

**ESTUDIO SOBRE LOS MECANISMOS DE ACILACIÓN Y
TRANSPORTE INTRACELULAR DE PROTEÍNAS
PERIFÉRICAS ACILADAS**

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

Lic. María del Pilar Pedro

Director: Dr. José Luis Daniotti

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA
CIQIBIC-CONICÉT
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

2016

BIBLIOTECA DE CIENCIAS QUIMICAS

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Luis Daniotti

COMISIÓN DE TESIS

Dr. Javier E. Valdez

Dr. Gustavo A. Chiabrando

Dr. Alfredo Lorenzo



EVALUADOR EXTERNO

Dra. María Elena Teresa Damiani

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

A mis padres

A mi hermana

La realización de esta tesis fue posible gracias al esfuerzo, cariño y apoyo incondicional de muchas personas que formaron y forman parte de mi vida. A todas ellas gracias por ayudarme a lograr este objetivo.

A la Universidad Nacional de Córdoba y la Facultad de Ciencias Químicas, por la formación recibida en estos años.

Al Departamento de Química Biológica y al CIQUIBIC, por darme un lugar para la realización de esta tesis. Gracias a todos sus integrantes por recibirme de la mejor manera y estar siempre dispuestos a ayudar cualquiera sea la duda o el problema.

A CONICET por el apoyo económico.

Al Dr. José Luis Daniotti por dejarme formar parte de su grupo. Por todas tus enseñanzas, pero sobretodo por el ejemplo de trabajo y esfuerzo. Por la pasión y el entusiasmo que contagias ante cada nueva pregunta. Gracias Pepe por todas tus charlas y apoyo extra académico.

A los miembros de mi comisión de tesis Dres. Javier Valdez, Gustavo Chiabrando y Alfredo Lorenzo, por el interés, las sugerencias y los aportes realizados en el desarrollo de este trabajo. Gracias a la Dra. María Teresa Damiani por la evaluación de la tesis.

Al Ale Vilcaes. Muchos de los experimentos, hipótesis y conclusiones presentadas en este trabajo fueron posibles gracias a tu inmensa ayuda. Gracias por el ánimo y el empuje en el comienzo y en los momentos difíciles.

A la Maca y al Fer, excelentes compañeros durante la mayor parte de mi tesis. Un placer trabajar y aprender junto a ustedes. Gracias también a los que formaron parte del laboratorio en algún momento.

A los integrantes de los laboratorios vecinos Maccioni/Valdez, Caputto y Curtino. Gracias por los consejos, ayuda y reactivos prestados. Gracias César por el aguante este último tiempo.

Al Chris, por el apoyo y la confianza constante. Por la música y las charlas compartidas entre experimentos.

Al Dr. José Barra por la ayuda desinteresada en momentos complicados. Gracias por enseñarme y trabajar conmigo.

A las chicas de cultivo Susi y Gabi, y a Dani por todo el trabajo y la buena predisposición. A la gente de microscopía Ceci, Pili, Marce y en especial a Carlos, por la enorme paciencia y ayuda durante tantas horas de experimentos.

A mis padres. Soporte incondicional e indispensable en cada aspecto de mi vida. Gracias por su ejemplo y por tantas cosas imposibles de poner en palabras.

A mi hermana y compañía permanente. Gracias Ito por cuidarme y estar siempre para mí. Por todas las cosas que compartimos.

A mi familia grande distribuida por Santiago y Curuzú. A mi familia en Córdoba, siempre presente. Gracias Félix por tus consejos, tu amistad y por las rutinas y cambios compartidos en tantos años. Gracias Rosa por recibirme en tu casa y hacer que también fuera la mía, por tu cariño y apoyo desde el principio. Gracias a mis primas Ana y Georgi, por ser la perfecta combinación entre amigas y familia, por las miles de charlas en momentos lindos y no tanto. A mis abuelos, que se me fueron durante estos años pero que siguen estando, sabiendo que hoy se sentirían orgullosos de mí.

A mis amigos de la facu y de la vida, algunos más frecuentes que otros, pero todos igualmente importantes.

Por último, gracias Javi. *Más cerca que está, en un allá que es siempre aquí (O. Paz).*

ÍNDICE

Lista de figuras	iii
Abreviaturas utilizadas	v
Resumen/Abstract	vi
Introducción	1
Lipidación de proteínas.....	2
S-acilación	3
Funciones de la S-acilación.....	5
Enzimas involucradas en la S-acilación	8
<i>Acil-transferasas (PATs)</i>	8
<i>Acil-tioesterasas (APT's)</i>	10
Metodologías para estudiar la S-acilación.....	15
<i>Detección de proteínas palmitoiladas</i>	16
<i>Alteración del estado de palmitoilación</i>	19
<i>Estudio de las consecuencias de alteraciones en la S-acilación</i>	27
Proteínas S-aciladas modelo.....	28
<i>GAP-43 (Growth Associated Protein-43)</i>	28
<i>H-Ras (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)</i>	30
Antecedentes y planteo del problema	36
Objetivos	38
Objetivo general.....	39
Objetivos específicos.....	39
Resultados y discusión	40
Capítulo I	42
<i>2-BP inhibe la actividad PAT y la asociación a membranas de GAP-43 monoacilada</i>	43
<i>2-BP afecta la cinética de deacilación de GAP-43 monoacilada</i>	43
<i>Caracterización bioquímica y efecto del 2-BP sobre APT1 y APT2 recombinantes</i>	47
Discusión	53
Capítulo II.....	57
<i>Distribución diferencial de mutantes de S-acilación de H-Ras en endomembranas de distintas líneas celulares</i>	59
<i>Las mutantes de acilación de H-Ras constitutivamente activas producen activación de Erk1/2</i>	65
<i>APT1 y APT2 deacilan H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S) en MP</i>	66
<i>Las fracciones de las mutantes de monoacilación de H-Ras en MP, complejo de Golgi y RE, son dinámicas e intercambiables</i>	73
<i>Dinámica de las mutantes de monoacilación de H-Ras en el complejo de Golgi</i>	78

Discusión	83
Conclusiones	90
Materiales y métodos	93
<i>Plásmidos</i>	94
<i>Anticuerpos</i>	94
<i>Cultivos celulares y transfecciones</i>	95
<i>Electroforesis y Western blot</i>	95
<i>Tratamiento con 2-BP</i>	96
<i>Fraccionamiento subcelular</i>	96
<i>Experimento de partición en Tritón X-114</i>	96
<i>Precipitación de proteínas con cloroformo/metanol</i>	97
<i>Expresión y purificación de APT1 y APT2 recombinantes</i>	97
<i>Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia</i>	98
<i>Microscopía de live cell y medula de la cinética de deacilación</i>	98
<i>Ensayo de hidrólisis de palmitoil-CoA</i>	99
<i>Mediciones por Small-angle X-ray Scattering (SAXS)</i>	99
<i>Acyl Biotinyl Exchange (ABE)</i>	100
<i>Endocitosis de transferrina</i>	100
<i>Ensayo de fosforilación de Erk</i>	101
<i>Forster Resonance Energy Transfer (FRET), Experimento y análisis</i>	101
<i>Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) y Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP)</i>	101
<i>Tratamiento con ácido tánico</i>	102
<i>Experimentos de fotoinhibición</i>	102
<i>Análisis cuantitativo de las imágenes</i>	103
Bibliografía	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de lipidaciones de proteínas en células eucariotas	2
Figura 2. S-acilación dinámica y reversible	4
Figura 3. Ciclo de acilación/deacilación de una proteína periférica	7
Figura 4. Esquema de una PAT	9
Figura 5. Estructura de APT1 humana	12
Figura 6. Representación esquemática de la metodología de <i>click chemistry</i>	18
Figura 7. Representación esquemática de la metodología de ABE	19
Figura 8. Estructura química de los inhibidores de la palmitoilación	20
Figura 9. Estructura química de los inhibidores de las APTs	23
Figura 10. Localización de GAP-43 y ¹³ GAP-43 en células CHO-K1	29
Figura 11. Localización subcelular de las mutantes de acilación en células CHO-K1	30
Figura 12. Cascada de señalización mediada por Ras	31
Figura 13. Región hipervariable de Ras	33
Figura 14. 2-BP inhibe la acilación y la asociación a membranas de ¹³ APT-43(C3S) sintetizada <i>de novo</i>	44
Figura 15. Cinética de deacilación de ¹³ GAP-43(C3S) a diferentes dosis de 2-BP	46
Figura 16. Cinética de deacilación y asociación a membrana de GAP-43 a diferentes dosis de 2-BP	47
Figura 17. Purificación y caracterización bioquímica de APT1 y APT2 recombinantes	48
Figura 18. Actividad de APTs a distintas concentraciones de palmitoil-CoA y caracterización estructural del sustrato por SAXS	49
Figura 19. Análisis de la expresión de APTs en células CHO-K1 y caracterización bioquímica	50
Figura 20. Inhibición <i>in vitro</i> de APT1 con 2-BP	51
Figura 21. Análisis de la localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células CHO-K1	60
Figura 22. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células COS7	61
Figura 23. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células NIH-3T3	62
Figura 24. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células HeLa	63
Figura 25. Asociación a membranas y S-acilación de las variantes de palmitoilación de H-Ras en células CHO-K1	64
Figura 26. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-RasG12V en células CHO-K1	65
Figura 27. Activación de Erk1/2 por variantes de acilación de H-Ras	66
Figura 28. Deacilación de H-Ras	67
Figura 29. Deacilación de H-Ras(C181S)	68
Figura 30. Deacilación de H-Ras(C184S)	69
Figura 31. APT1 y APT2 interactúan con H-Ras S-acilada	71
Figura 32. Efecto de APT1 y APT2 en la deacilación de H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S)	72
Figura 33. Intercambio entre las fracciones de MP y complejo de Golgi de las mutantes de monoacilación de H-Ras	74

Figura 34. Salida de las mutantes de monoacilación del complejo de Golgi independientemente de su estado de palmitoilación	77
Figura 35. Intercambio de las mutantes de monoacilación de H-Ras entre RE y complejo de Golgi.....	78
Figura 36. Dinámica de las mutantes de monoacilación de H-Ras en complejo de Golgi.	81
Figura 37. Modelo del tráfico intracelular de las diferentes versiones de acilación de H-Ras	87

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- 2-BP:** 2-bromopalmitato (ácido 2-bromohexadecanoico)
- APT:** Acil-tioesterasa (*Acyl-protein Thioesterase*)
- CFP:** Proteína fluorescente cian (*Cyan Fluorescent Protein*)
- CHO-K1:** Células de ovario de hámster chino (*Chinese Hamster Ovary*)
- CHX:** Cicloheximida
- ER:** Endosoma de reciclado
- Erk:** *Extracellular signal-regulated kinase*
- FLIP:** Pérdida de fluorescencia luego del fotoblanqueo (*Fluorescence Loss in Photobleaching*)
- FRAP:** Recuperación de fluorescencia luego del fotoblanqueo (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*)
- FRET:** Transferencia de energía de resonancia de Förster (*Förster Resonance Energy Transfer*)
- GAP-43:** *Growth Associated Protein*
- GFP:** Proteína fluorescente verde (*Green Fluorescent Protein*)
- GTPasa:** Proteína que hidroliza GTP
- H-Ras:** *Harvey Rat Sarcoma*
- MP:** Membrana plasmática
- ¹³N-GAP-43:** Péptido consistente en los 13 aminoácidos del extremo N-terminal de GAP-43
- P-CoA:** Palmitoil Coenzima A (Palmitoil-CoA)
- PA-GFP:** Proteína fluorescente verde fotoactivable (*Photoactivable Green Fluorescent Protein*)
- PAT:** Acil-transferasa (*Protein Acyltransferase*)
- RE:** Reticulo endoplásmico
- SAXS:** Dispersión de rayos X en ángulo pequeño (*Small-angle X-ray Scattering*)
- Tf:** Transferrina
- TGN:** Red del trans-Golgi (*Trans-Golgi Network*)
- YFP:** Proteína fluorescente amarilla (*Yellow Fluorescent Protein*)

RESUMEN/ABSTRACT

Biblioteca de Ciencias Químicas USF

La unión covalente de palmitato, u otros ácidos grasos, a residuos de cisteína a través de enlaces tioéster (S-acilación), es una modificación postraducciona reversible que tiene diferentes consecuencias sobre la proteína modificada. Dicha lipidación está catalizada por las enzimas acil-transferasas o PATs (del inglés *Protein Acyltransferases*), mientras que la deacilación involucra la actividad de las enzimas tioesterasas o APTs (del inglés *Acyl-Protein Thioesterases*).

