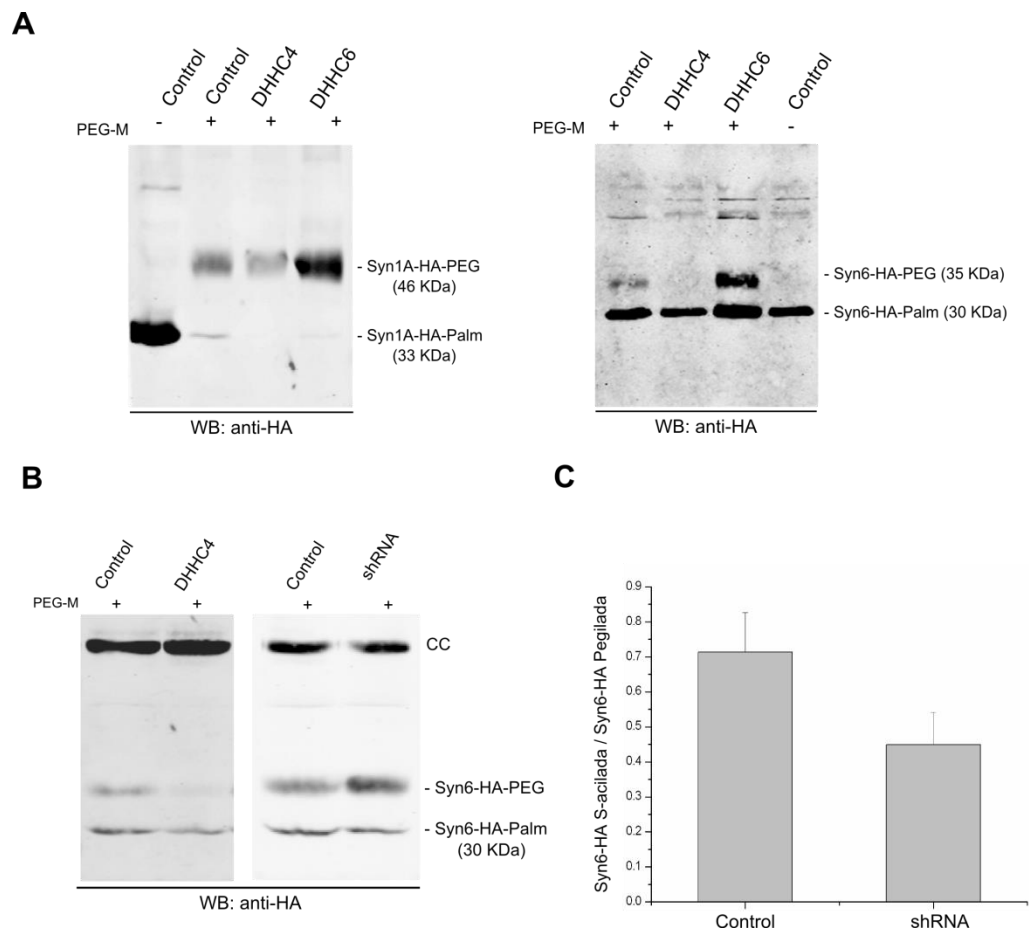


Figura 25. Ensayo de Pegilación directa de las SNAREs transmembrana Syn6-HA y Syn1A-HA. A. Extractos proteicos de células HEK293F, co-transfectadas con vectores que expresan las SNAREs y las PATs indicadas, fueron sometidos al ensayo de pegilación directa. La muestra control (vector vacío) fue incubada en ausencia (-) y presencia (+) de PEG-M como control del ensayo. Syn1A y Syn6 están fusionadas a un epítipo de HA en su extremo C-terminal, mientras que las PATs están fusionadas a la proteína mCherry en su extremo N-terminal. Las muestras proteicas fueron analizadas mediante Western blot, utilizando un anticuerpo específico contra el epítipo HA. Syn-HA-PEG corresponde a la fracción de proteína no S-acilada, mientras que Syn-HA-Palm corresponde a la población de proteína S-acilada o palmitoilada. **B.** Ensayo de pegilación directa llevado a cabo con extractos proteicos de células HEK293F que fueron co-transfectadas con vectores que expresan Syn6-HA y Cherry-DHHC4, un shRNA específico contra DHHC4 o con un vector vacío (control). El ensayo fue revelado mediante Western blot utilizando un anticuerpo específico contra HA. Para el control de carga (CC) se reveló con un anticuerpo específico anti-Calnexina humana. **C.** Relación entre la cantidad de proteína S-acilada y no S-acilada (pegilada) en

la condición control y en presencia del shRNA. Se llevó a cabo una cuantificación de la intensidad de las bandas en los Western blot de tres experimentos independientes, utilizando los programas ImageJ y OriginPro8. La relación entre las fracciones S-acilado/Pegilado es de $0,71 \pm 0,11$ para la condición control y de $0,449 \pm 0,09$ para la condición incubada en presencia del shRNA.

Para el caso de Syn6 una población de la SNARE permanece S-acilada, mientras que otra población que permanece de-acilada, reacciona con el PEG-M en la condición control (Figura 25 A, panel derecho). La sobreexpresión de DHHC4 elimina la fracción no S-acilada de Syn6, ya que solo se observa una población que no reacciona con el PEG-M, a diferencia de lo observado cuando se sobreexpresa DHHC6. Esto indica que en presencia de DHHC4 el total de Syn6 está S-acilada y, por lo tanto, esta PAT estaría catalizando la modificación de la SNARE. Notablemente, los niveles de Syn6 detectados cuando se expresa junto con DHHC4 son inferiores a los detectados en la condición control o en la condición en la que se expresa DHHC6, indicando que la sobreexpresión de DHHC4 y el aumento en la población S-acilada, se correlaciona con la disminución en los niveles totales de la SNARE.

Por otra parte, se evaluó la situación contraria disminuyendo los niveles de DHHC4 con la expresión de un shRNA (Figura 25 B) y se estudió solo la S-acilación de Syn6 en estas condiciones, ya que Syn1A parece no estar modificada en esta línea celular. En este caso, se realizó una co-transfección del plásmido que sobreexpresa a Syn6-HA y del vector conteniendo la secuencia del shRNA. Cinco días post-transfección se procesaron las muestras de acuerdo al protocolo de pegilación directa de proteínas. La Figura 25 B muestra un incremento en la fracción no S-acilada con respecto a la S-acilada cuando las células son incubadas en presencia del vector que expresa al shRNA. Consistente con la disminución de Syn6 en presencia de DHHC4, en presencia del silenciador se observa un incremento en los niveles totales de esta SNARE.

3. Discusión

En los últimos años, la información con respecto a las consecuencias funcionales de la S-acilación en el mantenimiento de la fisiología celular, han focalizado la atención de numerosos grupos de investigación en las PATs como blancos de drogas para tratamientos contra procesos patológicos. Sin embargo, la información respecto a la S-acilación de muchos sustratos involucrados en procesos de relevancia fisiológica, como la transducción de señales y la transmisión sináptica, es escasa.

En esta sección del trabajo de tesis nos interesamos en la identificación de la PAT de SNAREs transmembrana, específicamente de los miembros de la familia de Sintaxinas.

La S-acilación de SNAREs transmembrana en *S. cerevisiae* está catalizada por una única enzima, Swf1, que además es altamente específica [112]. Esta modificación ocurre sobre residuos de cisteínas ubicados en el borde del dominio transmembrana o incluso adentro del mismo. Esta localización, característica en los sustratos de Swf1, está también presente en

numerosas proteínas transmembrana de mamíferos, incluyendo las SNAREs transmembrana. La identificación del ortólogo de Swf1 en mamíferos aún no ha sido reportada pero es posible que exista más de una enzima involucrada en este proceso. Se sabe que algunos sustratos son reconocidos por más de una PAT y que una misma PAT es capaz de modificar a más de un sustrato. Esto último es comprensible debido a la gran cantidad de proteínas S-aciladas que supera ampliamente a la cantidad de Palmitoiltransferasas presentes en las células. El hecho de que un sustrato sea reconocido por más de una PAT puede ser útil si la expresión de éstas no es ubicua como se ha reportado para muchas de ellas [160].

Con respecto a las Sintaxinas poco se sabe acerca de su S-acilación pero se ha postulado que Sintaxina 7 y Sintaxina 8 estarían modificadas por enzimas diferentes. Nuestros resultados sugieren que esto ocurre también para otros miembros de la familia, ya que Sintaxina 1A parece no ser reconocida por DHHC4 mientras que Sintaxina 6 sería modificada por esta enzima. A pesar de trabajar en condiciones de sobreexpresión, la modificación de Syn6 por parte de DHHC4 parece ser un evento específico ya que la sobreexpresión de DHHC6, otra PAT de retículo endoplásmico que modifica cisteínas con una localización similar a la descrita [134], no afecta el estado de S-acilación de la SNARE. Otro resultado que apoya a nuestra hipótesis es la disminución de la fracción S-acilada de Syn6 en presencia del shRNA contra DHHC4, aunque es interesante que en estas condiciones quede un remanente de Syn6 S-acilada. Esto podría deberse a que la actividad de DHHC4 no fue completamente silenciada en las condiciones ensayadas o a que otra PAT es también capaz de modificar a esta SNARE.

Por otra parte, es notable que la sobreexpresión de DHHC4 provoque, además de la desaparición de la fracción no S-acilada, una disminución de los niveles totales de Syn6. Esto podría reflejar disminución de la fracción S-acilada mediante algún mecanismo que incremente la velocidad de degradación de la SNARE modificada. Esto sería muy interesante ya que hasta el momento la S-acilación solo ha sido relacionada a un incremento en la estabilidad de proteínas transmembrana y no a su disminución [77, 130]. Alternativamente, DHHC4 podría disminuir los niveles de Syn6 por un mecanismo indirecto y esto se vería reflejado en una disminución de la fracción no S-acilada, simplemente porque los niveles remanentes de la SNARE no sobrepasan la maquinaria de S-acilación endógena.

La presencia de veintitrés PATs en mamíferos, a diferencia de las siete expresadas en levaduras, sugiere que la cantidad de proteínas S-aciladas requiere de una maquinaria de S-acilación más extensa. Posiblemente más de una enzima sea necesaria para la modificación de la familia de SNAREs y proteínas transmembrana tipo II en general.

CAPÍTULO II: ESTUDIOS DE LA ESPECIFICIDAD EN LA S-ACILACIÓN DE PROTEÍNAS TRANSMEMBRANA EN *Saccharomyces cerevisiae*

1. Introducción

La identificación de las primeras palmitoiltransferasas en *S. cerevisiae* impulsó la búsqueda de nuevos miembros de la familia y de sus sustratos en este organismo y en eucariotas superiores. Cepas mutantes de esta levadura con deleciones en cada uno de los genes que codifican para las PATs, permitieron identificar los pares enzima-sustratos que hoy conocemos [78]. Por otra parte, estudios globales de sobreexpresión de las PATs contribuyeron a esta caracterización en mamíferos [113]. Las proteínas palmitoiladas superan a las palmitoiltransferasas presentes en los organismos, lo que llevó a postular que éstas serían capaces de reconocer a más de un sustrato con características similares (Revisado en [94]). Los primeros estudios de las PATs de *S. cerevisiae* apoyan esta hipótesis, ya que cada una reconocería varios sustratos con características estructurales o topológicas similares:

- Erf2/Ef4 fue identificada como la PAT de Ras, una proteína soluble que está farnesilada en su extremo C-terminal, cerca de la cisteína S-acilada
- Akr1 modifica a Yck1 y Yck2, dos proteínas solubles que son doblemente S-aciladas en su extremo C-terminal
- Pfa3 cataliza la S-acilación de Vac8, una proteína soluble que está N-miristoilada en su extremo N-terminal
- Pfa4 sería la responsable de la S-acilación de la sintetasa 3 de quitina (Chs3) y de las permeasas de aminoácidos, todas ellas proteínas con múltiples pasos transmembrana
- Swf1 cataliza la S-acilación de SNAREs transmembrana y dos manosiltransferasas, todas ellas proteínas transmembrana tipo II

Por otra parte, estudios en células de mamíferos revelaron que la S-acilación de algunas proteínas, como PSD-95 y SNAP-25, está catalizada por un grupo reducido de las Palmitoiltransferasas de mamíferos, lo que llevó a postular que estas enzimas tendrían cierta especificidad por los sustratos que modifican [113].

Debido a que mutaciones en el motivo DHHC generan pérdida de la función e inhibición de la autoacilación de las PATs, se postuló que este dominio altamente conservado sería el sitio catalítico de las enzimas; mientras que su especificidad podría estar codificada en las regiones N- y C- terminales [94, 97].

En el año 2009 la hipótesis de una especificidad diferencial entre las PATs comenzó a ser cuestionada. Utilizando como modelo a la levadura *S. cerevisiae*, Hou y colaboradores mostraron que las PATs Erf2, Pfa3, Pfa4, Pfa5 y Akr1 son capaces de modificar a sustratos no

canónicos cuando están sobreexpresadas y que tendrían una especificidad solapada, ya que reconocerían los mismos sustratos [178]. Estos autores muestran que la sobreexpresión de las PATs en levaduras, a excepción de Swf1 que no fue reportada, es capaz de suprimir fenotipos causados por la deficiencia de otras. Por ejemplo, en una cepa *pfa3Δ*, en la que el gen PFA3 fue deletado y por lo tanto no se expresa la enzima, presenta un fenotipo de vacuolas fragmentadas en condiciones de estrés y niveles reducidos de Vac8 S-acilada. Esto es suprimido por la sobreexpresión de otras PATs. Resultados similares fueron reportados para los sustratos Yck2 y Ras en cepas *akr1Δ* y *erf2Δ* respectivamente, en las que sobreexpresaron otras PATs [178]. Al poco tiempo, Rocks y colaboradores postularon que la maquinaria de S-acilación en células de mamíferos se encontraría exclusivamente en el complejo de Golgi y carecería totalmente de especificidad. Los autores utilizaron una serie de péptidos sintéticos sin ningún tipo de secuencia consenso y observaron que la S-acilación de los mismos ocurría solo en esta organela [146].

La particularidad de estos dos trabajos reside en que ambos estudian la modificación de sustratos periféricos de membrana. En este contexto, las observaciones de nuestro laboratorio con respecto a la S-acilación de proteínas transmembrana, mediadas por Swf1 y Pfa4, eran contrastantes. A diferencia de lo reportado para Erf2, Akr1 y Pfa3, la función de Swf1 no puede ser llevada a cabo por otras PATs. Una cepa *swf1Δ* que carece de esta enzima presenta un fenotipo de falta de crecimiento en medios que contienen lactato como única fuente de carbono o en medios con altas concentraciones de sal (0,85M NaCl). Las bases moleculares de este fenotipo no se conocen pero se ha visto siempre relacionado a la falta de S-acilación de las SNAREs sustratos de Swf1. Gonzalez-Montoro mostró que la sobreexpresión de otras PATs, incluso de Pfa4, no restablece el fenotipo salvaje de la cepa ni tampoco la S-acilación de Tlg1 [112].

2. La función de Pfa4 no puede ser reemplazada por otras PATs.

A fin de establecer si este comportamiento es característico de Swf1 o de la S-acilación de proteínas transmembrana en general, decidimos evaluar la capacidad de otras PATs de restablecer el fenotipo salvaje en ausencia de Pfa4. Una cepa *pfa4Δ* presenta un fenotipo de resistencia al colorante tóxico blanco de calcoflúor, directamente relacionado a la falta de S-acilación de su sustrato, Chs3. En ausencia de Pfa4, Chs3 queda retenida en el retículo endoplásmico y no puede catalizar la síntesis de quitina, de modo que el colorante no ejerce su efecto tóxico, ya que necesita de este polisacárido para unirse a las células [111]. De esta manera, una cepa salvaje es incapaz de crecer en presencia del blanco de calcoflúor mientras que una cepa *pfa4Δ* crece normalmente en esta condición.