La manipulación farmacológica de esta modificación ha avanzado en los últimos tiempos gracias al desarrollo de diversos inhibidores principalmente de la deacilación, aunque también de la acilación. La utilización de los mismos permite un mayor entendimiento del proceso mediante el cual ocurre la palmitoilación y la importancia de su dinamismo y reversibilidad. Entre ellos el 2-bromopalmitato (2-BP), un análogo no metabolizable del ácido palmítico, es el más ampliamente utilizado para inhibir las PATs. Sin embargo, observaciones previas de nuestro laboratorio sugirieron que 2-BP podría afectar también el proceso de deacilación.

En este trabajo investigamos el efecto de dicho compuesto, tanto *in vivo* como *in vitro*, sobre la deacilación de la proteína GAP-43 y, más específicamente, sobre la actividad de APT1 y APT2. En base a los resultados aquí presentados, y como la actividad enzimática de las APTs se vio inhibida por el tratamiento con 2-BP afectando los ciclos de acilación/deacilación de la proteína estudiada, sugerimos que los análisis cinéticos y la interpretación de los resultados obtenidos mediante el uso de este inhibidor, deberían ser cuidadosamente revisados. Sin embargo, condiciones experimentales controladas utilizando 2-BP, pueden resultar útiles para detener el recambio de palmitato en proteínas palmitoiladas. Esto podría permitir el estudio de la importancia del proceso de deacilación en la función de dichas proteínas.

Por otra parte, estudiamos el rol de la deacilación y de las tioesterasas sobre la localización intracelular dinámica de la proteína H-Ras, ya que la correcta distribución de dicha proteína es un aspecto fundamental en la biología de la misma. De esta manera, describimos los distintos procesos y la cinética mediante los cuales H-Ras es movilizada entre las diferentes organelas, y la interconexión existente entre ellas. A pesar de que se observaron notorias diferencias en cuanto a la localización subcelular de las variantes di y monoaciladas, demostrando la importancia de la estequiometría y la posición de los palmitatos, todas resultaron funcionales siendo capaces de activar la vía de señalización de Erk1/2. Además, demostramos que la deacilación de H-Ras monoaciladas se ve incrementada en células que sobreexpresan tanto APT1 como APT2, modificando su localización subcelular. La versión

salvaje, sin embargo, no mostró modificaciones en la escala de tiempo analizada, probablemente debido a un proceso de deacilación más lento. Por último, demostramos que tanto mecanismos de transporte vesicular como de difusión, están involucrados en el tráfico retrógrado de H-Ras desde membrana plasmática, realizando un aporte a los modelos establecidos previamente para el transporte intracelular de esta proteína.

En conclusión, este trabajo destaca la importancia de la modificación por S-acilación y su dinámica sobre distintos aspectos estudiados en dos proteínas periféricas modelo (GAP-43 y H-Ras). La modulación de la actividad de las enzimas involucradas en la palmitoilación (en este caso en particular, las tioesterasas) resulta relevante para determinar la dinámica del tráfico intracelular y la localización subcelular apropiada, pudiendo afectar, en consecuencia, la función de las proteínas modificadas.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

The covalent attachment of a palmitate, or other fatty acids, to a cysteine residue through a thioester bond (S-acylation), is a post-translational and reversible modification that has different consequences on the modified protein. This lipidation is catalyzed by Protein Acyltransferases (PATs), while deacylation involves the activity of Acyl-Protein Thioesterases (APT_s).

The pharmacological manipulation of this modification has advanced in the later years due to the development of different inhibitors of both acylation and deacylation, being more significant in the latter case. The use of these inhibitors allows a greater understanding of the palmitoylation process and the importance of its dynamism and reversibility. Among them, 2-bromopalmitate (2-BP), a non-metabolizable analog of palmitic acid, is commonly used to inhibit PATs activity. However, previous observations from our laboratory suggested that 2-BP can also affect the deacylation step.

In this work we investigated the effect of this compound, both *in vivo* and *in vitro*, on the deacylation of GAP-43 and, more specifically, on APT₁ and APT₂ function. We concluded that the enzymatic activity of APT_s was inhibited with 2-BP treatment affecting acylation/deacylation cycles of the studied protein. In consequence, we suggest that previous reports on palmitoylation kinetics using this inhibitor should be carefully analyzed. Nevertheless, controlled experimental conditions using 2-BP could be still useful to stop the palmitate turnover of S-acylated proteins. This can allow the study of the importance of deacylation process in the function of these proteins.

We also studied the role of deacylation and thioesterases on the dynamic intracellular localization of H-Ras, due to the relevance of the correct distribution of the protein in the biology of Ras. Thus, we described the different processes and kinetics involved in the trafficking of H-Ras through the organelles, and the interconnection between them. In spite of the notorious differences in the subcellular localization of di and monoacylated variants, which demonstrate the importance of the stoichiometry and the position of the palmitates, all of them were functional and capable of activating Erk1/2 signaling pathway. Moreover, we observed that monoacylated H-Ras deacylation is enhanced in cells that overexpress either APT₁ or APT₂, modifying their subcellular localization. The wild type protein, however, did not show any modification on its location in the scale of time analyzed, probably due to a slower deacylation process. Finally, we demonstrated that both vesicular transport as well as diffusion are involved in the retrograde trafficking of H-Ras from the plasma membrane, making an important contribution to the previously established models describing the intracellular transport of this protein.

In conclusion, this work highlights the importance of S-acylation and its dynamics on the different aspects described for the peripheral model proteins studied. The modulation of the enzymes activity that regulate palmitoylation (particularly the thioesterases) is relevant in determining the dynamics of intracellular trafficking and the appropriate subcellular localization and might affect, in consequence, the function of the modified proteins.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

INTRODUCCIÓN

Biblioteca de Ciencias Químicas UNQ

LIPIDACIÓN DE PROTEÍNAS

Los aminoácidos pueden sufrir modificaciones dinámicas o permanentes que pueden afectar o regular determinadas características de las proteínas.

Algunas proteínas citosólicas requieren asociarse, al menos temporalmente, con membranas celulares para cumplir su función en señalización, tráfico, etc. Para ello, pueden unirse covalentemente a una variedad de lípidos incluyendo ácidos grasos, isoprenoides o colesterol [1] (**Figura 1**). De esta manera, las modificaciones lipídicas juegan un rol central en la localización subcelular y en la función de proteínas periféricas. Además, dichas modificaciones aumentan la hidrofobicidad de las proteínas y tienen un impacto en la estructura y en la afinidad de éstas por las membranas celulares [1] o por dominios de dichas membranas [2].

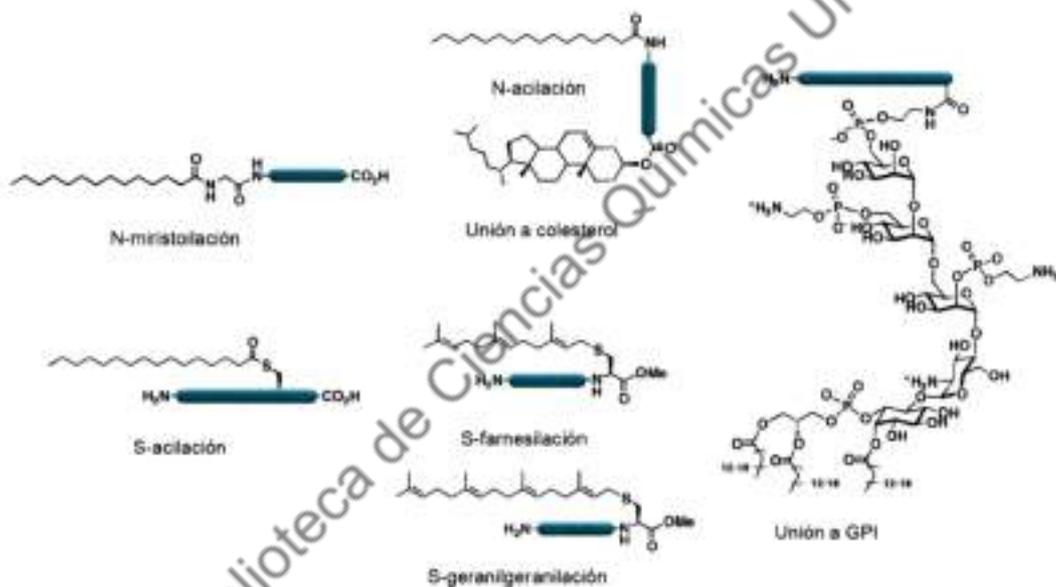


Figura 1. Tipos de lipidaciones de proteínas en células eucariotas. Los óvalos de color representan las proteínas modificadas. Los tipos de enlace químico y los lípidos incorporados se representan en la figura conjuntamente con la posición en la que se agregan (extremos N- y C-terminales) (Modificado de Hang y colaboradores, 2011).

La lipidación (o unión covalente de lípidos) de proteínas de células eucariotas puede ser dividida en dos categorías: aquellas que ocurren en el citosol o en la cara citoplasmática de membranas celulares, y las que ocurren en el lumen de organelas que forman parte de la vía secretora [1, 3]. Dentro de estas últimas, la unión de glicosilfosfatidilinositol (GPI) en el retículo endoplásmico (RE) es la mejor caracterizada. Una vez modificada, la proteína transita la vía exocítica hasta llegar a la superficie celular, en donde permanece anclada a la cara

extracelular de la membrana plasmática (MP) [4]. Otra modificación que ocurre en las proteínas que van a ser secretadas (como morfógenos, citoquinas y hormonas) es la unión éter y la unión éster o amida de colesterol o ácidos grasos (N-acilación), respectivamente, tal como es el caso de las proteínas Hedgehog y Wnt [5, 6].

Se pueden distinguir tres tipos de modificaciones citosólicas: prenilación, N-miristoilación y S-acilación. Las mismas corresponden a la unión tioéter de un grupo isoprenilo (como C15 farnesilo o C20 geranylgeranilo) a una cisteína, la unión amida de un grupo miristoilo a una glicina y la unión tioéster de un ácido graso de cadena larga a una cisteína, respectivamente.

Las enzimas citosólicas farnesil transferasa (FTasa) y geranylgeranil transferasa (GGTasa) reconocen y modifican a sus sustratos en una cisteína que se encuentra a cuatro residuos del C-terminal, en lo que se conoce como motivo CAAX [7]. En este dominio, C es la cisteína a modificar, A son aminoácidos alifáticos y X es un residuo que contribuye a la selectividad (farnesilación o geranylgeranilación) de la prenilación. Esta modificación es indispensable para la asociación a membranas de las proteínas preniladas.

Por otra parte, la N-miristoilación se refiere a la adición irreversible de miristato a un residuo de glicina en el N-terminal de una proteína, dentro de una secuencia consenso definida (MGXXXS/T) [8]. Esta modificación es predominantemente cotraduccional y ocurre en el citosol mientras el polipéptido emerge del ribosoma luego de la remoción de la metionina por una metionilpeptidasa.

De todas estas modificaciones por unión covalente a lípidos, la S-acilación es la única que es reversible, teniendo una vida media menor a la de la proteína modificada y, por lo tanto, permitiendo ciclos rápidos de acilación/deacilación [8-10]. Esto implicaría que la S-acilación de proteínas puede tener un rol en la regulación dinámica de la localización y función de las proteínas modificadas. Dicha lipídación es el objeto de estudio del presente trabajo de investigación.

S-ACILACIÓN

Como se mencionó anteriormente, la S-acilación es la unión de un ácido graso a una cisteína a través de un enlace tioéster (**Figura 2**). La labilidad de dicho enlace en el medio intracelular es responsable de la reversibilidad de esta modificación. Sin embargo, es importante enfatizar que los ciclos de acilación/deacilación son lentos o incluso nulos para ciertas proteínas [8, 10-13]. En este sentido, algunas cuestiones a responder en el campo de

la lipidación son: ¿cómo se regula la dinámica del recambio lipídico en la S-acilación? y ¿por qué distintas proteínas exhiben diferentes velocidades de recambio? [14].

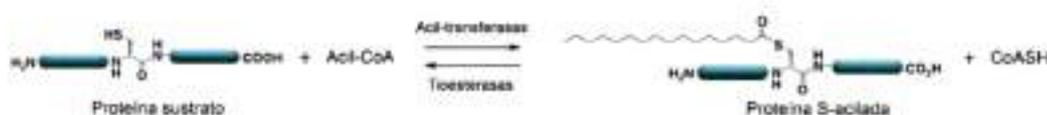


Figura 2. S-acilación dinámica y reversible. Los óvalos de color representan la proteína que es modificada. El residuo de cisteína blanco de la S-acilación se muestra conjuntamente con el enlace tioéster que se forma entre su grupo tiol y el ácido graso. El sustrato donador de dicho lípido es el acil-CoA. Las acil-transferasas y las tioesterasas son las enzimas involucradas en la acilación y deacilación, respectivamente. (Modificado de Zhang y colaboradores, 2010).

La S-acilación, que es una modificación exclusivamente postraduccional, es comúnmente referida como palmitoilación. Esto se debe a que los primeros estudios de dicha modificación se realizaron empleando [^3H]palmitato para monitorear la incorporación del lípido a determinadas proteínas. Se conoce, sin embargo, que las proteínas S-aciladas son capaces de incorporar estearato (C18:0) y oleato (18:1), aunque en menor proporción que palmitato (C16:0) [15, 16].

La palmitoilación ocurre en una gran variedad de proteínas, incluyendo a las transmembrana y las periféricas, siendo indispensable para la asociación a membranas de estas últimas. De hecho, estudios proteómicos revelan que las proteínas palmitoiladas en mamíferos son tan abundantes como diversas, teniendo un amplio rango de funciones en la célula [17]. El palmitoiloma, tal como se conoce al conjunto de proteínas palmitoiladas, indica que al menos el 10% de las proteínas en humanos se encuentran S-aciladas [18, 19].

A diferencia de otras modificaciones por unión a lípidos, la palmitoilación no posee una secuencia consenso. Sin embargo, se conoce que suele suceder en cisteínas que tienen características en común, ya que se encuentran cercanas a secuencias con afinidad por membranas como por ejemplo un entorno hidrofóbico o básico, adyacente a otras modificaciones lipídicas como miristoilación o prenilación, o cerca de dominios transmembrana. Esto permitió la creación de softwares que utilizan algoritmos de predicción de potenciales sitios de palmitoilación [20-23], generando una importante herramienta para la investigación *in silico* de distintas proteínas candidatas.

En resumen, la S-acilación de proteínas posee dos características fundamentales que la diferencian de los demás tipos de lipidaciones: su reversibilidad y la capacidad de modificar tanto proteínas periféricas como transmembrana.

FUNCIONES DE LA S-ACILACIÓN

Para el caso de las proteínas transmembrana, como canales iónicos o receptores, el rol de la S-acilación no es tan directo y predecible como para las proteínas periféricas, y los mecanismos por los cuales ejerce su función no son del todo entendidos. Estas proteínas pueden palmitoilarse en cisteínas adyacentes o incluso dentro del dominio transmembrana, así también como en regiones citosólicas [14, 24].

Se ha propuesto que, si se observaran efectos debido a la modificación de estas proteínas, ocurrirían como consecuencia de cuatro procesos no excluyentes: alteraciones en la conformación de las proteínas, asociación con dominios específicos de membrana, control de las interacciones con otras proteínas y control de la interacción con otras modificaciones postraduccionales (ubiquitinación) [24, 25]. Como resultado de estos procesos, en algunas proteínas transmembrana se observó que la palmitoilación resulta indispensable para su localización en MP, quedándose retenidas en RE o Golgi en el caso de no ser aciladas [25]. Asimismo, la palmitoilación ha sido involucrada en la endocitosis y tráfico de determinadas proteínas como el receptor de transferrina y el de manosa-6-fosfato [25]. Con respecto a las interacciones proteína-proteína, se han reportado ejemplos de la S-acilación regulando este proceso tanto de manera positiva como negativa [24, 25]. Además, la palmitoilación de residuos de cisteína en los dominios citoplásmicos de dichas proteínas, podría tener un efecto en la proximidad a membranas celulares de estos dominios. De hecho, ha sido descrito que la S-acilación podría influenciar la estructura de la proteína y su función actuando como un punto de anclaje adicional a la membrana [19]. Este es el caso de la subunidad y del canal de sodio epitelial, cuya palmitoilación en cisteínas cercanas al dominio transmembrana regulan su actividad estabilizando la apertura del mismo [26]. Recientemente se demostró que la S-acilación de cisteínas en el extremo C-terminal del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR por su nombre en inglés) modifica la estructura de dicho extremo haciéndolo interactuar con membranas e impidiendo su activación [27]. Un reordenamiento similar dependiente de la palmitoilación y prenilación fue descrito para el receptor de prostaciclina, lo cual modula su actividad [28]. En consecuencia, en estos últimos ejemplos, la lipidación ejercería un rol en la estructura y topología de las proteínas transmembrana con respecto a las membranas [14].

Por otra parte, las proteínas periféricas generalmente interactúan transientemente con membranas celulares a través de dominios hidrofóbicos o modificaciones lipídicas anteriormente mencionadas, constituyendo lo que se conoce como "primera señal" de

asociación a membranas. De esta manera, la proteína puede ser S-acilada, aportando esta modificación, la suficiente hidrofobicidad para una asociación más estable a dichas membranas celulares. Este principio es conocido como trampa cinética y postula que los grupos miristoilo y prenilo sólo generan una débil afinidad por membranas, mientras que la “segunda señal” (doble lipiación: miristato/palmitato, prenilo/palmitato o palmitato/palmitato) media un incremento en la asociación y una interacción irreversible o permanente con dichas membranas [29].

La identidad de las dos señales de anclaje a membrana tiene una importante relevancia en la localización de la proteína modificada. Esto ocurre porque las enzimas encargadas de llevar a cabo la incorporación co y postraducciona de mirístico y prenilo, respectivamente, son proteínas citosólicas [14]. En contraste, y como se describirá en detalle más adelante, las enzimas encargadas de la S-acilación están asociadas a membranas, en donde, por lo tanto, ocurre esta modificación. En consecuencia, posteriormente a la modificación en el citosol, las proteínas miristoiladas o preniladas deben interactuar con membranas para permitir la subsiguiente palmitoilación. Un claro ejemplo de esto son ciertos miembros de la familia de las GTPasas Ras que se encuentran farnesiladas y palmitoiladas y cuyas modificaciones y sus consecuencias se discutirán más adelante. En este sentido, una función de la S-acilación está relacionada con el direccionamiento de proteínas a determinados compartimentos intracelulares. A pesar de que esta modificación lipídica podría parecer “simple” y tener poca influencia en dicho proceso, ha sido demostrado que la palmitoilación puede actuar como una señal eficiente y versátil, regulando el tráfico de proteínas a sus diferentes destinos [8, 30].

Otro rol importante de la S-acilación en las proteínas periféricas, es su direccionamiento o partición en determinados dominios de membrana. Si bien el concepto de *lipid rafts* resulta todavía controversial dentro de la comunidad científica, ha sido demostrado que proteínas palmitoiladas particionan en dominios ricos en colesterol e insolubles en detergente [31]. De esta manera, la S-acilación podría actuar como una señal de segregación a dichos dominios e influir en la movilidad lateral de las proteínas modificadas.

Además del rol en la localización subcelular, como consecuencia del incremento en la asociación a membranas, la palmitoilación tiene una función en el tipo de transporte de las proteínas. El modelo de trampa cinética permitió postular la hipótesis de que las proteínas, una vez palmitoiladas en la cara citoplasmática de la membrana que posee la enzima acil-transferasa, tienen la hidrofobicidad suficiente como para ser incorporadas a vesículas de

transporte y trasladadas a MP. Al ser una modificación reversible, un evento de deacilación les permitiría a estas proteínas “perder” dicha afinidad por las membranas, teniendo la posibilidad de ser transportadas mediante difusión a través del citosol. De esta manera, la proteína deacilada puede encontrar nuevamente la membrana que posee la enzima correspondiente y ser reacilada, generando así lo que se conoce como ciclos de acilación/deacilación [8, 9] (Figura 3). Esto fue demostrado para el caso de las proteínas N- y H-Ras en dos trabajos contemporáneos [32, 33] cuyos detalles se describirán más adelante.

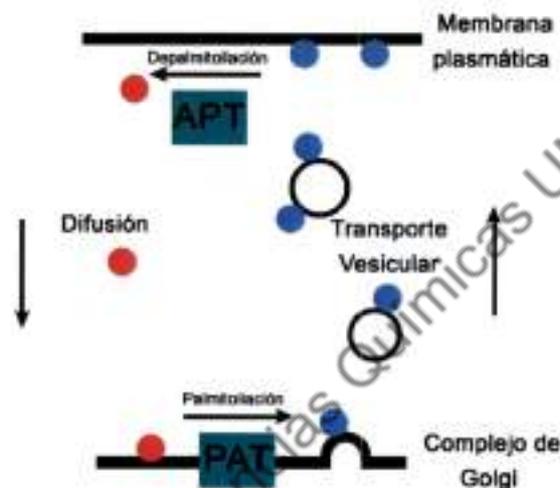


Figura 3. Ciclo de acilación/deacilación de una proteína periférica. La S-acilación de las proteínas periféricas se puede llevar a cabo por palmito-transferasas (PATs) que se encuentran localizadas en membranas de complejo de Golgi, generando un aumento en la hidrofobicidad de las mismas. Las proteínas palmitoiladas (círculos azules) son transportadas hacia membrana plasmática mediante un transporte de tipo vesicular. En dicha membrana podrán ser eventualmente deaciladas (círculos rojos) por acción de las enzimas tioesterasas (APTs). Esto resulta en una pérdida de afinidad por la bicapa lipídica, condición por la cual la proteína puede viajar por difusión hacia el complejo de Golgi en donde podrá ser reacilada, comenzando el ciclo nuevamente. Por simplicidad sólo se muestra el evento de deacilación ocurriendo a nivel de membrana plasmática.