Mediante ensayos de crecimiento en medio sólido conteniendo blanco de calcoflúor, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de las PATs en cepas *pfa4Δ* transformadas con vectores que

sobreexpresan a Pfa4, Swf1, Pfa3 y Erf2, rotuladas con el dominio de unión a IgG de la Proteína A (PA) y bajo en control del promotor GAL1 o transformadas con un vector vacío como control (EV). La expresión de las PATs bajo el promotor GAL1 requiere de la presencia de galactosa, de modo que el ensayo con el blanco de calcoflúor se llevó a cabo utilizando galactosa como fuente carbono (YPGal).

En este ensayo todas las cepas crecen en medios ricos conteniendo glucosa (YPD) o galactosa (YPGal) como fuente de carbono. En presencia del colorante, la cepa *pfa4Δ* transformada con el vector vacío es capaz de crecer normalmente, no así la cepa salvaje y la cepa *pfa4Δ* complementada con Pfa4 (Figura 26 A). La sobreexpresión de otras PATs no restablece el fenotipo salvaje, indicando que la función de Pfa4 es específica y no puede ser llevada a cabo por otros miembros de la familia.

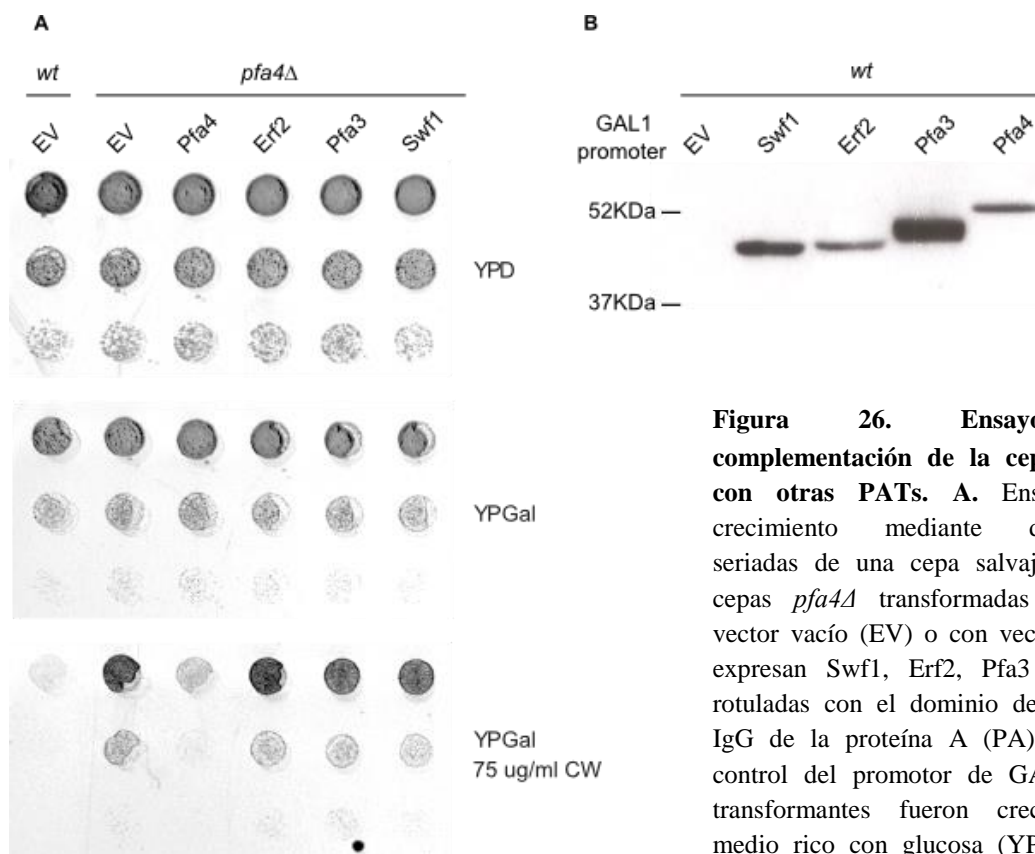


Figura 26. Ensayo de complementación de la cepa *pfa4Δ* con otras PATs. A. Ensayos de crecimiento mediante diluciones seriadas de una cepa salvaje (*wt*) o cepas *pfa4Δ* transformadas con un vector vacío (EV) o con vectores que expresan Swf1, Erf2, Pfa3 o Pfa4, rotuladas con el dominio de unión a IgG de la proteína A (PA), bajo el control del promotor de GAL1. Las transformantes fueron crecidas en medio rico con glucosa (YPD, panel

galactosa como fuente de carbono (YPGal, panel medio) o en medio rico suplementado con 75 µg/mL de blanco de calcoflúor (YPGal CW, panel inferior). B. Análisis por Western blot de los niveles de expresión de las distintas PATs bajo el control del promotor GAL1. Las proteínas se encuentran rotuladas en el extremo C-terminal con el dominio de unión a IgG de la proteína A (PA).

3. La mutación de posiciones determinantes de especificidad (PDEs) en el dominio DHHC genera falta de función en Swf1.

La identificación de regiones que pudieran estar implicadas en la especificidad de las PATs mediante comparación de secuencia es muy difícil, ya que esta familia presenta muy poca homología fuera de los dominios conservados, incluso entre ortólogos ya descriptos.

Estudios bioinformáticos llevados a cabo en nuestro laboratorio permitieron la identificación de posiciones determinantes de especificidad, utilizando un método alternativo a la comparación de secuencias [112]. El método se basa en que dentro de una familia de proteínas que reconocen sustratos diferentes, como las PATs, las diferencias en la especificidad pueden estar codificadas en residuos de aminoácidos particulares que se encuentran altamente conservados dentro de los miembros de un grupo pero no en los miembros de otro grupo [179]. Por ejemplo, se esperaría que Swf1 y todos sus ortólogos tuvieran residuos conservados en determinadas posiciones de la proteína, mientras que Pfa4 y todos sus ortólogos tuvieran otros residuos conservados en esas posiciones, pero diferentes a los del grupo de Swf1 (Figura 27). Estas posiciones se denominan posiciones determinantes de especificidad (PDEs) y son aminoácidos involucrados en cualquier proceso que permita el reconocimiento de los sustratos *in vivo*, desde interacciones proteína-proteínas hasta la determinación de la localización subcelular que permita el encuentro enzima-sustrato.

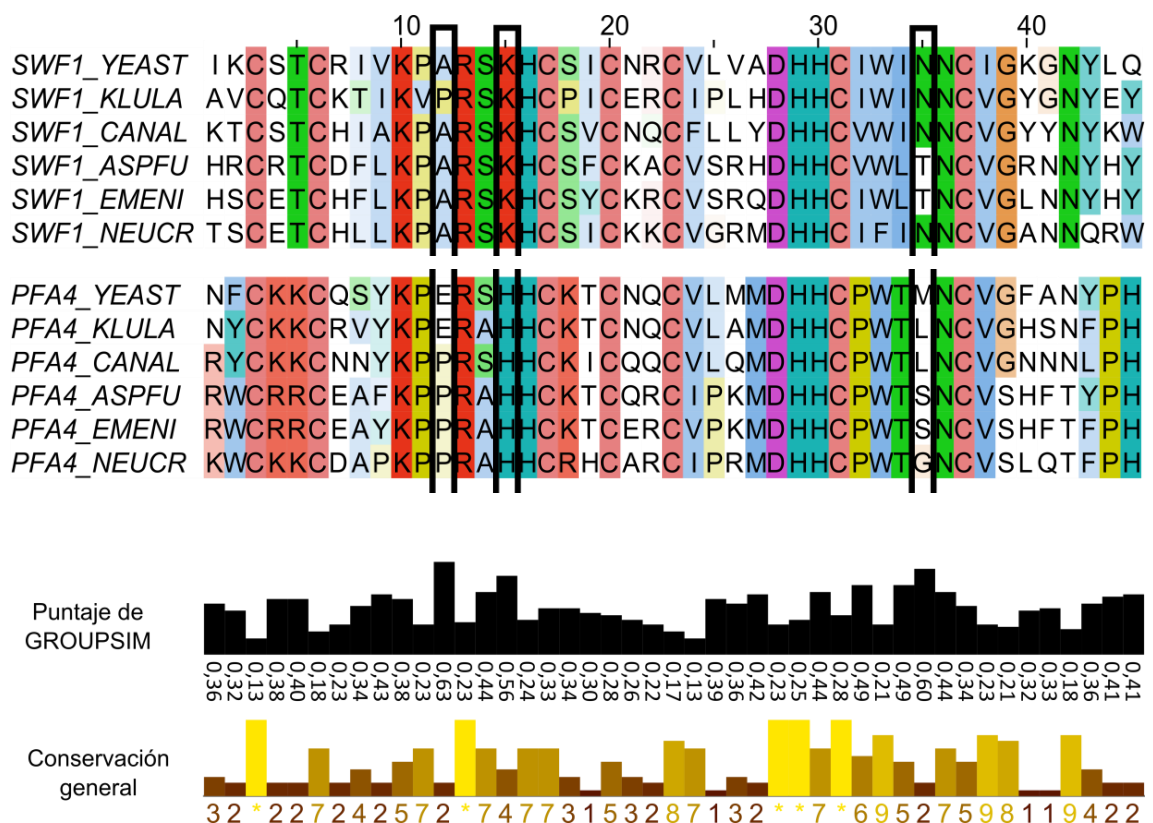


Figura 27. Alineamiento de los dominios DHHC de las S-amiltransferasas Swf1 y Pfa4 de hongos,

junto con la conservación de cada columna y el puntaje obtenido en el programa GROUPSIM. Las tres posiciones determinantes de especificidad con mayor puntaje determinado por GROUPSIM están remarcadas. Los residuos se encuentran coloreados según la conservación dentro de los grupos de ortólogos. En la parte inferior se muestran los puntajes determinados por GROUPSIM y la conservación general

A fin de corroborar si la especificidad está codificada en las posiciones identificadas en el análisis, se llevaron a cabo mutaciones de las tres posiciones con mayor puntuación indicadas por el programa bioinformático, para la PAT Swf1. Estas posiciones corresponden a los aminoácidos A145, K148 y N168 y se encuentran localizadas en el dominio DHHC, lo que resulta interesante debido a la elevada conservación que presenta este dominio (Figura 27). Las mutaciones se realizaron reemplazando a estos residuos por los aminoácidos correspondientes a las mismas posiciones en el dominio DHHC de Pfa4:

- La alanina en la posición 145 fue mutada por ácido glutámico, A145E
- La lisina en la posición 148 fue mutada por histidina, K148H
- La asparagina en la posición 168 fue mutada por metionina, N168M

La actividad de estas mutantes se evaluó mediante ensayos de crecimiento de la cepa *swf1Δ*, transformada con vectores que expresan cada mutante, bajo el control del promotor endógeno de Swf1. La mutante A145E no es capaz de suprimir el fenotipo de falta de crecimiento en medio con alta concentración de sal. La mutación K148H provoca un pequeño defecto en el crecimiento en esta condición, mientras que la mutación N168M no genera ningún efecto sobre el crecimiento en este medio (Figura 28 A).

La detección de Swf1 salvaje y de las mutantes, expresadas a niveles endógenos, es dificultosa debido a que es una proteína muy poco abundante. A fin de evaluar la estabilidad de las mutantes se repitió el ensayo bajo el control de promotor de TPI1 (Figura 28 B). Aún en condiciones de sobreexpresión, la mutante A145E es incapaz de suprimir el fenotipo de falta de crecimiento en medios con alta concentración de sal, lo que sugiere que este aminoácido es fundamental para la actividad de Swf1. La mutante K148H sobreexpresada es capaz de suprimir totalmente el fenotipo de falta de crecimiento, sin embargo, la triple mutante incluida en este ensayo presenta un fenotipo de falta de crecimiento más fuerte que la mutante A145E, sugiriendo que las mutaciones K148H y N168M podrían generar un efecto aditivo (Figura 28 B).

El análisis de la estabilidad de las mutantes mediante Western blot revela que la mutante A145E y la triple mutante se expresan mucho menos que Swf1 salvaje. No obstante, estos niveles son superiores a los niveles de Swf1 endógena, que no se detecta en la cepa salvaje transformada con un vector vacío (Figura 28 C).

Estos experimentos confirman que la predicción de PDE puede identificar residuos funcionalmente importantes que probablemente se encuentren involucrados en la determinación de especificidad.

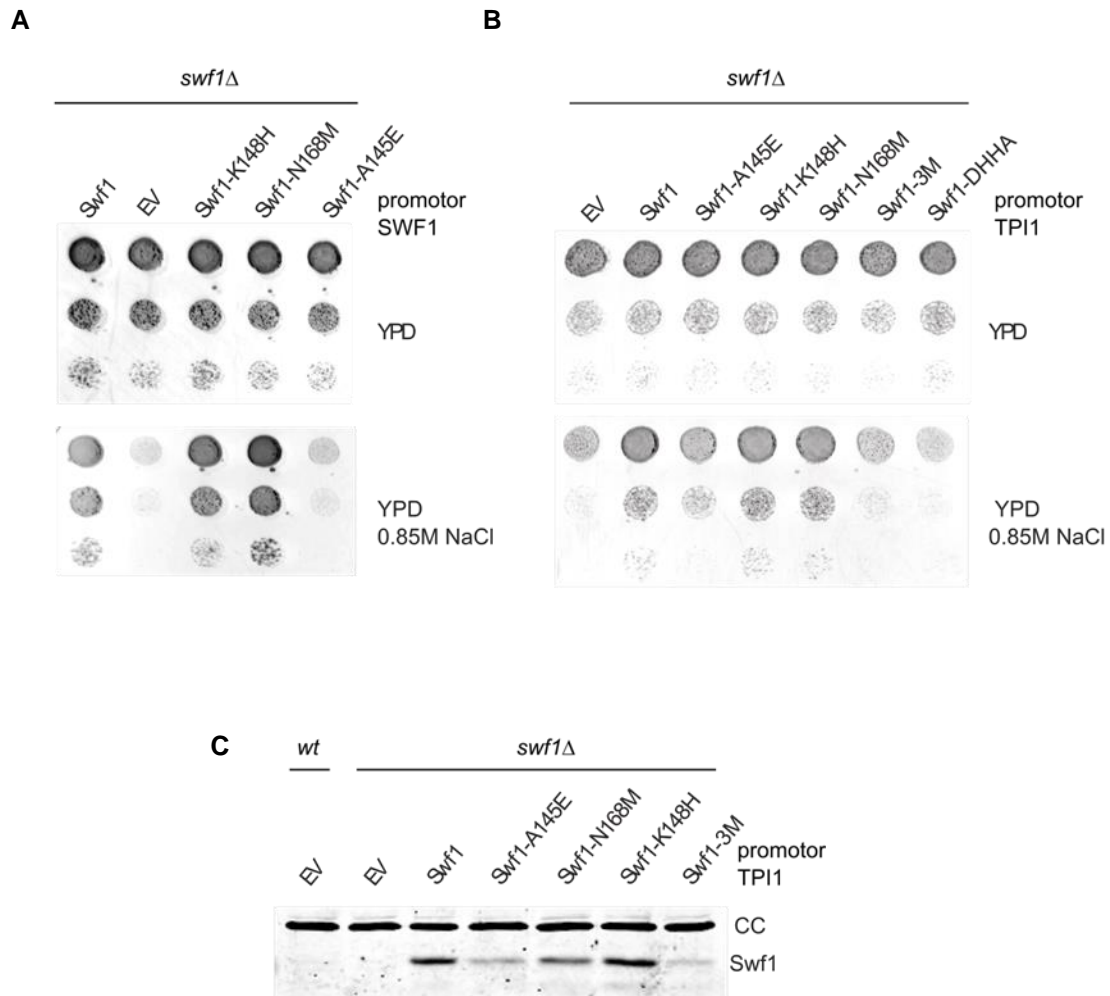


Figura 28. Mutación de las tres PDEs de mayor puntaje en Swf1 por los residuos correspondientes a Pfa4. A. Ensayos de crecimiento de la cepa *swf1Δ* transformada con un vector vacío (EV), con vectores que expresan a Swf1 salvaje o a las versiones mutadas en las PDEs de mayor puntaje por los residuos presentes en Pfa4 en esas posiciones, bajo el control del promotor endógeno de SWF1. Las transformantes fueron crecidas en medio sólido rico con glucosa (YPD, panel superior) o en este mismo medio suplementado con 0.85M NaCl (YPD 0.85 M NaCl, panel inferior). **B.** Ensayos de crecimiento de la cepa *swf1Δ* transformada con un vector vacío (EV), con vectores que expresan a Swf1 salvaje o a las versiones mutadas en las PDEs indicadas, bajo el control del promotor de TPI1. **C.** Análisis por Western blot de los niveles de expresión de las mutantes de Swf1 en las PDEs, bajo el control del promotor de TPI1, en una cepa *swf1Δ*. Revelado con un anticuerpo policlonal contra el dominio C-terminal de Swf1. Swf1 endógena no se detecta bajo estas condiciones en la cepa salvaje (*wt* + EV). Una banda no específica detectada por el anticuerpo se muestra como control de carga (CC).

4. Discusión

Los primeros estudios focalizados en la especificidad de las PATs, utilizando sustratos solubles, postularon que la maquinaria de S-acilación celular sería inespecífica y ocurriría en el complejo de Golgi [146, 178]. Esto resulta interesante ya que la S-acilación de sustratos transmembrana en levadura parece ocurrir en el retículo endoplásmico [111, 155]. Otra observación contrastante

es que en la cepa mutante *swf1Δ*, las SNAREs sustratos de Swf1 se mueven a través del complejo de Golgi y llegan a su destino sin ser S-aciladas, indicando que no son reconocidas por la maquinaria de S-acilación localizada en esta organela.

Estudios realizados en nuestro laboratorio indican que la S-acilación de sustratos transmembrana catalizada por Swf1 es específica, ya que no puede ser reemplazada por otros miembros de la familia.

Este trabajo de tesis contribuyó con el estudio de la especificidad de Pfa4, otra PAT involucrada en la S-acilación de proteínas transmembrana pero con múltiples pasos transmembrana. En este caso, pudimos demostrar que otros miembros de la familia son incapaces de complementar el fenotipo de falta de función en una cepa *pfa4Δ*, indicando que su función no puede ser reemplazada por otras PATs aún cuando están sobreexpresadas. Estos resultados son consistentes con los reportados por Roth y colaboradores en los que, mediante un estudio del palmitoil-proteoma, observan que en una cepa *pfa4Δ*, las permeasas de aminoácidos permanecen no S-aciladas [78]. Nuestros resultados indican que Swf1 es incapaz de reconocer sustratos distintos a los propios, ya que no complementa el fenotipo de la cepa *pfa4Δ*, a diferencia de lo reportado para otras palmitoiltransferasas. Adicionalmente, otros ensayos realizados en nuestro laboratorio, en las condiciones utilizadas en el trabajo de Hou y colaboradores, revelan que Swf1 tampoco reconocería el sustrato soluble de Pfa3, Vac8 [112]. De igual manera, Pfa4 no puede suprimir el fenotipo de falta de crecimiento de una cepa *swf1Δ*, incluso cuando está sobreexpresada pero Hou y colaboradores muestran que sí podría reconocer sustratos periféricos de membrana como Vac8, Yck2 y Ras, sugiriendo que sería más promiscua que Swf1.

Los resultados obtenidos nos permiten postular que la S-acilación de proteínas transmembrana en *S. cerevisiae* requiere de PATs exclusivas. La actividad de Swf1 es altamente específica, a diferencia de lo reportado para otros miembros de la familia, no solo porque es incapaz de reconocer sustratos distintos a los propios, ya sean solubles o transmembrana, sino que además la S-acilación de sus sustratos depende exclusivamente de esta PAT. Esto quizás se deba a la localización características de las cisteínas ubicadas en el borde transmembrana, a las que posiblemente solo Swf1 pueda acceder. Debido a que esta PAT sería la única con actividad altamente específica en *S. cerevisiae*, resulta interesante como modelo para estudiar en donde está codificada la especificidad y extenderlo a otros miembros de la familia DHHC, ya que numerosos estudios revelan la importancia de PATs individuales para el normal funcionamiento celular e incluso sistémico, que difícilmente serían explicados por un modelo de S-acilación inespecífica. Un trabajo posterior a la publicación de nuestros resultados intenta describir la especificidad de los miembros de la familia DHHC de levaduras y de humanos evaluando su capacidad de modificar a sustratos modelos. Los autores encontraron que el sustrato periférico Gpa2 es S-acilado por dieciséis PATs humanas y cuatro de levaduras (Erf2, Pfa3, Pfa5 y Akr1), mientras que el sustrato Sso1, una SNARE transmembrana, solo fue modificado por Swf1 y Pfa3 y muy levemente por dos PATs humanas, DHHC2 y DHHC20. Agp1, una proteína con múltiples pasos transmembrana, solo fue modificada eficientemente por Pfa4 [180]. Estos

resultados apoyan nuestro hallazgo de que la S-acilación de proteínas transmembrana es mucho más específica que la modificación de proteínas periféricas.

Finalmente, ensayos *in silico* realizados en nuestro laboratorio permitieron identificar posiciones dentro de la familia de las PATs que podrían ser relevantes para la especificidad. Para validar esta predicción utilizamos a Swf1 como modelo y generamos tres mutaciones en las posiciones con mayor puntuación predichas por el programa bioinformático GROUPSIM. Las mutaciones A145E y K148H provocaron pérdida total y parcial de la función de Swf1, respectivamente. Es destacable que las mutaciones no fueran realizadas al azar sino que se intercambiaron por los residuos de Pfa4 presentes en esas mismas posiciones y, a pesar de estar en un contexto de alta conservación de secuencia, provocaron pérdida de función. Estos resultados además apoyan la predicción bioinformática de estas posiciones como determinantes de especificidad.

Sería interesante que estas mutaciones en Swf1 fueran capaces de conferirle una especificidad distinta, es decir, la capacidad de modificar a los sustratos de Pfa4, de modo que se intentó complementar una cepa *pfa4Δ* con las mutantes individuales de las PDEs de Swf1, como así también con una triple mutante (no mostrado). En ningún caso se logró restablecer el fenotipo salvaje, lo que es comprensible teniendo en cuenta que posiblemente otros PDEs además de los mutados, sean necesarios.

Estos resultados contribuyen a un trabajo en el que también se estudiaron los requerimientos topológicos y estructurales que estarían implicados en el reconocimiento por parte de las PATs [112], utilizando como modelo a Tlg1, la SNARE endosomal sustrato de Swf1. Esta SNARE posee dos cisteínas localizadas en el borde citoplasmático adyacente al dominio transmembrana. Estos estudios revelaron que alejando las cisteínas del borde transmembrana se pierde el reconocimiento por parte de Swf1. Un alejamiento de las cisteínas cinco posiciones del dominio transmembrana no impide la S-acilación pero en este caso, la modificación no está catalizada por Swf1, a pesar de que el contexto de la secuencia de las cisteínas es muy similar a las de la proteína salvaje; mientras que un alejamiento de las cisteínas a diez posiciones del dominio transmembrana provoca pérdida del reconocimiento por parte de cualquier PAT de *S. cerevisiae*. No podemos descartar que esta mutante sea modificada y que el efecto observado sea producto de una de-acilación rápida pero otros estudios en células de mamíferos apoyan estos hallazgos [181].

Nuestros resultados nos permiten postular que, como es de esperarse para una reacción altamente específica, existen requerimientos estructurales para el reconocimiento de los sustratos por parte de Swf1 y esta característica podría ser compartida por otros miembros aun no identificados en otros organismos.

Los resultados presentados en este capítulo forman parte de la siguiente publicación:

“Specificity of transmembrane protein palmitoylation in yeast”

González Montoro A., Chumpen Ramirez S., Quiroga R., Valdez Taubas J.

PLoSOne. 2011. 24; 6(2):e16969.

CONCLUSIONES

Los gangliósidos han sido involucrados en numerosos procesos relevantes a nivel del sistema nervioso central y en procesos patológicos como el síndrome de Guillán-Barré, motivo por el cual las enzimas que participan en su biosíntesis han sido y continúan siendo intensamente estudiadas. Numerosos trabajos han contribuido al entendimiento de la regulación en la síntesis de gangliósidos durante el desarrollo y en los procesos de diferenciación celular, apuntando principalmente a un mecanismo de control a nivel transcripcional. También se ha postulado que existiría una regulación post-traducciona de la actividad de algunas glicosiltransferasas mediante fosforilación/de-fosforilación, pero el mecanismo mediante el cual ocurriría no ha sido estudiado. Trabajos más recientes confirman la presencia de glicosiltransferasas en la membrana plasmática, lo que implica la existencia de un mecanismo de control en la composición de gangliósidos a nivel local. La regulación de esta localización ectópica se desconoce pero claramente existen otros mecanismos de regulación post-traduccionales capaces de influenciar la síntesis de gangliósidos y, por lo tanto, regular procesos de importancia tanto fisiológica como patológica.

Respecto a esto nos interesamos en el estudio de la S-acilación de las glicosiltransferasas, particularmente aquellas involucradas en la síntesis de gangliósidos pero creemos que nuestros resultados se extienden a toda la familia. Mediante ensayos *in silico* mostramos la presencia de cisteínas conservadas presentes en el dominio N-terminal de estas enzimas con una localización similar a la de cisteínas S-aciladas en SNAREs transmembrana [79, 80]. Nuestros resultados indican que estas cisteínas presentes en glicosiltransferasas de gangliósidos, son S-aciladas en células de mamíferos lo que nos permite postular a la S-acilación como una modificación post-traducciona novedosa en esta familia de proteínas.

La S-acilación de proteínas ha adquirido notable relevancia en los últimos años por verse involucrada en la regulación de numerosos procesos celulares. Más de un 10% de las proteínas expresadas en eucariotas superiores se encuentran S-aciladas y las consecuencias funcionales de esta modificación podrían determinar el desarrollo de procesos patológicos como enfermedades neuronales o cáncer.

Para el caso de proteínas transmembrana tipo II, la información respecto al rol de la S-acilación es muy escasa. En levaduras solo para Tlg1 se ha identificado la función de esta modificación y el mecanismo mediante el cual operaría pero la importancia de la S-acilación en otros sustratos se ve reflejada globalmente en los fenotipos mutantes de una cepa *swf1Δ*. Posiblemente, el rol de la S-acilación en las glicosiltransferasas de mamíferos sea evidenciado en mecanismos generales más que en consecuencias puntuales en estas enzimas.

Resultados preliminares sugieren que DHHC4 podría ser el ortólogo de Swf1, ya que en principio tendría actividad sobre la SNARE Tlg1 y, por lo tanto, sería capaz de reconocer cisteínas con la localización característica de las proteínas transmembrana tipo II S-aciladas. No descartamos la posibilidad de que otras PATs pudieran estar involucradas en este proceso, ya que se ha reportado cierta redundancia para varios miembros de esta familia.

Los ensayos de pegilación directa de Sintaxina 6 sugieren que DHHC4 está involucrada en su modificación e incluso, que la S-acilación de esta SNARE podría estar relacionada a su estabilidad. En contraste a este resultado DHHC4 parece no afectar el estado de S-acilación de Sintaxina 1A, sugiriendo que las SNAREs transmembrana no son modificadas por una única PAT como ocurre en levaduras. Este resultado es consistente con las observaciones de He y colaboradores [80] en las que postulan una S-acilación diferencial entre Sintaxina 7, que sería S-acilada en compartimentos distales del complejo de Golgi, y Sintaxina 8, que sería modificada en el retículo endoplásmico. Nuestros estudios sugieren que DHHC4 afecta el estado de S-acilación de Sintaxina 6 y a juzgar por el estudio mencionado anteriormente posiblemente también afecte la S-acilación de Sintaxina 8.

La importancia en la identificación de pares enzima-sustrato radica en la implicancia de algunas PATs en procesos patológicos como el cáncer. Esto las ha convertido en blancos interesantes para la búsqueda de drogas que puedan actuar como agentes terapéuticos. No obstante, es fundamental encontrar agentes específicos, ya que muchas otras patologías, como el retardo mental y la esquizofrenia, serían consecuencia de la ausencia de PATs puntuales.

Por otra parte, resultados de este trabajo de tesis contribuyeron al estudio de la especificidad de la S-acilación de proteínas transmembrana utilizando como modelo, PATs de la levadura *S. cerevisiae*. Nuestros resultados nos permiten postular que, a diferencia de lo reportado para la S-acilación de sustratos solubles, la modificación de sustratos transmembrana requiere de PATs específicas y que para el caso de Swf1, la localización de las cisteínas sustrato es fundamental para su reconocimiento por parte de esta enzima, como es de esperarse para una reacción catalizada altamente específica.

Este trabajo de tesis contribuye al conocimiento de los procesos que afectan a enzimas cruciales para el funcionamiento celular, como son las glicosiltransferasas y abre las puertas al estudio de mecanismos de regulación que no han sido no explorados hasta el momento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Capítulo I

Líneas celulares utilizadas

En este trabajo se utilizaron las líneas celulares comerciales CHO-K1 (Chinese Hamster Ovary) del consorcio ATCC y HEK239F (Human Embryonic Kidney) de Invitrogen. También se utilizaron el clon3 y el clon36, dos líneas derivadas de las células CHO-K1 que expresan de manera estable a GalNAc-T-myc (clon3) y a Sial-T4-myc (clon36), previamente descritas en [55] y [62], respectivamente.

Plásmidos

Glicosiltransferasas de gangliósidos. Las construcciones de los Ntds de Sial-T1-YFP y Sial-T2-YFP están descritas en [54, 196]. El vector que expresa el Ntd de GalNAc-T salvaje fusionado a Cherry se construyó a partir de un vector que expresa GalNAc-T-YFP, descrito en [54], mediante digestión del Ntd con las enzimas de restricción *XhoI* y *BamHI* y se clonó en los mismos del sitios del vector pmCherry N1 de Clontech. Las mutantes C9A y C17A de GalNAc-T se construyeron mediante amplificación por PCR utilizando como templado el vector GalNAc-T-YFP, el oligo GalNAcT27R como oligonucleótido 3' y los oligos 05 y 06 de GalNAc-T como oligonucleótidos 5', respectivamente. Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *ApaI* y *SalI* y se clonaron en los mismos sitios del vector GalNAc-T-Cherry. La doble mutante C9A/C17A de GalNAc-T se construyó mediante amplificación por PCR utilizando como templado la mutante C17A de GalNAc-T, el oligo GalNAcT27R como oligonucleótido 3' y el oligo 05 de GalNAcT como oligonucleótido 5'. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *ApaI* y *SalI* y se clonó en los mismos sitios del vector GalNAc-T-Cherry. Las construcciones del Ntd Sial-T4-Cherry y de Sial-T4-HA están descritas en [62]. Las mutantes C3A del Ntd y de la versión completa de Sial-T4 se construyeron en colaboración con el grupo del Dr. José Luis Daniotti.

Sintaxinas. Las secuencias de ADN que codifican a Syn6 y Syn1A utilizadas en este trabajo de tesis, están contenidas en los vectores pHA N1 y pHA C1 construidos en el laboratorio del Dr Maccioni. Para la construcción de estos vectores la secuencia del epítoto HA se clonó en lugar de la secuencia de la proteína fluorescente amarilla (YFP) en los vectores de Clontech pEYFP N1 en los sitios *BamHI/NotI* y pEYFP C1 en los sitios *NheI/BglIII*. Para la construcción de HA-Syn6, se amplificó la secuencia de Sintaxina 6 de ratón por PCR, a partir de un vector pET28-Syn6 que fue gentilmente donado por el Dr Reinhard Jahn. Se utilizó el oligo Syn6 01 como oligonucleótido 5' y el oligo Syn6 02 como oligonucleótido 3'. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *HindIII* y *BamHI* y fue clonado en los mismos sitios del vector pHA C1. Para la construcción de HA-Syn8, la secuencia de Sintaxina 8 humana fue amplificada por PCR utilizando los oligos Syn8 01 como oligonucleótido 5' y Syn8 02 como

oligonucleótido 3'. El producto de PCR fue digerido con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI* y fue clonado en los mismos sitios del vector pHA C1.