Como se mencionó anteriormente, para algunas proteínas transmembrana S-aciladas, como la proteína de fusión de membranas (SNARE) de levadura Tlg1 o el receptor de la toxina ántrax TEM8, se reportó la interacción entre la S-acilación y la ubiquitinación. Es así que dicho proceso de ubiquitinación y posterior degradación se ve incrementado cuando la palmitoilación es inhibida o bloqueada [14, 34]. Un reciente análisis *in silico* de la proteína dipalmitoilada calnexina, confirma un efecto de la S-acilación sobre su estabilidad [13]. En el caso de las proteínas periféricas, para la proteína diacilada GAP-43 fue descrito que la proteína depalmitoilada es sustrato para la degradación en proteosomas [35].

A pesar de que los efectos de la palmitoilación resulten diversos, la mayoría de ellos son determinados por dos propiedades particulares del palmitato: la hidrofobicidad o afinidad por membranas celulares, y la preferencia por los dominios ordenados de dichas membranas. Sin embargo, resulta evidente que el efecto y la función de la palmitoilación en las proteínas transmembrana son variados y complejos, y que la palmitoilación es mucho más que un simple mecanismo pasivo de anclaje a membrana, teniendo un rol activo y una relevancia en la función, estabilidad, interacciones y dinámica de las proteínas periféricas.

ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LA S-ACILACIÓN

Acil-transferasas (PATs)

Durante muchos años, y a pesar de que la importancia de la palmitoilación en diversos procesos resultaba conocida, el mecanismo por el que se llevaba a cabo permaneció desconocido. El hecho de que no exista una secuencia de aminoácidos consenso para esta modificación, sumado a la falta de identificación de las enzimas que la catalizaban, contribuyó a la idea de que la S-acilación era un evento espontáneo, autocatalítico o no enzimático. Debido a la alta reactividad del palmitoil-CoA (el sustrato con el que se realizaban los ensayos *in vitro*) y a las concentraciones no fisiológicas empleadas, esta hipótesis fue adoptada por muchos investigadores en el área.

Sin embargo, en el año 1995 Resh y colaboradores caracterizaron la actividad palmitoil transferasa a través de ensayos bioquímicos [36]. En este trabajo descartaron la posibilidad de una acilación no enzimática, y si bien no identificaron a la enzima responsable, los autores describieron su existencia en la fracción de membranas de diversos tejidos de ratón. La enzima con capacidad de acilar el sustrato en los ensayos *in vitro* sería una proteína transmembrana, ya que la palmitoilación ocurre incluso después de diversos tratamientos para remover proteínas periféricas [36].

Actualmente está aceptado que las enzimas PATs (del inglés *Protein Acyltransferases*) son las encargadas de llevar a cabo el proceso de palmitoilación [37, 38]. Las PATs fueron descritas finalmente en 2002 en dos estudios independientes realizados en *Saccharomyces cerevisiae* [39, 40]. El análisis de las enzimas Erf2p y Akr1p reveló un dominio compartido de 51 aminoácidos rico en cisteínas con un motivo DHHC (Asp-His-His-Cys) conservado, siendo este último indispensable para la actividad transferasa, pero no para la selectividad de sustrato. Esto permitió el hallazgo de 7 proteínas en levadura y 24 en mamíferos, todas ellas

conteniendo dicho motivo. Para la mayoría de estas enzimas ha sido demostrado su rol como palmitoiltransferasa, sin embargo, es importante destacar que algunas poseen funciones adicionales independientes de dicho rol [14].

Como se mencionó anteriormente, a diferencia de las prenil- y miristoil-transferasas, las PATs son proteínas transmembrana que contienen entre 4 y 6 dominios transmembrana. Tanto el dominio rico en cisteínas como el motivo DHHC se localizan en uno de los loops citosólicos (**Figura 4**). Estas enzimas se localizan principalmente en RE y complejo de Golgi, aunque han sido encontradas también en MP [14, 41, 42].



Figura 4. Esquema de una PAT. Representación de una enzima DHHC en donde se muestran los 4 o 6 dominios transmembrana y el dominio DHHC-CRD citosólico.

Recientemente, se describió una región conservada en el dominio C-terminal de las PATs de varios organismos eucariotas, la cual es esencial para la función de las transferasas de levadura Swf1 y Pfa3 [43]. Dicha región se conoce como PaCCT por *Palmitoyltransferase Conserved C-Terminus*.

Experimentos realizados utilizando proteínas DHHC purificadas son consistentes con la idea de que la S-acylación llevada a cabo por estas enzimas es un mecanismo de dos pasos, sucediendo primero una autoacilación por parte de la PAT y una subsecuente transferencia del palmitato a la proteína sustrato [44, 45].

Si bien es probable que las PATs sean redundantes en su actividad y compartan ciertos sustratos [38], se conoce que algunas proteínas son selectivamente modificadas por una enzima en particular. Es así que estudios proteómicos realizados en cepas *knockout* para PATs específicas en *Saccharomyces cerevisiae*, dan cuenta de la dependencia de ciertos sustratos para su palmitoilación por una determinada enzima DHHC [46]. Algunas de ellas parecen modificar sólo proteínas solubles, mientras que otras requieren de modificaciones lipídicas adicionales [24]. Otros ejemplos de deleciones de enzimas PAT, con la consecuente

inhibición de la acilación en su sustrato, han sido reportados [14]. Pese a la publicación de algunos trabajos en los cuales se investigan los niveles de palmitoilación y expresión de proteínas en tejidos de ratones *knockout* para ciertas PATs, la información con la que se cuenta para el caso de los mamíferos es aún escasa [14].

Actualmente se conoce poco acerca de la regulación de la actividad y de la/s región/es de las enzimas que dictan la especificidad de sustrato, aunque para algunas PATs han sido caracterizados dominios definidos, necesarios para dicha especificidad. Como los dominios citosólicos N- y C-terminal difieren ampliamente entre una PAT y otra, es probable que en estas regiones estén involucradas en dictar la especificidad en la localización y en sus sustratos. Asimismo, determinadas proteínas podrían contener secuencias que sean requeridas para el reconocimiento por diferentes PATs. Sumado a esto, es posible que ciertas enzimas tengan, a su vez, selectividad por el ácido graso a incorporar [45], dificultando de esta manera el estudio de la reacción.

En los últimos años, el estudio de estas enzimas se ha visto incrementado gracias a que sus mutaciones o ausencia han sido involucradas en diversos fenotipos o procesos patológicos, principalmente como resultado de un desbalance en la palmitoilación [47].

Acil-tioesterasas (APTs)

En contraste con los estudios realizados para caracterizar y describir a las PATs, se conoce mucho menos de las enzimas encargadas del proceso de deacilación o APTs (del inglés *Acyl-Protein Thioesterases*), aun cuando fueron descriptas con anterioridad a las acil-transferasas. Actualmente, los trabajos publicados en el estudio de estas enzimas son escasos, lo que podría deberse a dificultades en las técnicas existentes para investigar el proceso de deacilación. Además, los pocos trabajos de revisión en el área revelan la necesidad de un mayor entendimiento de dicho proceso [48, 49].

La depalmitoilación enzimática de proteínas fue demostrada por primera vez en 1993, en un trabajo en el cual se aisló una proteína de 37 kDa a partir de cerebro bovino y se demostró su actividad tioesterasa *in vitro* utilizando como sustratos palmitoil-CoA y las proteínas aciladas H-Ras y G α [50]. El clonado y análisis de esta proteína PPT1 (por *Palmitoyl-Protein Thioesterase 1*) permitió el reconocimiento de una secuencia característica compartida por otras lipasas, como es el motivo Gly-X-Ser-X-Gly [51]. Sin embargo, en 1996, el mismo grupo caracterizó la localización lisosomal de dicha proteína [52], quedando descartada su

función en la deacilación de proteínas en el citosol, y describiendo su actividad como un proceso previo a la degradación de proteínas en lisosomas.

En 1998, Duncan y Gilman caracterizaron y purificaron una tioesterasa citosólica capaz de remover palmitato de G α y H-Ras, a la que llamaron APT1 (por *Acy-Protein Thioesterase 1*) [53]. El análisis molecular de esta proteína permitió identificarla como una enzima de 25 kDa originalmente descrita como lisofosfolipasa (LYPLA1) [54, 55]. Sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que la K_M de reacción con el enlace tioéster de una proteína acilada era 250 veces menor que el valor observado para el enlace oxiéster cuando se utilizó lisofosfocolina (lyso-PC) como sustrato [53]. Es decir, las proteínas aciladas parecen ser un mejor sustrato que los lisofosfolípidos bajo las condiciones experimentales utilizadas. Esto fue posteriormente confirmado comparando los parámetros cinéticos que surgieron de medir *in vitro* la actividad de APT1 como tioesterasa sobre un péptido sintético derivado de la proteína palmitoilada RGS4, y como lisofosfolipasa utilizando como sustrato lyso-PC [56].

Al igual que PPT1, APT1 posee la secuencia Gly-X-Ser-X-Gly y estudios de mutagénesis y su posterior cristalización permitió incluirla en la extensa familia de las α/β hidrolasas y de las serina hidrolasas, ya que posee una triada catalítica conformada por Ser-Asp-His, característica de estas familias [55, 57, 58]. Las α/β hidrolasas comparten una arquitectura que contiene una estructura central conformada por láminas β paralelas, conectadas por *loops* y rodeadas de hélices α (Figura 5).

Además de deacilar G α y H-Ras, se demostró que APT1 es capaz de depalmitoilar la proteína eNOS (*Nitric-Oxide Synthase*) tanto *in vivo* como *in vitro* [59]. Si bien APT1 es capaz de deacilar sustratos estructuralmente diferentes (G α y eNOS son miristoiladas y palmitoiladas en el N-terminal, y H-Ras es farnesilada y palmitoilada en el C-terminal), muestra cierta selectividad ya que no depalmitoila la proteína integral de membrana caveolina, ni mutantes de eNOS que tienen modificadas la secuencia o el espaciamiento entre las dos cisteínas palmitoiladas [59]. Asimismo, experimentos realizados utilizando las cepas silvestre y *apt1 Δ* en *Saccharomyces cerevisiae*, demostraron que Apt1p (ortólogo de APT1 en levadura) es capaz de deacilar G α pero no H-Ras [60].

Por otra parte, en un trabajo realizado en nuestro laboratorio en 2010, se describió la deacilación de las proteínas dipalmitoiladas GAP-43 y H-Ras en células CHO-K1 [35]. Por estudios de RT-PCR se pudo observar que dicha línea celular no expresa la tioesterasa APT1, y que la sobreexpresión de la misma no producía un aumento en la velocidad de deacilación ni cambios en la localización subcelular de GAP-43 [35]. Esto llevó a la búsqueda de una

segunda tioesterasa responsable de este proceso, permitiendo la descripción de la tioesterasa citosólica APT2.

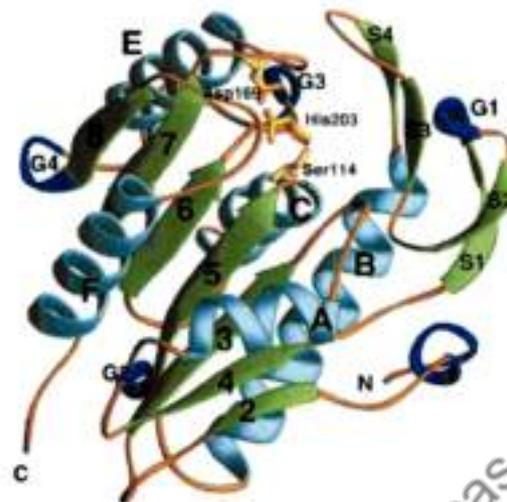


Figura 5. Estructura de APT1 humana. El diagrama presenta los elementos de la estructura secundaria. Siete láminas β (flechas verdes) se presentan numeradas secuencialmente desde la 2 hasta la 8 (la lámina β canónica 1 no se encuentra en esta proteína). Cuatro láminas β cortas e irregulares se denominan S1-S4. Cinco α hélices (en celeste) se encuentran rotuladas desde la A a la E de acuerdo a la estructura de una α/β hidrolasa canónica. Cuatro hélices cortas (en azul) se rotulan desde G1 a G4. La tríada catalítica Ser-114, Asp-169 y His-210 se muestra en amarillo. (Extraído de Devedjiev y colaboradores, 2000).