El vector que expresa a Syn1A-HA fue construido en el laboratorio del Dr Maccioni, utilizando la secuencia de Sintaxina 1A humana contenida el vector pHA N1.

Todas las construcciones se verificaron mediante secuenciación realizadas por la facilidad "DNA Sequencing Facitily" de la Universidad de Chicago de Estados Unidos.

shRNA. Para el silenciamiento de DHHC4 se diseñó un oligonucleótido de doble cadena, contra una región de esta PAT que carece de homología con otros miembros de la familia. El shRNA de secuencia: 5'-gatccccatctctaccaggaaacttatcaagagataagttcctgtagagattttta-3' fue sintetizado por la empresa oligo engine y clonado en el vector pSUPERgfp+neo.

Transfección de Células

La transfección de las líneas celulares se llevó a cabo utilizando PEI (polyethylenimine) a una concentración de 1mg/mL, en una relación 2:1 de μg ADN: μg PEI. Se prepara una mezcla de transfección en DMEM sin antibiótico ni suero (50 μL para una placa de 3,5 cm de diámetro) con el ADN y el PEI y se incuba 15 minutos a temperatura ambiente en esterilidad. Por otra parte, las células a ser transfectadas deben estar aproximadamente a un 80% de densidad en la placa y deben estar en DMEM sin suero y sin antibiótico (800 μL para una placa de 3,5 cm de diámetro) antes de que sea agregada la mezcla de transfección. Una vez agregada la mezcla se incuba por dos horas a 37°C con 5% CO_2 . Finalmente, se cambia el medio de cultivo por DMEM con 10% de suero fetal bovino y se incuba nuevamente a 37°C con 5% CO_2 . Para todos los ensayos la incubación post-transfección fue aproximadamente de 18 horas, excepto para el ensayo de la actividad *in vitro* de Sial-T4, en el que la incubación fue de 72 horas, y para los ensayos de silenciamiento, en los que la incubación con el shRNA fue de cinco días post-transfección.

Ensayo de intercambio del grupo acilo por biotina (ABE)

Para el ensayo del ABE se utilizaron muestras enriquecidas en proteínas de membrana, a partir de placas de 10 cm de diámetro con células CHO-K1 transfectadas con las construcciones indicadas en cada experimento. Las células se lavaron con PBS 1X tres veces, se levantaron en 1mL de PBS 1X y se cosecharon mediante centrifugación 1 minuto a 800 x g. Luego se resuspendieron en 600 μL de buffer de lisis frío (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1mM PMSF, Cocktail inhibidor de proteasas Sigma 1/1800) conteniendo 10mM NEM (N-ethylmaleimida) y se lisaron mediante 30 pulsos a través de una jeringa de tuberculina. Se centrifugó el lisado durante 5 minutos a 800 x g para separar células sin lisar y parte del ADN. El sobrenadante (conteniendo las proteínas) se trasvasó a un tubo limpio y se centrifugó durante 20 minutos a 17000 x g para separar las proteínas solubles de las proteínas de membrana. El

precipitado de cada muestra, conteniendo las proteínas de membranas, se resuspendió en 600 μL buffer de lisis con 10mM NEM y 1,7% de Tritón X-100 y se incubó 1 hora a 4°C con rotación. Posteriormente, se precipitaron las proteínas de la muestra con 1 volumen de metanol y 0,25 volúmenes de cloroformo y se centrifugó 3 minutos a 17000 x g. Las proteínas precipitan en la interfase, la fase superior acuosa se descartó y se agregaron 0,75 volúmenes de metanol con respecto al volumen de muestra proteica inicial (600 μL), se centrifugó nuevamente durante 3 minutos a 17000 x g y se descartó el sobrenadante. Las proteínas precipitadas se dejaron secar a 37°C durante 15 minutos y se resuspendieron en 120 μL de buffer SB (4% SDS, 50mM Tris-HCl pH 7.4 y 1mM EDTA) conteniendo 10mM NEM. Luego se agregaron 480 μL de buffer de lisis conteniendo 1mM NEM y 0,2% Tritón X-100, y se incubó toda la noche a 4°C con rotación. Al día siguiente se precipitaron las proteínas de la muestra tres veces con cloroformo y metanol, de la misma manera detallada anteriormente pero la resuspensión entre cada precipitación se llevó a cabo con buffer SB sin NEM. La última precipitación se resuspendió en 70 μL de buffer SB y se dividió la muestra en dos alícuotas de 30 μL . Una alícuota se incubó con 120 μL de buffer de lisis conteniendo 0,2% Tritón X-100, 1M hidroxilamina (Sigma) pH 7.4 y 1mM HPDP-Biotin (Pierce), mientras que la otra alícuota (control) se incubó con el mismo buffer pero sin hidroxilamina. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con rotación y luego se precipitaron con cloroformo y metanol. Las proteínas precipitadas se resuspendieron en 30 μL de buffer SB y se tomó una alícuota del 10% como control de carga (como es un volumen pequeño se agregan 70 μL de buffer de lisis y se toman 10 μL). Luego se llevó a 1,4 mL de volumen final con buffer de lisis + 0,2 % Tritón X-100 y se agregó estreptavidina unida a la matriz de agarosa (Invitrogen), previamente lavada y equilibrada con el buffer de lisis + 0,2% tritón X-100. Se agregan 40 μL de la matriz estreptavidina-agarosa al 75% (30 μL de volumen de cama). Las muestras se incubaron durante 1 hora con rotación a temperatura ambiente, luego se lavaron con buffer de lisis + 0,2% Tritón X-100 tres veces y se eluyeron con 30 μL de buffer SB + 75mM DTT incubando a 95°C por 10 minutos.

Finalmente se agregó buffer de muestra de Laemmli 1X [Tris-HCl (pH 6,8) 62,5 mM, SDS 2%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,1%] y se analizó mediante SDS-PAGE seguido de Western blot (detallado más adelante) utilizando un anticuerpo específico de acuerdo al epítipo fusionado a la proteína de interés (ver tabla de anticuerpos).

Microscopía de Fluorescencia

Para los ensayos de microscopía de fluorescencia se crecieron células CHO-K1 en cubreobjetos y se transfectaron con los constructos fluorescentes. 18 hs post-transfección se lavaron con PBS 1X y se fijaron con paraformaldeído al 4% incubando 10 minutos a temperatura ambiente. Para la inmunofluorescencia de construcciones no fluorescentes, luego de la fijación se permeabilizó

con 0,1% Tritón X-100 + 200mM Glicina incubando durante 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se bloqueó con albúmina bovina al 3% en PBS 1X durante 2 horas a 37°C. Luego, se incubaron los cubreobjetos conteniendo las células, en presencia de los anticuerpos primarios contra HA (anti HA monoclonal Sigma 1:500) y contra myc (anti myc policlonal Santa Cruz 1:500) en presencia de 1% albúmina bovina durante 1 hora a 37°C. Transcurrido el tiempo, las muestra se lavaron con PBS1X y se incubaron con anticuerpos secundarios contra IgG de conejo o de ratón fluorescentes (anti rabbit 564 y anti mouse 488 de Roche, 1:1500) en presencia de 1% albúmina bovina. Finalmente, los cubreobjetos se lavaron con PBS 1X y con agua destilada antes de montar con Fluorsave (Calbiochem). Las células se analizaron en el microscopio confocal FV1000, con un objetivo de inmersión en aceite 60x. Para los ensayos de colocalización de las proteínas marcadas con Cherry y con YFP se tomaron imágenes secuenciales de todo el volumen del complejo de Golgi (muestras sin BFA) o de todo el volumen de la célula (muestras con BFA) y se cuantificó la superposición de las señales fluorescentes utilizando los softwares Huygenes Professional, para la deconvolución de las fotos e Image J 1.49 del NIH (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) para el cálculo del coeficiente de superposición o colocalización de Manders. En cada secuencia de imágenes se indicó la región de interés (ROI) en la que fue realizado el cálculo.

Ensayo de Co-inmunoprecipitación

Para este ensayo se utilizaron extractos de proteínas totales de una placa de 6 cm de diámetro del clon3 transfectado con vectores que expresan a Sial-T4-HA, Sial-T4 C3A-HA, Gal-T2-HA y Sial-T2-HA. Las células se lavaron tres veces con PBS1X y se resuspendieron en 300 μ L de buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 1mM EDTA, 300mM NaCl, 1% Tritón X-100, 1mM PMSF y Cocktail Inhibidor de Proteasas Sigma 1/1800). Posteriormente, se incubaron 1 hora en hielo para su lisis. Luego se centrifugó 5 minutos a 800 x g para separar las células no lisadas y el ADN, y el sobrenadante (que contiene las proteínas) se trasvasó a un tubo limpio. Para precipitar a GalNAcT-myc por cromatografía de afinidad se utilizó 1 μ g de un anticuerpo policlonal contra el epítipo myc (Santa Cruz) por condición y 30 μ L del dominio de unión a IgG de la Proteína A unido a una matriz sólida de agarosa (GE Healthcare). Las muestras se incubaron por 5 horas a 4°C con rotación. Luego, las proteínas precipitadas con la matriz sólida se lavaron con buffer de lisis y se eluyeron con buffer de muestra de Laemmli 1X [Tris-HCl (pH 6,8) 62,5 mM, SDS 2%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,1%] en presencia del agente reductor β -mercaptoetanol. El análisis de las muestras se realizó mediante SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo monoclonal contra el epítipo HA (Sigma).

Actividad *in vitro* de Sial-T4

La actividad de la mutante C3A de Sial-T4 se evaluó utilizando extractos de proteínas totales de células CHO-K1 transfectadas con vectores que expresan Sial-T4-HA (como control positivo) o Sial-T4 C3A-HA. Como control negativo se utilizaron células CHO-K1 sin transfectar. Para este ensayo se utilizaron placas de 10 cm de diámetro, incubadas durante 72 horas post-transfección.

Las células se lavaron con PBS 1X, se levantaron en 1mL de PBS 1X y se cosecharon mediante centrifugación durante 1 minuto a 800 x g. Posteriormente se resuspendieron en 50 µL de buffer de lisis (10mM Tris-HCl pH 7.2, 0.25M sucrosa). La reacción se realizó utilizando 150 µg de proteínas totales por cada condición, GM1 400 µM, 50 µg de la mezcla de detergentes: Tritón CF54/Tween 20, 2:1 (p/p) y 188 µM de CMP-9-fluoresceinyl-NeuAc en un volumen de 30 µL finales en un buffer de reacción (20mM MnCl₂, 1mM MgCl₂, 0,1M de Buffer cocodilato pH 6,5). La reacción se incubó 90 minutos a 37°C al resguardo de la luz y luego se detuvo mediante el agregado de una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 (v/v), con la que se incubó por 20 minutos para permitir la extracción de los lípidos. Las muestras fueron centrifugadas y el sobrenadante se trasvasó a un tubo limpio en el que se dejó evaporando hasta sequedad en una estufa a 37°C durante toda la noche. Finalmente, las muestras se resuspendieron en una mezcla de cloroformo: metanol 2:1 y se sembraron en una placa de HP-TLC para su corrida cromatográfica. Se realizó una primer corrida con el buffer A, cloroformo: metanol (4:1) hasta el frente de corrida y luego una segunda con el buffer B, cloroformo: metanol: CaCl₂ 0,2% (60:36:8) hasta $\frac{3}{4}$ del frente de corrida. Finalmente, el producto fluorescente fue revelado mediante exposición a luz UV.

Ensayo de Pegilación Directa

Para este ensayo se utilizaron las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana a partir de células HEK293F transfectadas con vectores que expresan las construcciones indicadas en cada experimento. Una vez transfectadas las células se lavaron con PBS 1X, se resuspendieron en 600 µL de buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1mMEDTA, 1mM PMSF, cocktail inhibidor de proteasas Sigma) y se lisaron mediante 30 pulsos a través de una jeringa de tuberculina. El lisado se centrifugó por 5 minutos a 800 x g y el sobrenadante se trasvasó a un tubo limpio para centrifugar nuevamente durante 20 minutos a 17000 x g. Las proteínas de membrana precipitadas se resuspendieron en 300 µL de buffer de lisis + 1% Tritón X-100 y se separó en dos alícuotas de 150 µL. A una alícuota se le agregó 300 µM PEG-Maleimida (Sigma) y se incubó por dos horas a 4°C con rotación. La otra alícuota se incubó en las mismas condiciones pero en ausencia de PEG-Maleimida (control del ensayo). Finalmente, a cada muestra se agregó buffer de muestra de Laemmli 1X y se sometió a SDS-PAGE seguido de Western blot utilizando un anticuerpo policlonal contra el epítipo HA (ver tabla de anticuerpos).

Capítulo II y Anexo I

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas

Las cepas utilizadas en este trabajo son la BY4742 de genotipo salvaje del consorcio EUROSCARF o mutantes con deleciones completas de los genes SWF1, PFA3, PFA4 marcadas con el cassette de resistencia a G418 KanMX del mismo consorcio.

La cepa *bsd2Δ tull1Δ* ha sido descrita previamente [197]. Sobre esta cepa, se delecionó el gen SWF1 para generar la cepa *bsd2Δ tull1Δ swf1Δ*. Esta construcción fue realizada por la Dra Gonzalez Montoro y está descrita en [112].

Plásmidos

S-aciltransferasas bajo el promotor TPI1. El marco de lectura del gen de PFA4 se amplificó de ADN genómico de la cepa BY4742 utilizando los oligos Pfa4 01 y Pfa4 02 y se clonó en los sitios *Bam*HI y *Pst*I del plásmido pJV 29. El plásmido generado se denominó pJV 174.

S-aciltransferasas bajo el control del promotor GAL1. Las secuencias codificantes de ERF2 y PFA4 se amplificaron por PCR de ADN genómico de la cepa BY4742, utilizando los pares de oligonucleótidos ERF2 01 y 02, y PFA4 01 y 02, respectivamente. Estos fragmentos se clonaron en el plásmido pJV247 como fusiones al dominio de unión a IgG de la proteína A, bajo el control del promotor GAL1.

Mutantes puntuales de Swf1 dentro del dominio DHHC. Moléculas de ADN correspondientes al dominio DHHC de Swf1 con las mutaciones en los residuos con mayor puntaje de PDEs fueron compradas a la empresa GenScript de Estados Unidos. Los fragmentos se liberaron del plásmido utilizando sitios de restricción en los bordes del mismo, y se utilizaron en experimentos de recombinación homóloga *in vivo* con el plásmido pJV362 digerido con *Xho*I.

Mutantes de Pfa4 en la cisteína del motivo DHHC. Se realizó PCR utilizando el plásmido pJV174 como templado y los oligonucleótidos Pfa4 06 y PGK-R. El oligo Pfa4 06 hibrida inmediatamente después del motivo DHHC de Pfa4 e introduce un sitio *Nco*I mediante una mutación silenciosa, el oligo PGK-R hibrida en el terminador de PGK1. Este fragmento se clonó en los sitios *Nco*I y *Hind*III del plásmido pRSET-A. El dominio N-terminal de Pfa4 se amplificó utilizando los oligonucleótidos Pfa4 01 y 05 para la mutante DHHR y Pfa4 01 y 07 para la mutante DHHA. Los fragmentos generados se clonaron en los sitios *Bam*HI y *Nco*I del plásmido generado en el sitio anterior. El vector obtenido se incubó con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III y el fragmento completo de PFA4 se clonó en los mismos sitios en el plásmido pJV 29.

Las construcciones utilizadas en el capítulo II se realizaron en colaboración con la Dra Ayelén Gonzalez Montoro. Las construcciones se verificaron por secuenciamiento luego de su obtención.

Ensayos de Crecimiento

Para los ensayos de crecimiento se utilizaron cultivos saturados de las cepas de levaduras indicadas en cada experimento, crecidas en medios ricos y selectivos de acuerdo a los plásmidos transformados en cada caso. De esos cultivos se hicieron diluciones seriadas que se plaquearon en medio sólido, conteniendo glucosa (YPD) o galactosa (YPGal) como fuente de carbono. Para los ensayos de crecimiento de cepas *swf1Δ* complementados con los vectores de interés se utilizaron medios restrictivos con lactato como única fuente de carbono (YPL) o con glucosa pero suplementado con 0,85M NaCl (YPD + 0,85M NaCl). Para el caso de cepas *pfa4Δ* complementadas con los vectores de interés se utilizó medio rico (YPD o YPGal, según corresponda) suplementado con 75 µg/mL de blanco de calcoflúor. En todos los casos el crecimiento se llevó a cabo a 30°C durante 48hs luego del plaqueado.

Detección de las PATs

Para los ensayos de Western blot de las PATs o mutantes de las mismas, se utilizaron fracciones enriquecidas en membranas para facilitar la detección. Se cosecharon 30 ODs de levaduras transformadas con los plásmidos adecuados y se resuspendieron en 300µl de buffer de lisis (PBS, 2mM EDTA, 1mM PMSF, 1X coctel inhibidor de proteasas de SIGMA), se agregó 200µl de esferas de vidrio (SIGMA) y se colocaron en un vortex especial para lisis de células (DisruptorGENIE). Se sometieron a 4 pulsos de agitación de 2 minutos cada uno a 4°C, incubando las muestras 1 minuto en hielo entre pulsos. Se agregó 200µl adicionales de buffer de lisis y se centrifugó 4 minutos a 300g a 4°C. Se trasvasó el sobrenadante a un nuevo tubo y se centrifugó 20 minutos a 17000g a 4°C. Los distintos preparados de proteínas se calentaron a 55°C durante 5 minutos en buffer de muestra de Laemmli 1X [Tris-HCl (pH 6,8) 62,5 mM, SDS 2%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,1%] en presencia del agente reductor β-mercaptoetanol y se sometió a SDS-PAGE seguido de Western blot.

Ensayo de biotilación directa

Los ensayos de biotilación se realizaron de acuerdo al protocolo descrito en [77], excepto en que luego del tratamiento con buffer de resuspensión las muestras fueron diluidas con buffer de siembra Laemmli 4X y analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot.

Ensayo de intercambio del grupo acilo por biotina (ABE) e Inmunoprecipitación

El ensayo del ABE fue realizado de la misma manera en que está detallado en los materiales y métodos del Capítulo I, excepto que se utilizaron fracciones enriquecidas en proteínas de membrana a partir de 30 ODs de un cultivo de levaduras (30 mL de un cultivo de levaduras con una densidad óptica =1 OD/mL). En este caso las células se lisaron con un vortex especial para lisis de células (DisruptorGENIE) como se detalló anteriormente.

Para la detección de autoacilación en las mutantes DHHA y DHHR de Swf1 se llevó a cabo un enriquecimiento previo mediante cromatografía de afinidad para equilibrar los niveles con Swf1 salvaje. Se utilizaron versiones de Swf1 salvaje y mutantes rotuladas con PA (dominio de unión a IgG de la Proteína A) y utilizaron muestras proteicas enriquecidas en membranas obtenidas de 30 ODs para Swf1 salvaje y 90 ODs para las mutantes DHHA y DHHR. Las muestras proteicas se incubaron con IgG humana unida a una matriz sólida de bromuro de cianógeno generada en nuestro laboratorio. Las proteínas precipitadas se eluyeron con SB y se sometieron al ensayo del ABE según el protocolo. Debido a que la cantidad de proteína eluida es muy poca se agregó a cada muestra la fracción correspondiente a 5 ODs de proteínas solubles separadas durante el enriquecimiento de las proteínas de membrana.

Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) y Western blot

Para realizar electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) se utilizó el sistema descrito por Laemmli [198]. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente, a 120 V/cm hasta que las proteínas se concentraron en el gel separador, luego se aplicaron 180 V/cm hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. La transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa se realizó según lo descrito por Towbin y colaboradores [199]. Se coloreó la nitrocelulosa con Ponceau S 0,2% (p/v), ácido acético al 1% (v/v). La membrana se lavó con ácido acético al 1% para observar que la corrida y transferencia se hayan realizado correctamente. Se bloqueó la nitrocelulosa con una solución de 5% (p/v) de leche descremada (Svelty con calcio, Nestlé) en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Las incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios indicados en cada caso se realizaron en 5% (p/v) de leche descremada en PBS 1X durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre cada incubación se realizaron tres lavados con PBS 1X durante 10 minutos.

Anticuerpos utilizados en Western blot

Anticuerpos primarios

Antígeno	Especie	Dilución	Marca comercial
GFP	Ratón	1:1500	Roche Applied Science
HA	Ratón	1:1500	Sigma Aldrich
HA	Conejo	1:3000	Generado en el laboratorio por J. Valdez-Taubas
Tlg1	Conejo	1:3000	Gentilmente cedido por el Dr. HughPelham
Rfp	Conejo	1:1500	Roche Applied Science
SialT2	Conejo	1:500	Santa Cruz (anti-ST8Sia1)
c-myc	Ratón	1:1000	Santa Cruz
Swf1-CT	Conejo	1:250	Generado en el laboratorio por Ayelén Gonzalez Montoro
Chs3	Conejo	1:500	Gentilmente cedido por el Dr. Ungermann
Caveolina	Conejo	1:5000	Santa Cruz (anti-caveolin1)

Tabla 1. Anticuerpos primarios utilizados en Western blot.

Se indica el antígeno, la especie en la cual fueron producidos, la dilución de trabajo y la marca comercial de los mismos.

Anticuerpos secundarios

Los anticuerpos secundarios utilizados para Western blot están acoplados a fluorescentes con emisión en distintas longitudes de onda en el infrarrojo: IRDye 700 e IRDye 800, ya sea anti IgG de conejo o anti IgG de ratón (LI-COR Biosciences, UK), y fueron usados en una dilución 1:20000. Los Western blot fueron escaneados usando el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, UK).

Lista y secuencia de oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia
ERF2 01	5' – aaaggatccatggccttggtctctag – 3'

ERF2 02	5' - tttctgcagttatatttctgtatttttc - 3'
PFA4 01	5' - aaaggatccatgccagtaaagtaagg - 3'
PFA4 02	5' - tttctgcagctattccatcaacac - 3'
PFA4 05	5' - catcgccatggcctatgatgatccatcattagg - 3'
PFA4 06	5' - ttgtccatggacgatgaattgcgtcg - 3'
PFA4 07	5' - catcgccatggcgcgatgatgatccatcattagg - 3'
GalNAcT27R	5' - gccgtcgacggctcgcgtacag - 3'
GalNAcT 05	5' - aagggcctggccgctctggccttctg - 3'
GalNAcT 06	5' - aagggcctgtgcgctctggccttctgctgccgccctcgtg - 3'
Syn6 01	5' - aaaaagcttcgatgtccatggaggaccctt - 3'
Syn6 02	5' - tttggatcctcacagcactaggaagagg - 3'
Syn8 01	5' - aaagaattccatggcaccggacccc - 3'
Syn8 02	5' - tttggatcctcatcagttggtcggcc - 3'

ANEXO I: APORTES AL ESTUDIO DEL MECANISMO DE LA REACCIÓN DE LA S-ACILACIÓN

1. Introducción

La caracterización de las primeras PATs en levaduras reveló que estas enzimas son capaces de autoacilarse y que el motivo DHHC sería necesario para este proceso. En los primeros estudios de Erf2 se estableció que mutaciones de la cisteína (DHHA) o de la primer histidina del motivo (DAHHC) provocan falta de acilación de su sustrato y pérdida de la autoacilación *in vitro* [95]. De manera similar, la mutación DHHA o AAHC en Akr1 provoca el mismo efecto [97]. Posteriormente, estas observaciones comenzaron a ser reportadas para otros miembros de la familia [77, 110, 111], lo que llevó a postular que el mecanismo de S-acilación de las PATs sería de tipo ping-pong, en el cual el ácido graso sería en primer lugar incorporado a la cisteína del motivo DHHC de la PAT, para luego ser transferido al sustrato aceptor. Dado que este mecanismo no había sido demostrado experimentalmente también fue sugerido otro alternativo en el cual la PAT actúa como plataforma acercando los dos sustratos. Se propuso que la enzima podría interactuar con el acil-CoA y con la proteína aceptora, acercándolos lo suficiente para que ocurra un ataque nucleofílico directo del tiol de la cisteína aceptora hacia el acil-CoA. En este caso la autoacilación no estaría involucrada en el mecanismo catalítico [182]. Un estudio en Akr1 demostró que la mutante DHHS de esta PAT no es autoacilada pero puede ser S-acilada en presencia de su versión salvaje, lo que demuestra que otras cisteínas distintas a la del dominio DHHC son S-aciladas [183]. Esto también fue demostrado para las PATs humanas DHHC5, -6 y -8, que están modificadas en tres cisteínas CCX₇₋₁₃C(S/T) ubicado en su dominio C-terminal [90].

El mecanismo de ping-pong fue finalmente postulado como mecanismo canónico de la S-acilación en el año 2012, cuando el grupo de Maurine Linder utilizó a DHHC2 y DHHC3 como modelo para demostrar *in vitro* que las PATs se autocilan y transfieren ese mismo grupo hacia el sustrato aceptor. El ensayo consta de dos etapas, la primera es la incubación de la PAT en presencia de H³palmitoil-CoA para su autoacilación. La PAT está unida a una resina sólida de modo que se puede lavar el H³palmitoil-CoA en exceso para continuar con la segunda etapa en la que se incuba la PAT autoacilada con el sustrato aceptor. Con este ensayo pudieron demostrar que la PAT transfiere el mismo grupo con el que se autoacila [105].

Mediante un rastreo genético para detectar mutaciones que provoquen pérdida de la función de Swf1, se identificó en nuestro laboratorio a la mutante DHHR (R= Arginina), que presentaba una actividad residual. Este hallazgo fue muy intrigante ya que la mutación por alanina (DHHA) u otros aminoácidos de distinta naturaleza en esa misma posición, provocan pérdida total de la función [184]. Además, el mecanismo establecido involucra la formación de intermediario a

través de un enlace tioéster con la cisteína del motivo DHHC, de modo que la mutación por cualquier otro aminoácido debería resultar en una completa falta de función.

2. La mutación de la cisteína conservada en Pfa4 no provoca pérdida total de la función

Para evaluar si el efecto de la mutación de la cisteína del motivo DHHC por una arginina es exclusivo de Swf1 o compartido por otros miembros de la familia, se generaron las mutantes DHHR y DHHA de Pfa4 y se evaluó su capacidad de restablecer el fenotipo de sensibilidad al colorante tóxico blanco de calcoflúor mediante ensayos de crecimiento de cepas *pfa4Δ*, transformadas con las versiones mutantes, con la versión salvaje de Pfa4 o con un vector vacío (EV) como control. El resultado de este ensayo muestra que ambas mutantes son capaces de restablecer parcialmente el fenotipo salvaje en la cepa *pfa4Δ*, siendo DHHA menos activa que DHHR (Figura 29 A). Esto resulta interesante porque es la primera vez que una mutante DHHA mantiene actividad residual, incluso se ha reportado que expresada en niveles endógenos, es incapaz de suprimir el fenotipo aberrante [111]. Esta discrepancia posiblemente se deba a una diferencia en los niveles de expresión, ya que en nuestro ensayo todas las PATs están expresadas bajo el control del promotor TPI1 y, una complementación parcial aún cuando la enzima está sobreexpresada, explicaría porque este fenotipo no fue detectado con la mutante expresada a niveles endógenos. La Figura 29 D muestra los niveles de expresión de Pfa4 salvaje y de las versiones mutantes.

Para confirmar este resultado se evaluó el estado de S-acilación de Chs3 en cepas *pfa4Δ* complementadas con Pfa4 salvaje o las mutantes DHHA y DHHR. El método utilizado fue el ABE. El resultado de este ensayo se correlaciona con lo observado en el ensayo de crecimiento, en el cual, ambas mutantes tienen actividad sobre el sustrato (Chs3 eluye en las muestras tratadas con hidroxilamina (H)) y, a pesar de que este ensayo no es cuantitativo, se puede apreciar que la cantidad de Chs3 eluída en la condición que expresa la mutante DHHA es menor (Figura 29 B y C).

Estos resultados indican que la cisteína en el motivo DHHC no es estrictamente necesaria para la actividad palmitoiltransferasa y que esta característica no es exclusiva de una sola PAT sino que podría ser inherente al mecanismo de acción general de estas enzimas.

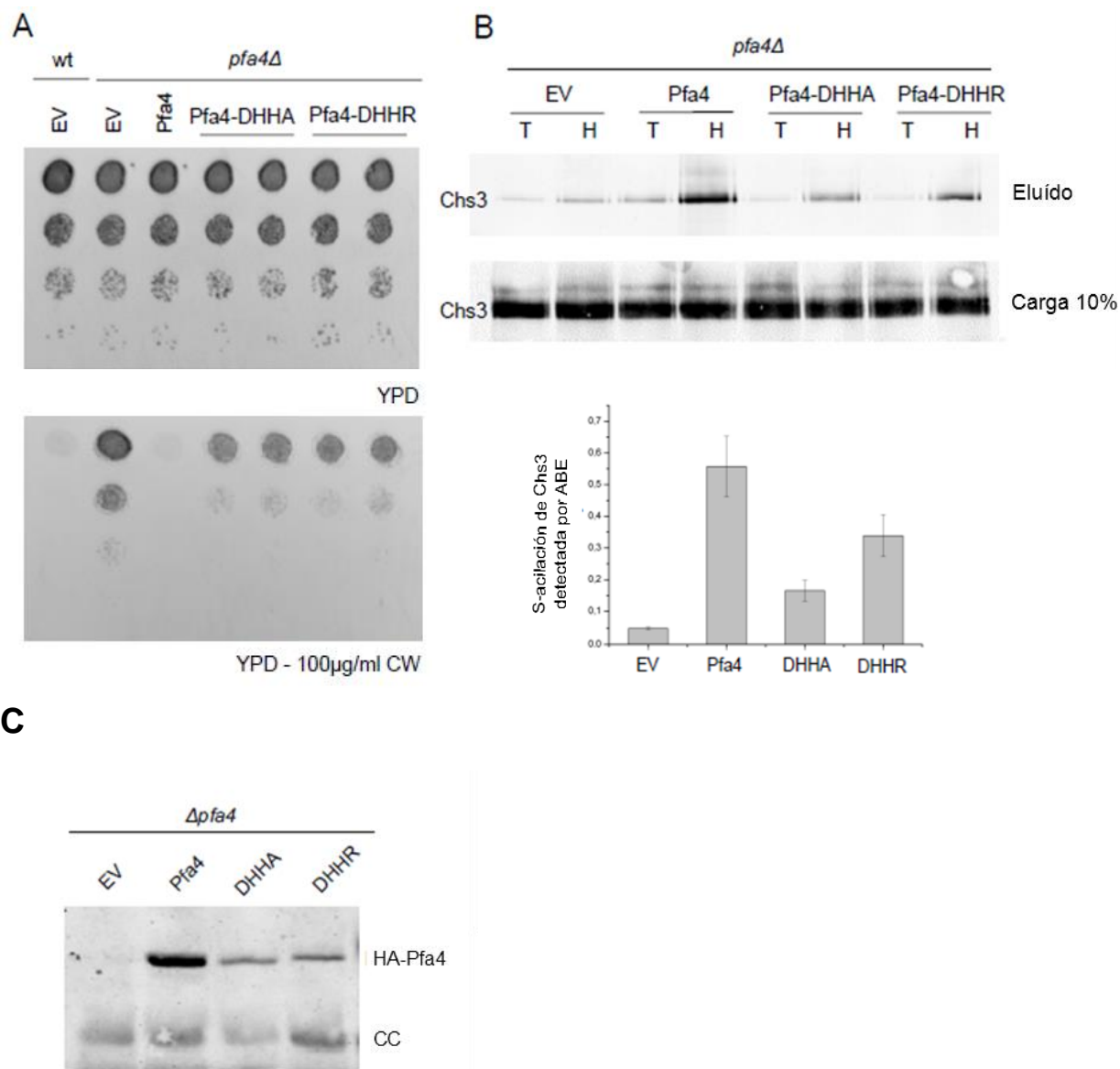


Figura 29. Las mutantes DHHA y DHHR de Pfa4 suprimen parcialmente el fenotipo de crecimiento en una cepa *pfa4Δ*. **A.** Ensayo de crecimiento mediante diluciones seriadas de una cepa salvaje (*wt*) o cepas *pfa4Δ* transformadas con un vector vacío (EV) o con vectores que expresan los alelos mutantes de Pfa4 indicados. Las transformantes fueron crecidas en medio sólido rico con glucosa (YPD) o en el mismo medio conteniendo 100 μg/mL de blanco de calcfluor (CW). **B.** Ensayo de intercambio del grupo acilo por biotina (ABE) de Chs3 en cepas *pfa4Δ* transformadas con vectores que expresan Pfa4 salvaje o las mutantes DHHA y DHHR. Las muestras fueron analizadas mediante Western blot utilizando anticuerpos contra Chs3 (panel superior). Se llevó a cabo una cuantificación de la cantidad de Chs3 precipitada en cada condición, normalizando con sus respectivos controles de carga y restando la señal de las condiciones incubadas en ausencia de hidroxilamina (panel inferior). Se cuantificaron tres experimentos independientes utilizando los programas ImajeJ y OriginPro8. El Error estándar está indicado para cada barra. **C.** Análisis de los niveles de expresión de Pfa4 salvaje y las versiones mutantes del dominio DHHC fusionadas al epítipo HA mediante Western blot, utilizando un anticuerpo policlonal anti-HA. Como control de carga (CC) se utilizó a Tlg1 que fue revelada con un anticuerpo específico contra esta proteína.