Al igual que APT1, APT2 fue inicialmente caracterizada como una enzima capaz de hidrolizar lisofosfolípidos y fue denominada lisofosfolipasa II (LYPLA2) [61]. Esta enzima de 25 kDa comparte un 64% de homología con APT1 y posee la secuencia consenso de las esterasas/lipasas Gly-X-Ser-X-Gly.

Apoyando la descripción de APT2 como tioesterasa de proteínas aciladas, en 2011 identificaron a APT1 y APT2 como principales blancos de compuestos derivados de inhibidores originalmente descritos para APT1 [62]. El desarrollo y utilización de dichos inhibidores se discutirá más adelante en este trabajo.

Aunque la evidencia experimental es aún escasa, los datos mencionados acerca de la selectividad de estas enzimas llevan a pensar que ambas tendrían preferencia por diferentes sustratos. En este sentido, estudios realizados *in vitro* utilizando como sustrato a la proteína semisintética N-Ras, demostraron que el número de recambio (k_{cat}) para APT2 es el doble que para APT1 [62] y la velocidad máxima (V_{max}) de la reacción es mayor en el caso de APT2 [63]. A su vez, contrariamente a lo reportado para GAP-43 en donde APT2 parece ser la

enzima responsable de la deacilación de dicha proteína [35], la depalmitoilación de los canales de potasio activados por calcio (BK) parece estar mediada por APT1 y no por APT2 [64].

La localización subcelular de las tioesterasas APT1 y APT2 también resulta controversial. Si bien Duncan y Gilman purificaron APT1 de extractos solubles [53], Wang y colaboradores [65] reportaron su presencia en el RE de células derivadas de la línea celular HeLa, denominadas WISH. A su vez, myc-APT1 mostró una localización mayoritaria en citosol y MP cuando fue transfectada en células embrionarias de riñón humano HEK293, con escasa localización en RE, aunque la proteína endógena en dichas células es principalmente citosólica [56]. Por otra parte, las tioesterasas fusionadas a variantes espectrales de la proteína fluorescente verde (GFP), poseen una localización citoplasmática tanto en células CHO-K1 como en células HeLa [35]. Recientemente se publicaron dos trabajos independientes que demuestran que tanto APT1 como APT2 son proteínas palmitoiladas en Cys2, y que dicha modificación es responsable por la afinidad y localización en MP o Golgi de dichas enzimas en células HEK293T, astrocitos y MDCK [66, 67]. Si bien este dato había surgido a partir de un estudio proteómico realizado en 2010 [68], fueron evidencias bioquímicas y estudios por técnicas de microscopía los que permitieron que resurja la discusión acerca de la localización subcelular de las tioesterasas. Además, utilizando inhibidores de las APTs, shRNAs específicos para ambas proteínas, o mutando el sitio catalítico de APT1 y APT2, se demostró que estas enzimas catalizan su propia deacilación [66, 67].

Como estos estudios demuestran ciertas contradicciones en el área, es necesario seguir investigando para dar una respuesta a los interrogantes que surgen con respecto a las tioesterasas y sus actividades. Uno de los datos más interesantes sería conocer el mecanismo mediante el cual estas enzimas interaccionan con sus sustratos y si dicha interacción es específica. La acetilación y su consecuencia en la localización subcelular de las APTs también abre el panorama para nuevas preguntas, como por ejemplo si dicha palmitoilación es necesaria para la actividad de las enzimas o si ésta modificación es específica del tipo celular empleado. En este sentido, la comparación de las APTs entre distintas especies, demuestra que la cisteína descrita como palmitoilada no está absolutamente conservada [69]. Este hecho indicaría que esta modificación no es indispensable para que las tioesterasas sean funcionales. A favor de esto, los primeros estudios realizados con APTs recombinantes demostraron actividad de las enzimas *in vitro*, siendo que las mismas eran purificadas a partir de bacterias, organismos que, al igual que todos los procariotas, no llevan a cabo este tipo de

lipidación. A su vez, Vartak y colaboradores [67] proponen un modelo en el cual las APTs deaciladas y citosólicas son las encargadas de llevar a cabo la depalmitoilación de proteínas en membranas celulares, favoreciendo su localización en MP y eliminándolas de endomembranas para impedir una distribución no específica. Mientras tanto la fracción acilada y localizada en Golgi, así también como la capacidad de “autodepalmitoilarse” de las APTs, funcionaría de tal manera de controlar la cantidad y mantener un balance de las proteínas aciladas en membranas de esta organela [67].

En el caso de que las tioesterasas sean citosólicas, la pregunta a responder es de qué manera interactúan de forma transiente con membranas celulares para ser capaces de deacilar sustratos asociados a éstas. En nuestra experiencia, y de acuerdo con la hipótesis de las dos señales [29], el efecto de un solo palmítico sobre la hidrofobicidad de la proteína modificada no es suficiente como para anclar dicha proteína a MP [35, 70]. Resulta evidente que es necesario profundizar los estudios para obtener más información respecto a los temas mencionados, lo que será de gran valor para el estudio de las APTs en particular y del proceso de S-acilación en general.

Por otra parte, búsquedas bioinformáticas de homólogos de APT1 revelaron la existencia de una enzima que comparte un 31% de identidad y que se denomina APT1-like (APT1L, también conocida como LYPLAL1). La sobreexpresión de esta enzima llevó a un aumento de la deacilación de los canales de potasio BK en células HEK293, demostrando su actividad tioesterasa [64]. Sin embargo, la cristalización de APT1L demostró que si bien pertenece a la familia de las α/β hidrolasas, el sitio activo de esta enzima es poco profundo, con lo cual no sería capaz de acomodar un ácido graso de cadena larga [71]. De acuerdo con esto, APT1L no es capaz de deacilar N-Ras semisintética *in vitro*, en condiciones en las que APT1 y APT2 sí muestran actividad tioesterasa [63]. Nuevos estudios acerca del rol de esta enzima son necesarios con el fin de aclarar estos resultados contradictorios.

Finalmente, en un trabajo reciente se demostró la existencia de una nueva tioesterasa de proteínas aciladas perteneciente a la familia de las α/β hidrolasas, aunque no directamente relacionada con las APTs anteriormente descritas [12]. Indicios de la existencia de otras tioesterasas habían surgido a partir de un trabajo en el que observaron los efectos del inhibidor descrito para APTs y de otro más general de serina hidrolasas, sobre la deacilación de R7BP (*RGS binding protein*), efecto que no se observó mediante la depleción parcial (*knockdown*) de APT1 y APT2 (separadas o en conjunto) ni utilizando inhibidores específicos de cada isoforma [72].

La enzima ABHD17 fue identificada como blanco del inhibidor de APT1 y APT2, demostrando su baja especificidad, contrariamente a lo que había sido reportado [62]. Mediante el *knockdown* de las APTs en células COS-7 se observó el bloqueo de la depalmitoilación de la proteína Huntingtin, pero no de PSD95 ni de N-Ras, lo cual también es contrario a experimentos de deacilación *in vitro* utilizando APT1 y APT2 recombinantes para depalmitoilar N-Ras semisintética [62, 63, 73]. Asimismo, el *knockdown* y la inhibición específica de APT1 o APT2 recientemente demostraron no tener un efecto sobre la depalmitoilación de N-Ras en células de melanoma [74]. Subsecuentes estudios bioquímicos demostraron que ABHD17, que es una proteína palmitoilada y se localiza en MP, es capaz de deacilar ambas proteínas (N-Ras y PSD95) [12], abriendo un panorama hacia el descubrimiento de nuevas tioesterasas. Más recientemente, la familia de enzimas ABHD17 (ABHD17A, 17B y 17C) fueron confirmadas como las enzimas que deacilan PSD95 en neuronas [75].

La cantidad desproporcionadamente menor de APTs con respecto a las PATs remite a la disparidad existente entre las fosfatasas (<100) y las quinasas (>500) en células humanas, sugiriendo que las APTs pueden funcionar como enzimas que depalmitoilan un gran rango de sustratos, mientras que las PATs serían las encargadas de la especificidad en la reacción de palmitoilación. En este sentido, fue demostrado que la maquinaria de palmitoilación es más limitada en cuanto al procesamiento de sustratos que las enzimas tioesterasas [63]. Alternativamente, dicha disparidad podría reflejar el hecho de que sólo un número limitado de proteínas llevan a cabo el recambio de palmitato. Por otro lado, también es posible que existan muchas más tioesterasas, cuya identificación está todavía pendiente [47].

METODOLOGÍAS PARA ESTUDIAR LA S-ACILACIÓN

Una de las mayores limitaciones en el estudio de la S-acilación es la escasa cantidad de técnicas disponibles para su investigación, incluso cuando se la compara con otras modificaciones postraduccionales. En este sentido, resulta fundamental el desarrollo de nuevas herramientas para la comprensión y manipulación de la palmitoilación, lo cual permitirá conocer y entender las funciones y regulación de este proceso.

Por lo general, el estudio de la palmitoilación se puede abordar desde tres enfoques diferentes [76] que se desarrollarán a continuación:

- la detección de la proteína palmitoilada
- la alteración del estado de palmitoilación de la proteína

- el estudio de las consecuencias de dichas alteraciones sobre la función, localización y transporte de la proteína

Detección de proteínas palmitoiladas

Los procedimientos para la detección de proteínas palmitoiladas se pueden dividir en dos grupos, según estén centradas en el palmitato o centradas en la cisteína modificada [14, 77]. Dentro de las primeras se puede mencionar la marcación metabólica con palmitatos modificados. A su vez, técnicas centradas en la cisteína y el reemplazo del palmitato han surgido en los últimos años.

En esta sección se abarcarán dichos procedimientos, utilizados para el estudio y la detección de la S-acilación, así también como las ventajas y desventajas de cada uno de ellos.

- **Marcación metabólica**

La marcación de proteínas palmitoiladas con [^3H]palmitato es una de las técnicas más tradicionales para el estudio de esta modificación. La misma consiste en exponer los cultivos celulares que expresan la proteína en estudio a determinadas dosis del ácido graso radioactivo. El tiempo de incubación generalmente dependerá del tiempo de recambio de palmítico que tenga la proteína de interés. Como el [^3H]palmitato es prácticamente idéntico al ácido palmítico natural, las proteínas palmitoiladas lo incorporan, pudiéndose después proceder con una inmunoprecipitación y posterior autoradiografía para su detección. Además, para estudiar el proceso dinámico de la S-acilación se puede realizar un experimento de *pulse-chase*, en el cual, luego de la incubación con [^3H]palmitato, se cambia el medio de cultivo por uno que contenga palmitato no radioactivo. Este procedimiento permite, por lo tanto, realizar curvas de tiempo y estudiar la cinética de los ciclos de acilación/deacilación. En consecuencia, las principales ventajas de esta metodología son la posibilidad de monitorear la palmitoilación en células vivas, la determinación de la modificación de proteínas específicas y la capacidad de estudio de la dinámica del proceso a través de experimentos de *pulse-chase* [78].