3. Las mutantes DHHA y DHHR no están S-aciladas

Nuestros resultados sugieren que la cisteína del motivo DHHC es prescindible para la S-acilación de proteínas y eso podría deberse a que existe un mecanismo alternativo al propuesto como canónico que no requiere de la acilación de la PAT o a que esta cisteína no es la que se encuentra S-acilada. Para comprender como funcionan se evaluó el estado de S-acilación de las versiones mutantes de Swf1 y Pfa4 en cepas salvajes mediante el ensayo de ABE. Debido a que los niveles de expresión de las mutantes son mucho menores a los niveles de la proteína salvaje, se utilizaron versiones rotuladas de las mismas con el dominio de unión a IgG de la Proteína A y se realizó el ensayo con una fracción previamente concentrada, obtenida mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz sólida con IgG humana. Esta fracción fue sometida al ensayo de ABE y las muestras fueron posteriormente analizadas mediante Western blot. El resultado de este ensayo indica que las versiones salvajes de Swf1 y Pfa4 están S-aciladas, ya que se observa señal específica en las muestras tratadas con hidroxilamina (H) pero no se observa señal de las versiones DHHA y DHHR de estas PATs, indicando que estas mutantes no están S-aciladas, al menos en los niveles en que son S-aciladas las versiones salvajes. A diferencia de lo reportado para Akr2, estas mutantes no serían modificadas por las versiones salvajes, ya que estos ensayos fueron realizados en una cepa que expresa Swf1 y Pfa4 a niveles endógenos (wt).

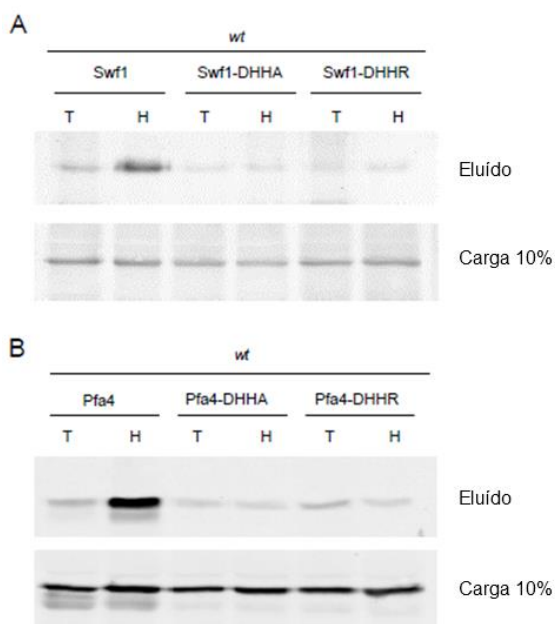


Figura 30. Autoacilación de las mutantes DHHA y DHHR de Swf1 y Pfa4. A y B. Western blot del ABE de Swf1 (A) o de Pfa4 (B) salvaje o de sus versiones mutantes en el dominio DHHC. Las proteínas están rotuladas con Proteína A y expresadas en una cepa salvaje (wt). T (Tris-HCl pH 7,4): condición en ausencia de hidroxilamina; H (hidroxilamina pH 7.4). Resultados similares fueron obtenidos utilizando cepas *swf1Δ* y *pfa4Δ*, respectivamente (no mostrado).

4. Discusión

El modelo propuesto para la S-acilación involucra la formación de un intermediario necesario para la transferencia del grupo acilo a la proteína aceptora, siendo un mecanismo de catálisis del tipo ping-pong. La formación del intermediario sería a través de la unión covalente del acilo y el tiol de la cisteína conservada en el motivo DHHC [105, 185]. Este mecanismo es consistente con la observación de que numerosas PATs pierden su función cuando esa cisteína es mutada por alanina o serina.

Los resultados de este capítulo forman parte de un trabajo en el que mostramos que la cisteína invariante del motivo DHHC no es absolutamente requerida para la función palmitoiltransferasas de al menos dos miembros de esta familia. Una explicación posible a estas observaciones es que otras cisteínas sean S-aciladas y que la modificación de la cisteína del motivo DHHC sea importante para la actividad enzimática pero no necesariamente sea la que transfiere el grupo acilo. No obstante, fuimos incapaces de detectar S-acilación en las mutantes parcialmente activas de Swf1 y Pfa4, lo que sugiere que en principio no habría sitios adicionales de S-acilación en estas proteínas. Debido a que la determinación se realizó utilizando un método poco eficiente, no podemos descartar la posibilidad de que estemos pasando por alto un sitio adicional por la falta de sensibilidad del ensayo, sobre todo si su tiempo de vida media es corto. Pero en concordancia con el resultado, todas las cisteínas restantes presentes en el dominio DHHC tienen un rol estructural en la coordinación de zinc [101] y, al menos éstas, no estarían disponibles para formación del intermediario.

Nuestros resultados sugieren la existencia de un mecanismo alternativo, independiente de la cisteína conservada, capaz de catalizar la reacción solo en determinadas condiciones, ya que para el caso de Swf1, la única que mantiene actividad residual es la mutante DHHR. Una explicación para estas observaciones es que las PATs podrían actuar como una plataforma que permite el acercamiento del sustrato donador y el sustrato aceptor de manera tal que favorece el ataque nucleofílico directo de la cisteína aceptora hacia el acil-CoA. Esta reacción sería dependiente de la velocidad de formación del tiolato en las cisteínas aceptoras, para lo cual es fundamental el contexto en el que se encuentran esas cisteínas. Esta hipótesis está reforzada por la observación de que la mutante DAHC de Erf2 es capaz de autoacilarse pero no de transferir el palmitato, lo que sugiere que la primer histidina del motivo podría ser importante en la generación del tiolato en el sustrato aceptor.

Si la formación del intermediario ocurre a través de un enlace tioéster, es factible pensar que el contexto del sitio catalítico afecte la electrofilicidad de este enlace promoviendo el ataque nucleofílico del tiolato en la proteína sustrato. Los estudios en Erf2 postulan que la primer histidina del motivo no es necesaria para la formación del intermediario pero si para la transferencia del acilo [185], con lo cual este residuo no afectaría la nucleofilicidad en la PAT pero si podría afectar la del sustrato, favoreciendo la deprotonación del tiol. Si las mutantes parcialmente activas fueran capaces de interacción con el acil-CoA y con la proteína aceptora, la

histidina del DHHR podría favorecer la formación del tiolato en el sustrato aceptor permitiendo un ataque nucleofílico directo al acil-CoA. Esto permitiría que la reacción ocurra sin necesidad del intermediario, aunque de manera menos eficiente, gracias a la asistencia de la PAT y a la alta reactividad de acil-CoA.

En las células los acil-CoAs están unidos a la proteína de unión a acil-CoA (ACBP por sus siglas en inglés) lo que disminuye drásticamente la naturaleza altamente reactiva de estos grupos. Por este motivo es muy poco probable que la reacción de S-acilación ocurra espontáneamente *in vivo*. No obstante, se ha reportado que en ciertas condiciones la energía de activación la reacción no catalizada *in vitro* es solo cinco veces mayor a la energía de la reacción catalizada [186], de modo que en un contexto en el que el acil-CoA está unido a la PAT y libre de la unión a ACBP es posible que reaccione fácilmente con el tiol de la proteína aceptora.

En el mismo rastreo genético mencionado en la introducción se aisló la mutante DQHC de Swf1, también con una actividad remanente. Similar a lo observado para la mutante DAHC de Erf2, la mutante DQHC de Sw1 es capaz de autoacilarse pero en niveles superiores a su versión salvaje, sugiriendo que la mutación de la histidina podría estar afectando la etapa de transferencia del grupo acilo. Si este residuo estuviera involucrado en la formación del tiolato, la mutante DQHR debería perder completamente la función. Esta hipótesis fue corroborada mediante ensayos de crecimiento de esta doble mutante de Swf1. Adicionalmente, si la reacción de S-acilación es asistida por la PAT, es de esperarse que dependa de la nucleofilicidad de las cisteínas, lo cual está determinado en gran parte por el contexto en el cual se encuentren y la eficiencia de la reacción catalizada por la mutante DHHR debería ser variable para sustratos diferentes. Esta hipótesis también fue confirmada utilizando los sustratos Tlg1, Snc1 y Sso1 [184]. Estos resultados sugieren que en el contexto DQHC la formación del intermediario sería posible y la presencia de un carbonilo electrofílico, en lugar de la histidina, podría permitir la S-acilación del sustrato. Interesantemente, la PAT de mamíferos DHHC13 tiene el motivo divergente DQHC en lugar del canónico y se ha demostrado que no solo es activa sobre Huntingtina [187] y ClipR59 [188] sino que además sería relevante en funciones fisiológicas a nivel sistémico, ya que ratones mutantes que carecen de esta enzima presentan deficiencias neurológicas [189] y otros con mutaciones en el gen presentan un alopecia, amiloidosis y osteoporosis [190].

En estos casos, la reacción sería más dependiente de la reactividad de la cisteína en la proteína aceptora y la presencia de esta mutación en algunas PATs sugiere que existen sustratos capaces de reaccionar con alta afinidad y/o tienen cisteínas localizadas en un contexto que les confiere una alta nucleofilicidad. Se ha reportado que la acidez y nucleofilicidad de las cisteínas puede variar de acuerdo al entorno en el que se encuentre [191, 192] y esto respalda la variabilidad observada en la S-acilación de distintos sustratos mediada por las versiones DHHR y DQHC de Swf1.

Nuestros resultados permiten proponer un mecanismo alternativo que las PATs utilizarían en ausencia del mecanismo canónico, que resulta de suma importancia a la hora de la interpretación de los resultados con respecto a la actividad de estas enzimas. Numerosas funciones no canónicas han sido reportadas para miembros de la familia DHHC asumiendo que mutaciones en la cisteína de este motivo provocan pérdida de función [154, 193-195]. Los resultados presentados en este capítulo sugieren que muchos de esos casos podrían estar mediados por mutantes parcialmente activas. Futuros ensayos requerirán mutaciones de más de un aminoácido del motivo DHHC para asegurar la pérdida total de la función.

Los resultados presentados en este anexo forman parte de la siguiente publicación:

“The canonical DHHC motif is not absolutely required for the activity of the yeast S-acyltransferases Swf1 and Pfa4”

González Montoro A., Chumpen Ramirez S. and Valdez Taubas J.

JBC.2015 Sep 11;290(37):22448-59. doi: 10.1074/jbc.M115.651356.

BIBLIOGRAFÍA

1. Lopez, P.H. and R.L. Schnaar, *Gangliosides in cell recognition and membrane protein regulation*. *Curr Opin Struct Biol*, 2009. **19**(5): p. 549-57.
2. Miljan, E.A. and E.G. Bremer, *Regulation of growth factor receptors by gangliosides*. *Sci STKE*, 2002. **2002**(160): p. re15.
3. Regina Todeschini, A. and S.I. Hakomori, *Functional role of glycosphingolipids and gangliosides in control of cell adhesion, motility, and growth, through glycosynaptic microdomains*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(3): p. 421-33.
4. Cuatrecasas, P., *Gangliosides and membrane receptors for cholera toxin*. *Biochemistry*, 1973. **12**(18): p. 3558-66.
5. Iglesias-Bartolome, R., et al., *Differential endocytic trafficking of neuropathy-associated antibodies to GM1 ganglioside and cholera toxin in epithelial and neural cells*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1788**(12): p. 2526-40.
6. Surolia, A., B.K. Bachhawat, and S.K. Podder, *Interaction between lectin from Ricinus communis and liposomes containing gangliosides*. *Nature*, 1975. **257**(5529): p. 802-4.
7. Spooner, R.A., et al., *Retrograde transport pathways utilised by viruses and protein toxins*. *Virology*, 2006. **3**: p. 26.
8. Nores, G.A., et al., *Anti-GM1 antibodies as a model of the immune response to self-glycans*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1780**(3): p. 538-45.
9. Willison, H.J. and N. Yuki, *Peripheral neuropathies and anti-glycolipid antibodies*. *Brain*, 2002. **125**(Pt 12): p. 2591-625.
10. Simpson, M.A., et al., *Infantile-onset symptomatic epilepsy syndrome caused by a homozygous loss-of-function mutation of GM3 synthase*. *Nat Genet*, 2004. **36**(11): p. 1225-9.
11. Dawkins, J.L., et al., *Mutations in SPTLC1, encoding serine palmitoyltransferase, long chain base subunit-1, cause hereditary sensory neuropathy type I*. *Nat Genet*, 2001. **27**(3): p. 309-12.
12. Daniotti, J.L. and R. Iglesias-Bartolome, *Metabolic pathways and intracellular trafficking of gangliosides*. *IUBMB Life*, 2011. **63**(7): p. 513-20.
13. Paulson, J.C. and K.J. Colley, *Glycosyltransferases. Structure, localization, and control of cell type-specific glycosylation*. *J Biol Chem*, 1989. **264**(30): p. 17615-8.
14. Maccioni, H.J., J.L. Daniotti, and J.A. Martina, *Organization of ganglioside synthesis in the Golgi apparatus*. *Biochim Biophys Acta*, 1999. **1437**(2): p. 101-18.
15. Daniotti, J.L., et al., *Mouse beta 1,3-galactosyltransferase (GAI/GM1/GD1b synthase): protein characterization, tissue expression, and developmental regulation in neural retina*. *J Neurosci Res*, 1999. **58**(2): p. 318-27.
16. Yu, R.K., et al., *Regulation of ganglioside biosynthesis in the nervous system*. *J Lipid Res*, 2004. **45**(5): p. 783-93.
17. Fleischer, B., S. Fleischer, and H. Ozawa, *Isolation and characterization of Golgi membranes from bovine liver*. *J Cell Biol*, 1969. **43**(1): p. 59-79.
18. Morre, J., L.M. Merlin, and T.W. Keenan, *Localization of glycosyl transferase activities in a Golgi apparatus-rich fraction isolated from rat liver*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1969. **37**(5): p. 813-9.
19. Marshall, R.D., *The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins*. *Biochem Soc Symp*, 1974(40): p. 17-26.
20. Maccioni, H.J., R. Quiroga, and W. Spessott, *Organization of the synthesis of glycolipid oligosaccharides in the Golgi complex*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(11): p. 1691-8.
21. Svennerholm, L., *Chromatographic Separation of Human Brain Gangliosides*. *J Neurochem*, 1963. **10**: p. 613-23.
22. Young, W.W., Jr., *Organization of Golgi glycosyltransferases in membranes: complexity via complexes*. *J Membr Biol*, 2004. **198**(1): p. 1-13.
23. Nilsson, T., et al., *Overlapping distribution of two glycosyltransferases in the Golgi apparatus of HeLa cells*. *J Cell Biol*, 1993. **120**(1): p. 5-13.
24. Giraudo, C.G. and H.J. Maccioni, *Ganglioside glycosyltransferases organize in distinct multienzyme complexes in CHO-K1 cells*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(41): p. 40262-71.

25. Hassinen, A., et al., *Golgi N-glycosyltransferases form both homo- and heterodimeric enzyme complexes in live cells*. J Biol Chem. **285**(23): p. 17771-7.
26. Teasdale, R.D., F. Matheson, and P.A. Gleeson, *Post-translational modifications distinguish cell surface from Golgi-retained beta 1,4 galactosyltransferase molecules. Golgi localization involves active retention*. Glycobiology, 1994. **4**(6): p. 917-28.
27. Crespo, P.M., V.T. Demichelis, and J.L. Daniotti, *Neobiosynthesis of glycosphingolipids by plasma membrane-associated glycosyltransferases*. J Biol Chem, 2010. **285**(38): p. 29179-90.
28. Raychoudhury, S.S. and C.F. Millette, *Surface-associated glycosyltransferase activities in rat Sertoli cells in vitro*. Mol Reprod Dev, 1993. **36**(2): p. 195-202.
29. Kukowska-Latallo, J.F., et al., *A cloned human cDNA determines expression of a mouse stage-specific embryonic antigen and the Lewis blood group alpha(1,3/1,4)fucosyltransferase*. Genes Dev, 1990. **4**(8): p. 1288-303.
30. Nara, K., et al., *Expression cloning of a CMP-NeuAc:NeuAc alpha 2-3Gal beta 1-4Glc beta 1-1'Cer alpha 2,8-sialyltransferase (GD3 synthase) from human melanoma cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(17): p. 7952-6.
31. Larsen, R.D., et al., *Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6674-8.
32. Jaskiewicz, E., et al., *Beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase (GM2 synthase) is released from Golgi membranes as a neuraminidase-sensitive, disulfide-bonded dimer by a cathepsin D-like protease*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26395-403.
33. Daniotti, J.L., et al., *GM3 alpha2,8-sialyltransferase (GD3 synthase): protein characterization and sub-golgi location in CHO-K1 cells*. J Neurochem, 2000. **74**(4): p. 1711-20.
34. Bannykh, S.I. and W.E. Balch, *Selective transport of cargo between the endoplasmic reticulum and Golgi compartments*. Histochem Cell Biol, 1998. **109**(5-6): p. 463-75.
35. Antony, B. and R. Schekman, *ER export: public transportation by the COPII coach*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(4): p. 438-43.
36. Huang, M., et al., *Crystal structure of Sar1-GDP at 1.7 A resolution and the role of the NH2 terminus in ER export*. J Cell Biol, 2001. **155**(6): p. 937-48.
37. Aridor, M., et al., *The Sar1 GTPase coordinates biosynthetic cargo selection with endoplasmic reticulum export site assembly*. J Cell Biol, 2001. **152**(1): p. 213-29.
38. Bi, X., R.A. Corpina, and J. Goldberg, *Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat*. Nature, 2002. **419**(6904): p. 271-7.
39. Aridor, M., et al., *Cargo selection by the COPII budding machinery during export from the ER*. J Cell Biol, 1998. **141**(1): p. 61-70.
40. Kuehn, M.J., J.M. Herrmann, and R. Schekman, *COPII-cargo interactions direct protein sorting into ER-derived transport vesicles*. Nature, 1998. **391**(6663): p. 187-90.
41. Springer, S. and R. Schekman, *Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs*. Science, 1998. **281**(5377): p. 698-700.
42. Barlowe, C., et al., *COPII: a membrane coat formed by Sec proteins that drive vesicle budding from the endoplasmic reticulum*. Cell, 1994. **77**(6): p. 895-907.
43. Lederkremer, G.Z., et al., *Structure of the Sec23p/24p and Sec13p/31p complexes of COPII*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10704-9.
44. Giraud, C.G. and H.J. Maccioni, *Endoplasmic reticulum export of glycosyltransferases depends on interaction of a cytoplasmic dibasic motif with Sar1*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(9): p. 3753-66.
45. Guo, Y. and A.D. Linstedt, *COPII-Golgi protein interactions regulate COPII coat assembly and Golgi size*. J Cell Biol, 2006. **174**(1): p. 53-63.
46. Traub, L.M. and S. Kornfeld, *The trans-Golgi network: a late secretory sorting station*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(4): p. 527-33.
47. Duden, R., *ER-to-Golgi transport: COP I and COP II function (Review)*. Mol Membr Biol, 2003. **20**(3): p. 197-207.

48. Tu, L., et al., *Signal-mediated dynamic retention of glycosyltransferases in the Golgi*. Science, 2008. **321**(5887): p. 404-7.
49. Bretscher, M.S. and S. Munro, *Cholesterol and the Golgi apparatus*. Science, 1993. **261**(5126): p. 1280-1.
50. Sharpe, H.J., T.J. Stevens, and S. Munro, *A comprehensive comparison of transmembrane domains reveals organelle-specific properties*. Cell, 2010. **142**(1): p. 158-69.
51. Quiroga, R., et al., *Short transmembrane domains with high-volume exoplasmic halves determine retention of Type II membrane proteins in the Golgi complex*. J Cell Sci, 2013. **126**(Pt 23): p. 5344-9.
52. Kornfeld, R. and S. Kornfeld, *Assembly of asparagine-linked oligosaccharides*. Annu Rev Biochem, 1985. **54**: p. 631-64.
53. Bieberich, E., et al., *Regulation of ganglioside biosynthesis by enzyme complex formation of glycosyltransferases*. Biochemistry, 2002. **41**(38): p. 11479-87.
54. Uliana, A.S., C.G. Giraud, and H.J. Maccioni, *Cytoplasmic tails of SialT2 and GalNAcT impose their respective proximal and distal Golgi localization*. Traffic, 2006. **7**(5): p. 604-12.
55. Giraud, C.G., J.L. Daniotti, and H.J. Maccioni, *Physical and functional association of glycolipid N-acetyl-galactosaminyl and galactosyl transferases in the Golgi apparatus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(4): p. 1625-30.
56. Kleene, R. and E.G. Berger, *The molecular and cell biology of glycosyltransferases*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1154**(3-4): p. 283-325.
57. *Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins*. Trends Cell Biol, 1997. **7**(5): p. 193-200.
58. Boscher, C., J.W. Dennis, and I.R. Nabi, *Glycosylation, galectins and cellular signaling*. Curr Opin Cell Biol, 2011. **23**(4): p. 383-92.
59. Lajoie, P. and I.R. Nabi, *Lipid rafts, caveolae, and their endocytosis*. Int Rev Cell Mol Biol, 2010. **282**: p. 135-63.
60. Martina, J.A., J.L. Daniotti, and H.J. Maccioni, *Influence of N-glycosylation and N-glycan trimming on the activity and intracellular traffic of GD3 synthase*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3725-31.
61. Martina, J.A., J.L. Daniotti, and H.J. Maccioni, *GMI synthase depends on N-glycosylation for enzyme activity and trafficking to the Golgi complex*. Neurochem Res, 2000. **25**(5): p. 725-31.
62. Ruggiero, F.M., et al., *Critical role of evolutionarily conserved glycosylation at Asn211 in the intracellular trafficking and activity of sialyltransferase ST3Gal-II*. Biochem J. **469**(1): p. 83-95.
63. D'Alessio, C., J.J. Caramelo, and A.J. Parodi, *UDP-Glc:glycoprotein glucosyltransferase-glucosidase II, the ying-yang of the ER quality control*. Semin Cell Dev Biol, 2010. **21**(5): p. 491-9.
64. Strous, G.J., et al., *Golgi galactosyltransferase contains serine-linked phosphate*. Eur J Biochem, 1987. **169**(2): p. 307-11.
65. Ma, J., et al., *Sialyltransferase isoforms are phosphorylated in the cis-medial Golgi on serine and threonine residues in their luminal sequences*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 8046-52.
66. Scheideler, M.A. and G. Dawson, *Direct demonstration of the activation of UDP-N-acetylgalactosamine: [GM3]N-acetylgalactosaminyltransferase by cyclic AMP*. J Neurochem, 1986. **46**(5): p. 1639-43.
67. Gu, X., et al., *Regulation of sialyltransferase activities by phosphorylation and dephosphorylation*. J Neurochem, 1995. **64**(5): p. 2295-302.
68. Bieberich, E., et al., *Regulation of ganglioside metabolism by phosphorylation and dephosphorylation*. J Neurochem, 1998. **71**(3): p. 972-9.

69. Dahms, N.M. and R.L. Schnaar, *Ganglioside composition is regulated during differentiation in the neuroblastoma X glioma hybrid cell line NG108-15*. J Neurosci, 1983. **3**(4): p. 806-17.
70. Wu, G. and R.W. Ledeen, *Stimulation of neurite outgrowth in neuroblastoma cells by neuraminidase: putative role of GM1 ganglioside in differentiation*. J Neurochem, 1991. **56**(1): p. 95-104.
71. Wu, G., Z.H. Lu, and R.W. Ledeen, *GM1 ganglioside in the nuclear membrane modulates nuclear calcium homeostasis during neurite outgrowth*. J Neurochem, 1995. **65**(3): p. 1419-22.
72. Wu, G., Z.H. Lu, and R.W. Ledeen, *Induced and spontaneous neuritogenesis are associated with enhanced expression of ganglioside GM1 in the nuclear membrane*. J Neurosci, 1995. **15**(5 Pt 2): p. 3739-46.
73. Walkley, S.U., *Pyramidal neurons with ectopic dendrites in storage diseases exhibit increased GM2 ganglioside immunoreactivity*. Neuroscience, 1995. **68**(4): p. 1027-35.
74. Hirschberg, K., et al., *Ganglioside synthesis during the development of neuronal polarity. Major changes occur during axonogenesis and axon elongation, but not during dendrite growth or synaptogenesis*. J Biol Chem, 1996. **271**(25): p. 14876-82.
75. Jahn, R. and R.H. Scheller, *SNAREs--engines for membrane fusion*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(9): p. 631-43.
76. Sudhof, T.C. and J.E. Rothman, *Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins*. Science, 2009. **323**(5913): p. 474-7.
77. Valdez-Taubas, J. and H. Pelham, *Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation*. Embo J, 2005. **24**(14): p. 2524-32.
78. Roth, A.F., et al., *Global analysis of protein palmitoylation in yeast*. Cell, 2006. **125**(5): p. 1003-13.
79. Kang, R., et al., *Neural palmitoyl-proteomics reveals dynamic synaptic palmitoylation*. Nature, 2008. **456**(7224): p. 904-9.
80. He, Y. and M.E. Linder, *Differential palmitoylation of the endosomal SNAREs syntaxin 7 and syntaxin 8*. J Lipid Res, 2008.
81. Duncan, J.A. and A.G. Gilman, *Characterization of Saccharomyces cerevisiae Acyl-protein Thioesterase 1, the Enzyme Responsible for G Protein alpha Subunit Deacylation in Vivo*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(35): p. 31740-31752.
82. Tomatis, V.M., et al., *Acyl-protein thioesterase 2 catalyzes the deacylation of peripheral membrane-associated GAP-43*. PLoS One, 2010. **5**(11): p. e15045.
83. Lin, D.T. and E. Conibear, *ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization*. Elife. **4**.
84. Braun, P.E. and N.S. Radin, *Interactions of lipids with a membrane structural protein from myelin*. Biochemistry, 1969. **8**(11): p. 4310-8.
85. Stoffyn, P. and J. Folch-Pi, *On the type of linkage binding fatty acids present in brain white matter proteolipid apoprotein*. Biochem Biophys Res Commun, 1971. **44**(1): p. 157-61.
86. Quesnel, S. and J.R. Silvius, *Cysteine-containing peptide sequences exhibit facile uncatalyzed transacylation and acyl-CoA-dependent acylation at the lipid bilayer interface*. Biochemistry, 1994. **33**(45): p. 13340-8.
87. Duncan, J.A. and A.G. Gilman, *Autoacylation of G protein alpha subunits*. J Biol Chem, 1996. **271**(38): p. 23594-600.
88. Forrester, M.T., et al., *Site-specific analysis of protein S-acylation by resin-assisted capture*. J Lipid Res, 2011. **52**(2): p. 393-8.
89. Martin, B.R. and B.F. Cravatt, *Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells*. Nat Methods, 2009. **6**(2): p. 135-8.
90. Yang, W., et al., *Proteome scale characterization of human S-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes*. Mol Cell Proteomics, 2010. **9**(1): p. 54-70.
91. Dowal, L., et al., *Proteomic analysis of palmitoylated platelet proteins*. Blood. **118**(13): p. e62-73.

92. Ivaldi, C., et al., *Proteomic analysis of S-acylated proteins in human B cells reveals palmitoylation of the immune regulators CD20 and CD23*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37187.
93. Blanc, M., et al., *SwissPalm: Protein Palmitoylation database*. F1000Res. **4**: p. 261.
94. Mitchell, D.A., et al., *Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases*. J Lipid Res, 2006. **47**(6): p. 1118-27.
95. Lobo, S., et al., *Identification of a Ras palmitoyltransferase in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41268-73.
96. Zhao, L., et al., *Erf4p and Erf2p form an endoplasmic reticulum-associated complex involved in the plasma membrane localization of yeast Ras proteins*. J Biol Chem, 2002. **277**(51): p. 49352-9.
97. Roth, A.F., et al., *The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase*. J Cell Biol, 2002. **159**(1): p. 23-8.
98. Politis, E.G., A.F. Roth, and N.G. Davis, *Transmembrane topology of the protein palmitoyl transferase Akr1*. J Biol Chem, 2005. **280**(11): p. 10156-63.
99. Gonzalez Montoro, A., et al., *A novel motif at the C-terminus of palmitoyltransferases is essential for Swf1 and Pfa3 function in vivo*. Biochem J, 2009. **419**(2): p. 301-8.
100. Putilina, T., P. Wong, and S. Gentleman, *The DHHC domain: a new highly conserved cysteine-rich motif*. Mol Cell Biochem, 1999. **195**(1-2): p. 219-26.
101. Gonzalez Montoro, A., R. Quiroga, and J. Valdez Taubas, *Zinc co-ordination by the DHHC cysteine-rich domain of the palmitoyltransferase Swf1*. Biochem J, 2013. **454**(3): p. 427-35.
102. O'Brien, P.J., et al., *Acylation of disc membrane rhodopsin may be nonenzymatic*. J Biol Chem, 1987. **262**(11): p. 5210-5.
103. Liang, X., et al., *Heterogeneous fatty acylation of Src family kinases with polyunsaturated fatty acids regulates raft localization and signal transduction*. J Biol Chem, 2001. **276**(33): p. 30987-94.
104. Liang, X., et al., *Mass spectrometric analysis of GAP-43/neuromodulin reveals the presence of a variety of fatty acylated species*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 33032-40.
105. Jennings, B.C. and M.E. Linder, *DHHC protein S-acyltransferases use similar ping-pong kinetic mechanisms but display different acyl-CoA specificities*. J Biol Chem, 2012. **287**(10): p. 7236-45.
106. Kordyukova, L.V., et al., *S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine*. J Virol, 2008. **82**(18): p. 9288-92.
107. Brett, K., et al., *Site-specific S-acylation of influenza virus hemagglutinin: the location of the acylation site relative to the membrane border is the decisive factor for attachment of stearate*. J Biol Chem, 2014. **289**(50): p. 34978-89.
108. Wang, Y.X., N.L. Catlett, and L.S. Weisman, *Vac8p, a vacuolar protein with armadillo repeats, functions in both vacuole inheritance and protein targeting from the cytoplasm to vacuole*. J Cell Biol, 1998. **140**(5): p. 1063-74.
109. Pan, X. and D.S. Goldfarb, *YEB3/VAC8 encodes a myristylated armadillo protein of the Saccharomyces cerevisiae vacuolar membrane that functions in vacuole fusion and inheritance*. J Cell Sci, 1998. **111 (Pt 15)**: p. 2137-47.
110. Smotrys, J.E., et al., *The vacuolar DHHC-CRD protein Pfa3p is a protein acyltransferase for Vac8p*. J Cell Biol, 2005. **170**(7): p. 1091-9.
111. Lam, K.K., et al., *Palmitoylation by the DHHC protein Pfa4 regulates the ER exit of Chs3*. J Cell Biol, 2006. **174**(1): p. 19-25.
112. Gonzalez Montoro, A., et al., *Specificity of transmembrane protein palmitoylation in yeast*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16969.
113. Fukata, M., et al., *Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes*. Neuron, 2004. **44**(6): p. 987-96.