A pesar de ser un método eficaz, la marcación metabólica con radioactivos posee una serie de desventajas, algunas de las cuales están directamente relacionadas con la naturaleza de este tipo de reactivos. Es así que al realizar estos experimentos se debe trabajar teniendo en cuenta las precauciones pertinentes para hacerlo de manera segura. Además, como el tritio emite una radiación débil, los tiempos de exposición pueden durar de semanas a meses. Con

respecto a esto, algunos trabajos emplean el análogo ω [^{125}I]palmitato, que tiene la ventaja de que las radiaciones γ son más potentes, requiriendo tiempos de exposición considerablemente menores, aunque se necesitan precauciones adicionales en la manipulación de este radioactivo [76].

Otra desventaja en la utilización de esta metodología recae en la dependencia de la misma con la capacidad de incorporación del reactivo por parte de las proteínas, la cual puede llegar a ser ineficiente o baja si las mismas están establemente palmitoiladas, es decir, si el recambio de palmítico es lento [78]. Este hecho quedó evidenciado en un trabajo reciente en el cual la proteína transmembrana calnexina presentaba una cinética de recambio que no concordaba con lo medido a través de otras metodologías, ya que al estar establemente palmitoilada, la fracción de proteína que estaba siendo analizada mediante la marcación metabólica era insignificante, no siendo representativo de lo que había sido previsto para dicha proteína [13]. Además, en proteínas que poseen más de una cisteína S-acilable, la distinta cinética de depalmitoilación de cada una de ellas podría dificultar el análisis.

Por último, el hecho de utilizar concentraciones fisiológicas del ácido graso para realizar la marcación, podría llegar a tener efectos negativos en las células, además de mostrar resultados que no sean representativos de lo que realmente sucede en condiciones normales.

Recientemente, se desarrolló un método de marcación metabólica sin la utilización de radioactivos, basada en lo que se conoce como *click chemistry* o reacción de ligación bioortogonal [3, 11, 17, 79]. Dichas reacciones consisten en una marcación en dos pasos utilizando un reportero unido a una azida o alquino y la posterior detección del mismo, lo que permite analizar o modificar distintas clases de moléculas biológicas, en este caso en particular, un ácido palmítico. El hecho de que las azidas y alquinos son relativamente pequeños, no polares y estables, permite que sean incorporados en metabolitos o drogas con una perturbación mínima de su estructura, reteniendo su actividad biológica [79].

Brevemente, para llevar a cabo esta metodología, las células son incubadas con el análogo de ácido graso con un ω -acetileno conocido como 17-ODYA (*17-octadecynoic acid*), el cual es incorporado a las proteínas por una enzima PAT, y posteriormente son lisadas. Dichos lisados celulares, mediante un mecanismo catalizado por Cu(I), pueden reaccionar con un reportero modificado con un grupo azida, que se une covalentemente al alquino generando un triazol, produciéndose así la reacción de *click chemistry* [80]. Esta reacción se denomina CuAAC (por *Cu-catalyzed alkyne azide cycloaddition*). La azida puede estar acoplada, a

su vez, a un fluoróforo o a biotina, para realizar experimentos por fluorescencia *in gel* o precipitación e inmunoblot, respectivamente (Figura 6).

Al igual que para otras técnicas de marcación metabólica, la principal desventaja de *click chemistry* es su dependencia por la afinidad y disponibilidad de las proteínas para la incorporación de 17-ODYA.

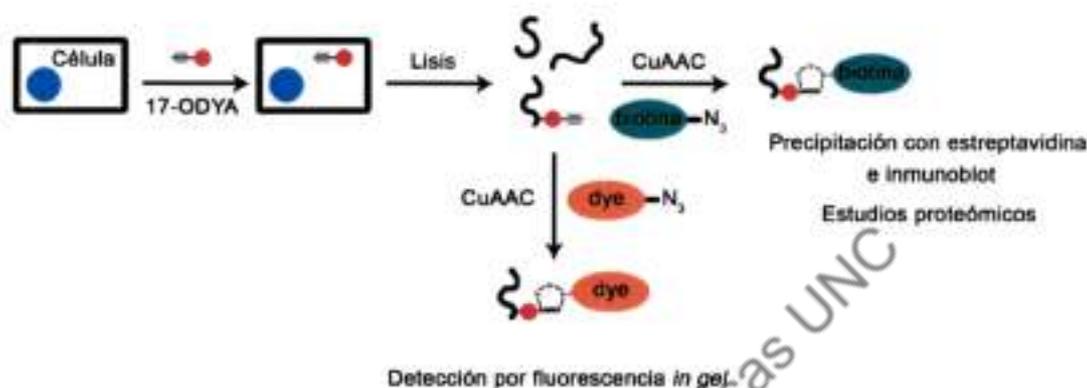


Figura 6. Representación esquemática de la metodología de *click chemistry*. Las células son incubadas con el análogo de palmitato 17-ODYA y posteriormente lisadas. Las proteínas S-aciladas que incorporaron dicho ácido graso podrán reaccionar con una azida acoplada a biotina o a un fluoróforo, para posteriormente proceder al análisis por inmunoblot o fluorescencia *in gel* respectivamente.

- **ABE (*Acyl-Biotin Exchange*) y Acyl-RAC (*Resin-Assisted Capture*)**

Como se mencionó anteriormente, otras metodologías para estudiar el proceso de S-acilación se basan en el intercambio del acilo unido de manera lábil a la cisteína, por otro grupo cuya unión tenga mayor estabilidad y sea detectable.

El ensayo de acyl-biotin exchange o ABE (Figura 7), consiste en una secuencia de reacciones químicas: el bloqueo de los tioles libres con N-etilmaleimida (NEM), el tratamiento con hidroxilamina para liberar los palmitatos unidos a través del enlace tioéster y la biotinilación de los tioles de las cisteínas antes palmitoiladas [81]. Dicha metodología permitió la realización del primer estudio a gran escala de proteínas palmitoiladas en levaduras [46].

No obstante, este protocolo posee las desventajas de que, además de necesitar muchos pasos de purificación y de requerir grandes cantidades de proteína, puede dar lugar a falsos positivos. Los mismos se pueden deber a un inefficiente bloqueo de las cisteínas libres o a una biotinilación inespecífica [81].

Basándose en el mismo principio que el ensayo de ABE, se describió lo que se conoce como acyl-RAC (por *Resin-Assisted Capture*) [77], en donde se reemplaza el uso de la biotinylación y posterior precipitación por una conjugación directa a una resina que reacciona con los tioles libres. Este hecho hace que acyl-RAC tenga ciertas ventajas sobre ABE, ya que requiere de una menor cantidad de pasos, lo cual simplifica el experimento en tiempo y costos, además de eliminar el enriquecimiento no específico en proteínas endógenamente biotinyladas. Sin embargo, las desventajas derivadas de los falsos positivos y de la incapacidad de determinar la naturaleza del grupo acilo previamente unido, son comunes a ambos métodos.

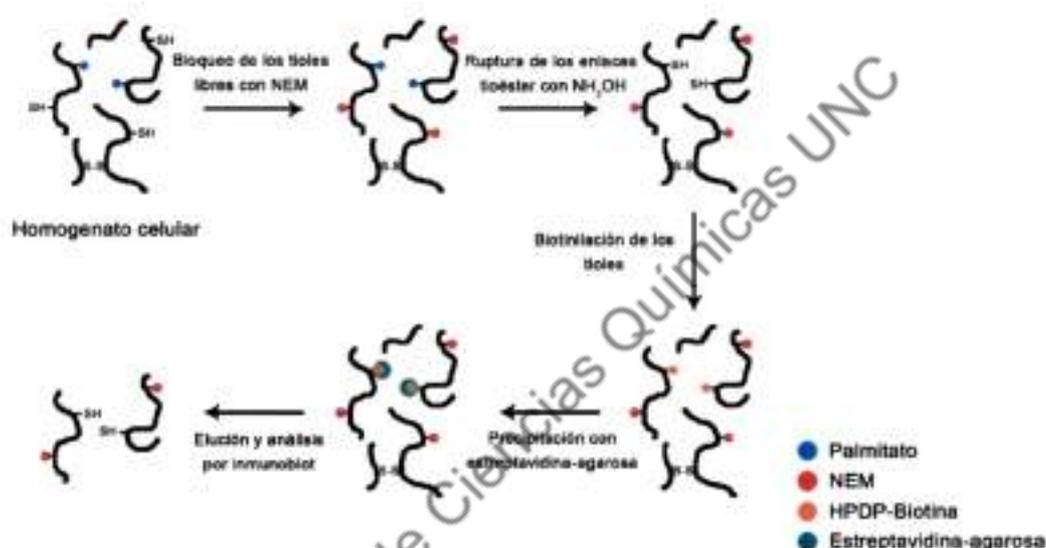


Figura 7. Representación esquemática de la metodología de ABE. Homogenatos celulares son incubados con N-etilmaleimida para bloquear los grupos tioles de las cisteínas libres. Posteriormente se incuban con hidroxilamina (NH_2OH) la cual produce la ruptura de los enlaces tioéster que unían a la proteína acilada con el palmitato. Estos tioles libres podrán ahora reaccionar con HPDP-Biotina y luego se producirá la precipitación de las proteínas biotinyladas por incubación con estreptavidina-agarosa. Las muestras obtenidas pueden ser entonces eluidas para su análisis por inmunoblot o utilizadas para estudios proteómicos.

Una variante de estos procesos es la que luego de la ruptura de los enlaces tioéster con hidroxilamina los tioles libres generados reaccionan con polietilenglicol (PEG) permite estudiar la cantidad de cisteínas palmitoiladas en una proteína, debido al cambio en el peso molecular observado en Western blot.

Alteración del estado de palmitoilación

De acuerdo con el segundo enfoque mencionado para estudiar la S-acilación, la investigación de los cambios en el estado de palmitoilación de las proteínas se lleva a cabo a

través de distintas técnicas que abarcan desde la sobreexpresión y/o silenciamiento de las enzimas que llevan a cabo dicha modificación y técnicas de mutagénesis de las cisteínas involucradas, hasta el desarrollo de inhibidores para los ciclos de acilación/deacilación.

Existen numerosos trabajos que ejemplifican cada uno de estos procedimientos, los cuales combinados con las técnicas anteriormente mencionadas generan información valiosa en el campo de la S-acilación.

La manipulación farmacológica de esta modificación, a pesar de haber avanzado en los últimos tiempos, sigue siendo limitada en cuanto a la disponibilidad de inhibidores específicos tanto de la acilación como de la deacilación, lo cual representa un obstáculo importante en la investigación de la palmitoilación.

Esta sección abarcará, principalmente, el resumen y descripción de inhibidores de las enzimas involucradas en esta modificación.

• Inhibidores de las PATs

Tres de los cuatro inhibidores descritos para la S-acilación poseen semejanzas estructurales con lípidos (**Figura 8**).

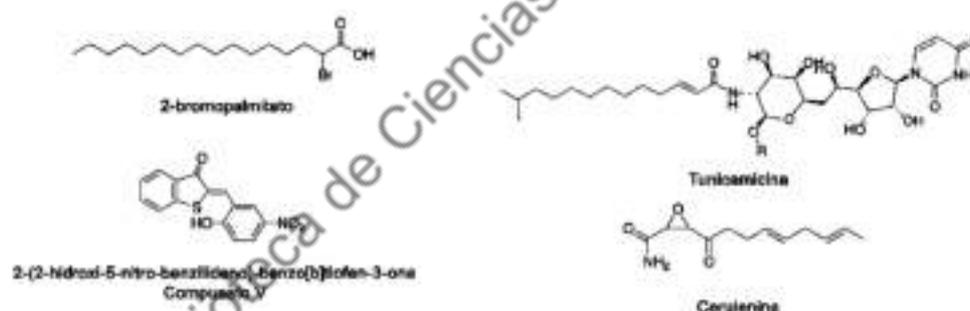


Figura 8. Estructura química de los inhibidores de la palmitoilación. (Modificado de Hang y colaboradores, 2011).

Actualmente, el inhibidor de la palmitoilación más utilizado es el análogo no metabolizable del palmitato 2-bromopalmitato (2-BP). Sin embargo, fue demostrado que 2-BP es un inhibidor de enzimas de membrana [82] al inhibir proteínas involucradas en la síntesis lipídica, además de otras enzimas cuyos sustratos no comparten características estructurales con dicho compuesto. En el trabajo citado proponen que el 2-BP se insertaría en las membranas celulares, teniendo acceso a las proteínas transmembrana y uniéndose covalentemente a ellas de tal manera que la inhibición descrita es no específica. A través de

la incubación de extractos de hígado de rata con [14 C]2-BP y posterior SDS-PAGE, se demostró la promiscuidad de este inhibidor [82].

A pesar de ello, a partir de la publicación en 2000 de un trabajo en el que se inhibió la palmitoilación de la quinasa Fyn usando 2-BP [83], se lo comenzó a utilizar con este fin. En trabajos posteriores, incluso se lo describió como inhibidor específico de la S-acilación, extrayendo conclusiones acerca de la importancia de la palmitoilación en distintos procesos celulares y diferentes fenotipos inducidos por la utilización del 2-BP [84].

En el trabajo de Webb y colaboradores [83] se estudió además la asociación a membranas y localización en *lipid rafts* de la quinasa Fyn y las consecuencias en procesos de señalización de las células T en presencia de 2-BP, postulando dos mecanismos distintos de acción del inhibidor. En el primero, el 2-BP se une a las PATs pero por impedimentos estéricos por parte del bromo, no puede ser transferido a la proteína aceptora. Otro mecanismo posible implicaría que 2-BP sea transferido a la proteína sustrato, pero la hidrofiliidad del mismo le impida a dicha proteína asociarse a membranas [83]. Las consecuencias funcionales de cada uno de estos mecanismos son muy diferentes entre sí, ya que en el primer caso las proteínas quedarían no palmitoiladas, mientras que en el segundo serían irreversiblemente alquiladas [85]. De esta manera, 2-BP podría bloquear la incorporación de [3 H]palmitato a proteínas palmitoiladas, lo que sugeriría una reducción en la S-acilación, pero en realidad podría reportar una alquilación por parte del inhibidor en el sitio de la modificación.

Para 2-BP fue demostrado *in vitro* una inhibición irreversible utilizando enzimas DHHC purificadas y distintos sustratos proteicos [86]. Además, este trabajo evidenció la inespecificidad de acción de dicho inhibidor, ya que fue capaz de reducir la palmitoilación de proteínas miristoiladas y farnesiladas, la cual es llevada a cabo por distintas transferasas. Sin embargo, 2-BP demostró ser el mejor inhibidor de la palmitoilación (con menor IC₅₀) cuando se lo comparó con otro compuesto, conocido como Compuesto V (**Figura 8**), para el cual había sido reportada una inhibición de la palmitoilación sustrato-selectiva.

Recientemente se sintetizó y caracterizó un compuesto basado en 2-BP, que combina a dicho inhibidor con la metodología de *click chemistry*, para utilizarlo en experimentos de ABPP o *Activity-Based Protein Profiling* [84, 85]. De esta manera se pudo observar que 2-BP se une de manera irreversible, y probablemente por un enlace tioéter, tanto a enzimas DHHC como a proteínas palmitoiladas, sugiriendo que el mismo puede ser incorporado al conjunto de lípidos de la célula y utilizado como sustrato donador en la reacción de S-acilación [85].

Contrario a esto, la proteína S-acilada H-Ras no fue detectada como sustrato del inhibidor [84], sugiriendo en este caso que 2-BP se uniría a algunas proteínas S-aciladas por un proceso no enzimático. Además, se demostró que este inhibidor se une a algunas PATs, pero dicha unión se reduce cuando la enzima se encuentra en su forma inactiva o DHHS, demostrando la utilidad de este compuesto en experimentos de ABPP. Incluso se demostró que 2-BP es convertido a 2-BP-CoA en las células HEK293T [84], teniendo como sustratos las mismas proteínas pero siendo 2-BP-CoA más reactivo. Sin embargo, y debido a esta alta reactividad, proteínas no palmitoiladas también fueron identificadas como blanco del 2-BP. De hecho aproximadamente 450 proteínas han sido anotadas en un estudio por espectrometría de masa [84], dentro de los cuales se reconocieron las PATs DHHC5, DHHC6, DHHC7, DHHC17 y DHHC20, pero DHHC1, DHHC8 y DHHC23 no fueron incluidas, incluso luego de su sobreexpresión.

Otros inhibidores de la palmitoilación, cuya estructura es similar a lípidos, son cerulenina y tunicamicina [76, 78]. Cerulenina, un antibiótico de origen natural, inhibe la síntesis de ácidos grasos y se cree que inhibe la palmitoilación por alquilación de las PATs. Sin embargo, el mecanismo responsable de la inhibición es desconocido, pudiendo este compuesto reaccionar con tioles tanto en la enzima transferasa como en la proteína sustrato. A diferencia del 2-BP, un derivado de cerulenina que puede ser utilizado como sonda en experimentos de *click chemistry*, demostró que se puede unir tanto a las enzimas DHHC como a las mutantes inactivas DHHS, por lo cual el mismo reaccionaría con otro sitio de la PAT y no sería posible su utilización en ABPP [87]. Otra diferencia es que cerulenina fue capaz de unirse a las 23 PATs humanas, con lo cual podría ser utilizado como marcador para esta familia de enzimas. Sin embargo, por espectrometría de masa se observó que dicho compuesto se une a >200 proteínas, presentando el mismo impedimento que los otros inhibidores conocidos con respecto a la especificidad. Por otro lado, y debido a la similitud estructural entre tunicamicina y palmitoil-CoA, este compuesto, que es más conocido por su rol en la inhibición de la N-glicosilación de proteínas, fue utilizado en algunos trabajos para inhibir la palmitoilación [76, 78].

A partir de estos ejemplos, resulta evidente la escasa cantidad de inhibidores de la palmitoilación disponibles, y la importante limitación con la que se trabaja cuando se tiene en cuenta la baja especificidad de los compuestos mencionados. Es notorio también que para los inhibidores descritos se desconoce su acción directa sobre las PATs, ya que los mismos son caracterizados en base a la inhibición de la palmitoilación a través de procesos no

descriptos. Una mayor investigación en el área es indispensable para el desarrollo de inhibidores que sean tanto específicos como selectivos de las distintas PATs, lo cual a su vez se ve restringido por el desconocimiento de los mecanismos operantes en este proceso y por la cantidad y variedad de enzimas DHHC, de las cuales la información con la que se cuenta es también limitada.

Recientemente, en un estudio realizado utilizando una extensa librería de compuestos, se identificaron inhibidores capaces de reducir o eliminar la actividad de la PAT de levaduras *Erf2 in vitro* [88]. Dichos compuestos podrían servir como base para el desarrollo de futuros inhibidores de la S-acilación.

• Inhibidores de las APTs

En el caso de las enzimas tioesterasas, el conocimiento de la estructura de APT1 [58] y el hecho de conocer el mecanismo catalítico por el cual la serina del sitio activo realiza el ataque nucleofílico sobre su sustrato, facilitó la síntesis de compuestos variados con la potencialidad de inhibir a estas enzimas (Figura 9).

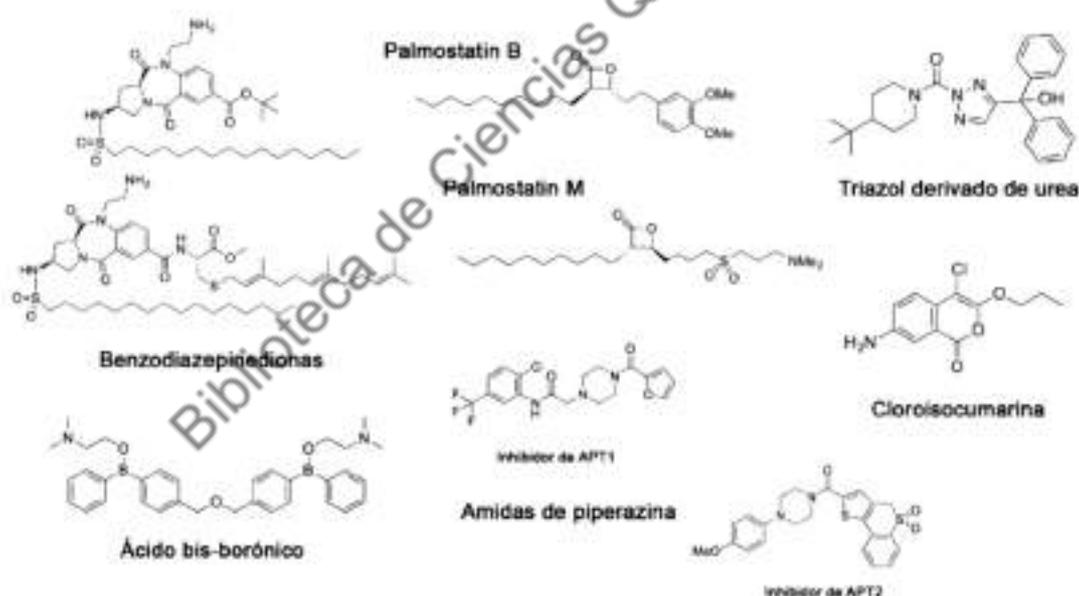


Figura 9. Estructura química de los inhibidores de las APTs. (Modificado de Davda y colaboradores, 2014).

Un estudio pionero en la obtención de inhibidores de la depalmitoilación fue publicado en 2005 [89]. En el mismo sintetizaron un péptido que mimetiza estructuralmente una benzodiazepinediona fusionada al extremo C-terminal de H-Ras, imitando el intermediario

tetraédrico formado por la serina hidrolasa y el tioéster. Células incubadas con este inhibidor mostraron una deslocalización de N-Ras y una pérdida de dicha proteína en MP, demostrando la acción de las APTs sobre la localización dinámica de las proteínas Ras.

Más adelante, en 2010, se caracterizó a **Palmostatin B**, una β -lactona sintetizada en base a la similitud de APT1 con una lipasa gástrica, lo cual permitió la búsqueda de compuestos con potencial acción inhibidora. Dicho compuesto se une reversiblemente a la serina del sitio activo y tiene un efecto sobre la depalmitoilación de Ras [90]. La incubación de células MDCK con Palmostatin B, generó una redistribución inespecífica a endomembranas de N-Ras en dichas células, además de alterar la morfología de células transformadas con H-Ras oncogénica. Por otra parte, el tratamiento con Palmostatin B impidió el crecimiento de células hematopoyéticas que expresan N-Ras oncogénica pero no la variante no palmitoilada K-Ras [91], demostrando la importancia de la palmitoilación dinámica de proteínas en estos procesos.

Posteriormente, se sintetizó otra β -lactona diseñada en base a la similitud a sustratos de APT1. Este inhibidor, denominado Palmostatin M, fue caracterizado tanto *in vitro* como en células, demostrando efectos sobre la depalmitoilación de H- y N-Ras [92]. A pesar de ser más activo que Palmostatin B, es este último el más utilizado en la bibliografía.