114. Topinka, J.R. and D.S. Bredt, *N-terminal palmitoylation of PSD-95 regulates association with cell membranes and interaction with K⁺ channel Kv1.4*. *Neuron*, 1998. **20**(1): p. 125-34.
115. Hess, D., et al., *The 25 kDa synaptosomal-associated protein SNAP-25 is the major methionine-rich polypeptide in rapid axonal transport and a major substrate for palmitoylation in adult CNS*. *J. Neurosci.*, 1992. **12**(12): p. 4634-4641.
116. Keller, C.A., et al., *The γ 2 Subunit of GABAA Receptors Is a Substrate for Palmitoylation by GODZ*. *J. Neurosci.*, 2004. **24**(26): p. 5881-5891.
117. Huang, K., et al., *Huntingtin-interacting protein HIP14 is a palmitoyl transferase involved in palmitoylation and trafficking of multiple neuronal proteins*. *Neuron*, 2004. **44**(6): p. 977-86.
118. Weise, K., et al., *Influence of the lipidation motif on the partitioning and association of N-Ras in model membrane subdomains*. *J Am Chem Soc*, 2009. **131**(4): p. 1557-64.
119. Katz, M.E. and F. McCormick, *Signal transduction from multiple Ras effectors*. *Curr Opin Genet Dev*, 1997. **7**(1): p. 75-9.
120. Olson, M.F. and R. Marais, *Ras protein signalling*. *Semin Immunol*, 2000. **12**(1): p. 63-73.
121. Shields, J.M., et al., *Understanding Ras: 'it ain't over 'til it's over'*. *Trends Cell Biol*, 2000. **10**(4): p. 147-54.
122. Goodwin, J.S., et al., *Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway*. *J Cell Biol*, 2005. **170**(2): p. 261-72.
123. Rocks, O., et al., *An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms*. *Science*, 2005. **307**(5716): p. 1746-52.
124. Dekker, F.J., et al., *Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling*. *Nat Chem Biol*, 2010

125. Kanaani, J., et al., *A palmitoylation cycle dynamically regulates partitioning of the GABA-synthesizing enzyme GAD65 between ER-Golgi and post-Golgi membranes*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 4): p. 437-49.
126. El-Husseini, A.E.-D., et al., *Synaptic Strength Regulated by Palmitate Cycling on PSD-95*. *Cell*, 2002. **108**(6): p. 849-863.
127. Greaves, J. and L.H. Chamberlain, *Palmitoylation-dependent protein sorting*. *J Cell Biol*, 2007. **176**(3): p. 249-54.
128. Schweizer, A., S. Kornfeld, and J. Rohrer, *Cysteine³⁴ of the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor is reversibly palmitoylated and required for normal trafficking and lysosomal enzyme sorting*. *J Cell Biol*, 1996. **132**(4): p. 577-84.
129. Levental, I., et al., *Palmitoylation regulates raft affinity for the majority of integral raft proteins*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(51): p. 22050-4.
130. Abrami, L., S.H. Leppla, and F.G. van der Goot, *Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis*. *J Cell Biol*, 2006. **172**(2): p. 309-20.
131. Lynes, E.M., et al., *Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane*. *EMBO J*, 2011. **31**(2): p. 457-70.
132. Henis, Y.I., J.F. Hancock, and I.A. Prior, *Ras acylation, compartmentalization and signaling nanoclusters (Review)*. *Mol Membr Biol*, 2009. **26**(1): p. 80-92.
133. Blaskovic, S., M. Blanc, and F.G. van der Goot, *What does S-palmitoylation do to membrane proteins?* *Febs J*, 2013.
134. Lakkaraju, A.K., et al., *Palmitoylated calnexin is a key component of the ribosome-translocon complex*. *Embo J*, 2012. **31**(7): p. 1823-35.
135. Rohrer, J., et al., *A determinant in the cytoplasmic tail of the cation-dependent mannose 6-phosphate receptor prevents trafficking to lysosomes*. *J Cell Biol*, 1995. **130**(6): p. 1297-306.
136. Kulahin, N., et al., *Direct demonstration of NCAM cis-dimerization and inhibitory effect of palmitoylation using the BRET2 technique*. *FEBS Lett*, 2011. **585**(1): p. 58-64.

137. Abrami, L., et al., *Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(14): p. 5384-9.
138. Maeda, A., et al., *Palmitoylation stabilizes unliganded rod opsin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(18): p. 8428-33.
139. Percherancier, Y., et al., *Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor*. J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31936-44.
140. Fairbank, M., et al., *RING finger palmitoylation of the endoplasmic reticulum Gp78 E3 ubiquitin ligase*. FEBS Lett, 2012. **586**(16): p. 2488-93.
141. Zhou, X., et al., *Palmitoylation and membrane association of the stress axis regulated insert (STREX) controls BK channel regulation by protein kinase C*. J Biol Chem, 2012. **287**(38): p. 32161-71.
142. Joseph, M. and R. Nagaraj, *Interaction of Peptides Corresponding to Fatty Acylation Sites in Proteins with Model Membranes*. J. Biol. Chem., 1995. **270**(28): p. 16749-16755.
143. Wong, J.W., S.Y. Ho, and P.J. Hogg, *Disulfide bond acquisition through eukaryotic protein evolution*. Mol Biol Evol. **28**(1): p. 327-34.
144. Drisdell, R.C. and W.N. Green, *Labeling and quantifying sites of protein palmitoylation*. Biotechniques, 2004. **36**(2): p. 276-85.
145. Dietzen, D.J., W.R. Hastings, and D.M. Lublin, *Caveolin is palmitoylated on multiple cysteine residues. Palmitoylation is not necessary for localization of caveolin to caveolae*. J Biol Chem, 1995. **270**(12): p. 6838-42.
146. Rocks, O., et al., *The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins*. Cell, 2010. **141**(3): p. 458-71.
147. Brigidi, G.S., et al., *Activity-regulated trafficking of the palmitoyl-acyl transferase DHHC5*. Nat Commun, 2015 **6**: p. 8200.
148. Noritake, J., et al., *Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95*. J Cell Biol, 2009. **186**(1): p. 147-60.
149. Manders, E.M.M., F.J. Verbeek, and J.A. Aten, *Measurement of co-localization of objects in dual-colour confocal images*. Journal of Microscopy, 1993. **169**(3): p. 375-382.
150. Donaldson, J.G., D. Finazzi, and R.D. Klausner, *Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 350-2.
151. Helms, J.B. and J.E. Rothman, *Inhibition by brefeldin A of a Golgi membrane enzyme that catalyses exchange of guanine nucleotide bound to ARF*. Nature, 1992. **360**(6402): p. 352-4.
152. Reaves, B. and G. Banting, *Perturbation of the morphology of the trans-Golgi network following Brefeldin A treatment: redistribution of a TGN-specific integral membrane protein, TGN38*. J Cell Biol, 1992. **116**(1): p. 85-94.
153. Giraudo, C.G., V.M. Rosales Fritz, and H.J. Maccioni, *GA2/GM2/GD2 synthase localizes to the trans-golgi network of CHO-K1 cells*. Biochem J, 1999. **342 Pt 3**: p. 633-40.
154. Dighe, S.A. and K.G. Kozminski, *Swf1p, a member of the DHHC-CRD family of palmitoyltransferases, regulates the actin cytoskeleton and polarized secretion independently of its DHHC motif*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(10): p. 4454-68.
155. Couve, A., V. Protopopov, and J. Gerst, *Yeast Synaptobrevin Homologs are Modified Posttranslationally by the Addition of Palmitate*. PNAS, 1995. **92**(13): p. 5987-5991.
156. Gorleku, O.A., et al., *Endoplasmic reticulum localization of DHHC palmitoyltransferases mediated by lysine-based sorting signals*. J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39573-84.

157. Bernsel, A., et al., *TOPCONS: consensus prediction of membrane protein topology*. Nucleic Acids Res, 2009. **37**(Web Server issue): p. W465-8.
158. Hsu, P.D., E.S. Lander, and F. Zhang, *Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering*. Cell. **157**(6): p. 1262-78.
159. Veit, M., M.V. Serebryakova, and L.V. Kordyukova, *Palmitoylation of influenza virus proteins*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(1): p. 50-5.
160. Ohno, Y., et al., *Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1761**(4): p. 474-83.
161. Weber, T., et al., *SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion*. Cell, 1998. **92**(6): p. 759-72.
162. Lewis, M.J., et al., *Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(1): p. 23-38.
163. Bonangelino, C.J., E.M. Chavez, and J.S. Bonifacino, *Genomic screen for vacuolar protein sorting genes in Saccharomyces cerevisiae*. Mol Biol Cell, 2002. **13**(7): p. 2486-501.
164. Tong, A.H., et al., *Global mapping of the yeast genetic interaction network*. Science, 2004. **303**(5659): p. 808-13.
165. Rivinoja, A., et al., *Elevated Golgi pH impairs terminal N-glycosylation by inducing mislocalization of Golgi glycosyltransferases*. J Cell Physiol, 2009. **220**(1): p. 144-54.
166. Qian, R., C. Chen, and K.J. Colley, *Location and mechanism of alpha 2,6-sialyltransferase dimer formation. Role of cysteine residues in enzyme dimerization, localization, activity, and processing*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28641-9.
167. Yamaguchi, N. and M.N. Fukuda, *Golgi retention mechanism of beta-1,4-galactosyltransferase. Membrane-spanning domain-dependent homodimerization and association with alpha- and beta-tubulins*. J Biol Chem, 1995. **270**(20): p. 12170-6.
168. Ma, J. and K.J. Colley, *A disulfide-bonded dimer of the Golgi beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase is catalytically inactive yet still retains the ability to bind galactose*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7758-66.
169. Li, J., et al., *Disulfide bonds of GM2 synthase homodimers. Antiparallel orientation of the catalytic domains*. J Biol Chem, 2000. **275**(52): p. 41476-86.
170. Crespo, P.M., et al., *Ganglioside glycosyltransferases and newly synthesized gangliosides are excluded from detergent-insoluble complexes of Golgi membranes*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 3): p. 561-8.
171. Vetrivel, K.S., et al., *Alzheimer disease Abeta production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts*. J Biol Chem, 2009. **284**(6): p. 3793-803.
172. Mansouri, M.R., et al., *Loss of ZDHHC15 expression in a woman with a balanced translocation t(X;15)(q13.3;cen) and severe mental retardation*. Eur J Hum Genet, 2005. **13**(8): p. 970-7.
173. Raymond, F.L., et al., *Mutations in ZDHHC9, which encodes a palmitoyltransferase of NRAS and HRAS, cause X-linked mental retardation associated with a Marfanoid habitus*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(5): p. 982-7.
174. Gonzalo, S. and M.E. Linder, *SNAP-25 palmitoylation and plasma membrane targeting require a functional secretory pathway*. Mol Biol Cell, 1998. **9**(3): p. 585-97.
175. Washbourne, P., et al., *Cysteine residues of SNAP-25 are required for SNARE disassembly and exocytosis, but not for membrane targeting*. Biochem J, 2001. **357**(Pt 3): p. 625-34.
176. Pallavi, B. and R. Nagaraj, *Palmitoylated Peptides from the Cysteine-rich Domain of SNAP-23 Cause Membrane Fusion Depending on Peptide Length, Position of Cysteines, and Extent of Palmitoylation*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(15): p. 12737-12744.
177. Prekeris, R., et al., *Differential roles of syntaxin 7 and syntaxin 8 in endosomal trafficking*. Mol Biol Cell, 1999. **10**(11): p. 3891-908.

178. Hou, H., et al., *Analysis of DHHC acyltransferases implies overlapping substrate specificity and a two-step reaction mechanism*. Traffic, 2009. **10**(8): p. 1061-73.
179. Rausell A, J.D., Valencia A., *Protein interactions and ligand binding: from protein subfamilies to functional specificity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(5): p. 1995-2000.
180. Ohno, Y., et al., *Analysis of substrate specificity of human DHHC protein acyltransferases using a yeast expression system*. Mol Biol Cell, 2012. **23**(23): p. 4543-51.
181. Yik, J.H.N. and P.H. Weigel, *The Position of Cysteine Relative to the Transmembrane Domain Is Critical for Palmitoylation of H1, the Major Subunit of the Human Asialoglycoprotein Receptor*. J. Biol. Chem., 2002. **277**(49): p. 47305-47312.
182. Dietrich, L.E. and C. Ungermann, *On the mechanism of protein palmitoylation*. EMBO Rep, 2004. **5**(11): p. 1053-7.
183. Hemsley, P.A. and C.S. Grierson, *The ankyrin repeats and DHHC S-acyl transferase domain of AKR1 act independently to regulate switching from vegetative to mating states in yeast*. PLoS One, 2011. **6**(12): p. e28799.
184. Gonzalez Montoro, A., S. Chumpen Ramirez, and J. Valdez Taubas, *The canonical DHHC motif is not absolutely required for the activity of the yeast S-acyltransferases Swf1 and Pfa4*. J Biol Chem, 2015. **290**(37): p. 22448-59.
185. Mitchell, D.A., et al., *Mutational analysis of Saccharomyces cerevisiae Erf2 reveals a two-step reaction mechanism for protein palmitoylation by DHHC enzymes*. J Biol Chem, 2010.
186. Bharadwaj, M. and O.A. Bizzozero, *Myelin P0 glycoprotein and a synthetic peptide containing the palmitoylation site are both autoacylated*. J Neurochem, 1995. **65**(4): p. 1805-15.
187. Linder, M.E. and B.C. Jennings, *Mechanism and function of DHHC S-acyltransferases*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(1): p. 29-34.
188. Ren, W., Y. Sun, and K. Du, *DHHC17 palmitoylates ClipR-59 and modulates ClipR-59 association with the plasma membrane*. Mol Cell Biol, 2013. **33**(21): p. 4255-65.
189. Sutton, L.M., et al., *Hip14l-deficient mice develop neuropathological and behavioural features of Huntington disease*. Hum Mol Genet, 2013 **22**(3): p. 452-65.
190. Saleem, A.N., et al., *Mice with alopecia, osteoporosis, and systemic amyloidosis due to mutation in Zdhhc13, a gene coding for palmitoyl acyltransferase*. PLoS Genet, 2010. **6**(6): p. e1000985.
191. Marino, S.M. and V.N. Gladyshev, *Analysis and functional prediction of reactive cysteine residues*. J Biol Chem, 2012. **287**(7): p. 4419-25.
192. Poole, L.B., *The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry*. Free Radic Biol Med, 2014. **80**: p. 148-57.
193. Goytain, A., R.M. Hines, and G.A. Quamme, *Huntingtin-interacting proteins, HIP14 and HIP14L, mediate dual functions, palmitoyl acyltransferase and Mg²⁺ transport*. J Biol Chem, 2008. **283**(48): p. 33365-74.
194. Kihara, A., et al., *Long-chain base kinase Lcb4 Is anchored to the membrane through its palmitoylation by Akr1*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(21): p. 9189-97.
195. Hines, R.M., et al., *Golgi-specific DHHC zinc finger protein GODZ mediates membrane Ca²⁺ transport*. J Biol Chem, 2009. **285**(7): p. 4621-8.
196. Uliana, A.S., et al., *Modulation of GalT1 and SialT1 sub-Golgi localization by SialT2 expression reveals an organellar level of glycolipid synthesis control*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32852-60.
197. Hettema, E.H., J. Valdez-Taubas, and H.R. Pelham, *Bsd2 binds the ubiquitin ligase Rsp5 and mediates the ubiquitination of transmembrane proteins*. Embo J, 2004. **23**(6): p. 1279-88.
198. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.

199. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, *Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(9): p. 4350-4.