Si bien Palmostatin B y M fueron diseñados como inhibidores de APT1, un trabajo posterior llevado a cabo por el mismo grupo demostró que dichos compuestos son capaces de unirse no sólo a APT1 sino también a su homóloga APT2 [62]. A pesar de que en este trabajo no se detecta ningún otro blanco de las β -lactonas relacionado con H-Ras, una publicación reciente da cuenta de que Palmostatin B podría unirse a otras serina hidrolasas y, a través de esta aproximación, describe una nueva familia de posibles tioesterasas [12].

En 2012 se reportaron los primeros inhibidores de APTs que son selectivos para cada isoenzima [93], y que son aproximadamente diez veces más activos inhibiendo preferentemente APT2 [73], la cual había mostrado deacilar más eficientemente a N-Ras [62]. En este trabajo se identifican derivados de ácidos borónicos y borínicos como nuevos tipos de compuestos con capacidad de inhibir competitivamente las tioesterasas, sin resultar tóxicos. Estos compuestos, que fueron identificados a partir de una extensa librería, poseen ciertas ventajas respecto a los descriptos anteriormente, ya que su mecanismo de unión a proteínas (en particular a serina hidrolasas) es conocido y agentes terapéuticos basados en boro han sido anteriormente establecidos y reportados [73].

Asimismo, se comprobó la capacidad de inhibición de APT1 y 2 utilizando una librería de 315004 compuestos, con el fin de identificar inhibidores selectivos con nuevos grupos químicos asociados, describiendo un grupo de amidas de piperazina [93]. En este trabajo se demostró además la capacidad de inhibición de los compuestos seleccionados en pruebas *in vivo* realizadas en ratones. En general, dichas amidas de piperazina demostraron ser selectivas de la isoforma APT1 o APT2 [69, 93]. Recientemente estos compuestos denominados ML348 y ML349 respectivamente, fueron evaluados para observar los efectos de la depalmitoilación de N-Ras en células de melanoma [74].

Otros compuestos químicos con capacidad de inhibir a las serina hidrolasas son los triazoles derivados de urea [69, 94], los cuales pueden ser derivatizados para inhibir selectivamente proteínas individuales pertenecientes a esta familia. Por otro lado, compuestos derivados de cloroisocumarinas han sido reportados como inhibidores de serina hidrolasas, y, en particular, del ortólogo de APT1 en *Toxoplasma gondii*, teniendo efectos sobre la invasión de dicho parásito [69, 95].

Como se mencionó anteriormente, el conocimiento del mecanismo mediante el cual actúan las serina hidrolasas facilita la síntesis de compuestos con capacidad de unirse al sitio activo de estas enzimas e inhibir su actividad. Este es el caso de los compuestos ejemplificados, que además permitieron avances en el entendimiento y en las metodologías empleadas para el estudio de la S-acilación. Sin duda, el objetivo principal actualmente recae en mejorar la especificidad de los inhibidores y en lograr obtener compuestos selectivos para las isoformas APT1 y APT2, para lo cual ya existen antecedentes promisorios [93].

• Mutagénesis sitio-dirigida

El experimento más común y directo para evitar la palmitoilación de una proteína es el reemplazo de la cisteína en la que se produce la modificación (generalmente por una serina o alanina) a través de experimentos de mutagénesis sitio-dirigida. De esta manera, las células son transfectadas con la construcción mutante o con la proteína silvestre, y la palmitoilación se estudia mediante las técnicas anteriormente mencionadas.

La principal desventaja de esta metodología es el hecho de que ciertas propiedades o funciones de la proteína en estudio (como por ejemplo la estabilidad) pueden verse afectadas por la pérdida de la cisteína *per se* y no por la pérdida del palmitico. Además, en este tipo de experimentos, hay que tener en cuenta que se trabaja en condiciones de sobreexpresión, por lo que no se mide directamente la palmitoilación de la proteína endógena.

- **Sobreexpresión y silenciamiento de PATs y APTs**

Otra metodología ampliamente utilizada y que permite una alteración en los niveles de acilación o deacilación de una determinada proteína en la célula, es la sobreexpresión (mediante transfección con los constructos específicos) o el silenciamiento (por siRNA) de las enzimas PATs o de las APTs, según el proceso que se quiera estudiar. Nuevamente, la evaluación de los efectos que dichos experimentos tengan sobre la palmitoilación de la proteína en estudio, se realiza mediante alguna de las técnicas explicadas anteriormente.

Al igual que para cualquier experimento en los que se modifique la cantidad expresada de una enzima, no es absolutamente directo el análisis de los efectos que dicha sobreexpresión pudiera tener. El hecho de no observar un cambio sobre el proceso en estudio, no implica que la enzima afectada no participe de dicho proceso, ya que los niveles endógenos pueden ser saturantes, en el caso de un experimento de sobreexpresión, o los niveles de expresión remanentes pueden ser suficientes para llevar a cabo su actividad, en el caso de experimentos de silenciamiento. Adicionalmente, el *knockdown* de las PATs podría no tener efecto debido a que las funciones y sustratos de las mismas podrían ser redundantes. Por otro lado, como se mencionó anteriormente para el caso de las APTs, existe además la dificultad de que probablemente existan otras enzimas tioesterasas no descritas hasta el momento, y que pudieran estar ejerciendo su actividad, con lo cual no sería posible ver un efecto con este tipo de metodología.

Por último, en nuestro laboratorio fue demostrado que para poder estudiar la deacilación mediada por la sobreexpresión de APT1 y APT2 de GAP-43 y H-Ras en células CHO-K1, es necesario inhibir el proceso de acilación [35], indicando que el balance de las actividades de acilación y deacilación en un contexto celular en particular, es importante para estudiar un efecto derivado de una alteración en los niveles de palmitoilación. Esto podría variar según el tipo celular empleado ya que células HeLa, MEFs y NIH3T3 que sobreexpresan APT1 fueron capaces de incorporar [³H]palmitato en H-Ras en distintos niveles, aunque siempre en menor proporción que las células sin la sobreexpresión de la tioesterasa [96]. Asimismo, la sobreexpresión de DHHC9/GCP16, la PAT que acila H-Ras, llevó a una mayor incorporación de radioactivo en dicha proteína en niveles variables según la célula estudiada [96]. Por otra parte, la sobreexpresión de la potencial tioesterasa ABHD17 produjo una disminución de la incorporación de 17-ODYA en N-Ras, además de una perturbación en la localización subcelular de dicha proteína en estado estacionario [12]. Como en estos dos últimos casos no fue necesario inhibir un proceso para estudiar el

contrario, lo antes discutido podría deberse no sólo al tipo celular empleado, sino también a la metodología utilizada para evaluar la S-acilación.

Estudio de las consecuencias de alteraciones en la S-acilación

El tercer enfoque utilizado para el estudio de la S-acilación consiste en determinar las consecuencias de modificaciones en los niveles de palmitoilación sobre distintas propiedades de la proteína en estudio, como su función, localización, transporte, etc. El efecto a evaluar dependerá de la proteína acilada que se esté caracterizando.

- **Asociación a membranas**

Uno de los experimentos que se puede realizar para evaluar si la palmitoilación de una proteína afecta su afinidad por membranas biológicas, es la generación mediante ultracentrifugación de fracciones de membranas y citosólicas de lisados celulares, a partir de células que expresan las proteínas en las condiciones a evaluar [96]. Ejemplos de la utilización de esta metodología en el campo de la acilación son numerosos. En algunos casos se puede proceder además a una partición en detergente para evaluar la hidrofobicidad de la proteína acilada vs. la proteína deacilada [35, 70, 97].

Adicionalmente, existen estudios que permiten determinar la asociación de la proteína palmitoilada y no palmitoilada a distintos microdominios de membrana [2, 96, 98]. Esto se puede lograr a través de métodos específicos que consisten en el tratamiento de las células con detergentes para el estudio de *lipid rafts* [76].

- **Localización subcelular y transporte intracelular**

Según el ciclo propuesto de acilación/deacilación que llevan a cabo las proteínas periféricas, el estado de palmitoilación afecta tanto la localización subcelular como el transporte intracelular de dichas proteínas (**Figura 3**). Una forma de estudiar estos procesos es a través de microscopía, en particular microscopía de fluorescencia. En este caso se puede caracterizar tanto las proteínas endógenas (mediante el uso de anticuerpos) como proteínas acopladas a GFP o alguna otra variante fluorescente.

Cambios en la localización subcelular debido a modificaciones en los niveles de acilación o deacilación son posibles de monitorear. Numerosos estudios reportan cómo proteínas palmitoiladas ven afectadas su localización y/o transporte por mutaciones en las

cisteínas acilables, el empleo de inhibidores, la sobreexpresión de las enzimas que catalizan la acilación/deacilación, etc. [12, 32, 33, 35, 67, 70, 83, 90, 99].

Adicionalmente, técnicas más avanzadas de microscopía confocal de fluorescencia permiten el estudio de estos procesos de manera dinámica y no sólo en estado estacionario, lo que puede ser de relevancia en la función de la proteína en estudio. El empleo de dichas técnicas es pertinente a los objetivos de este trabajo de tesis, por lo cual se desarrollará en profundidad más adelante.

- **Función de la proteína**

Dependiendo de la proteína en estudio, se pueden analizar los efectos de modificaciones en la acilación sobre la actividad o función de dicha proteína. Tal es el caso de proteínas aciladas involucradas en procesos de señalización, de las cuales se puede conocer si la palmitoilación afecta la activación de determinadas vías, estudiando a los efectores que se encuentran *downstream* con respecto a la proteína en cuestión, o directamente evaluando el efecto sobre los procesos celulares afectados como proliferación, diferenciación, etc.

El caso más estudiado, y que ejemplifica este enfoque, es el de las proteínas GTPasas Ras. La mayoría de los inhibidores de la acilación/deacilación descritos en la sección anterior, fueron desarrollados teniendo como objetivo final la posibilidad de crear agentes terapéuticos que permitan la modificación en la localización subcelular de estas proteínas, de tal manera de impedir su participación en cascadas de señalización, ya que las proteínas Ras se encuentran mutadas en aproximadamente el 30% de los cánceres humanos [100]. Como la isoforma H-Ras es objeto de estudio de esta tesis, se volverá sobre estos conceptos más adelante.

PROTEÍNAS S-ACILADAS MODELO

En este trabajo de tesis, se decidió avanzar sobre el estudio de dos proteínas periféricas S-aciladas que han sido utilizadas en trabajos anteriores del grupo [35, 70, 97]. Dichas proteínas son GAP-43 y H-Ras, las cuales se describirán brevemente a continuación.

GAP-43 (Growth Associated Protein-43)

GAP-43 es una proteína doblemente S-acilada en el extremo N-terminal en cisteínas 3 y 4 [101, 102]. Se localiza principalmente en MP tanto en células de origen neural como no neural [70], y está involucrada en procesos de crecimiento y regeneración axonal [102].

Esta proteína posee además un dominio efector básico organizado en una estructura de α -hélice anfipática, capaz de unirse a lípidos aniónicos. Dentro de la α -hélice, el residuo de serina 41 es susceptible de ser fosforilado, pudiendo desestabilizar dicha estructura e impidiendo la unión de este dominio con calmodulina y PIP₂ en MP [70].

En células CHO-K1, GAP-43 se acila en membranas de Golgi, y en estado estacionario se localiza además en MP y en endosomas de reciclado (ER) (**Figura 10**), localización a la cual arriba a través de un transporte vesicular dependiente de Arf6 [70].

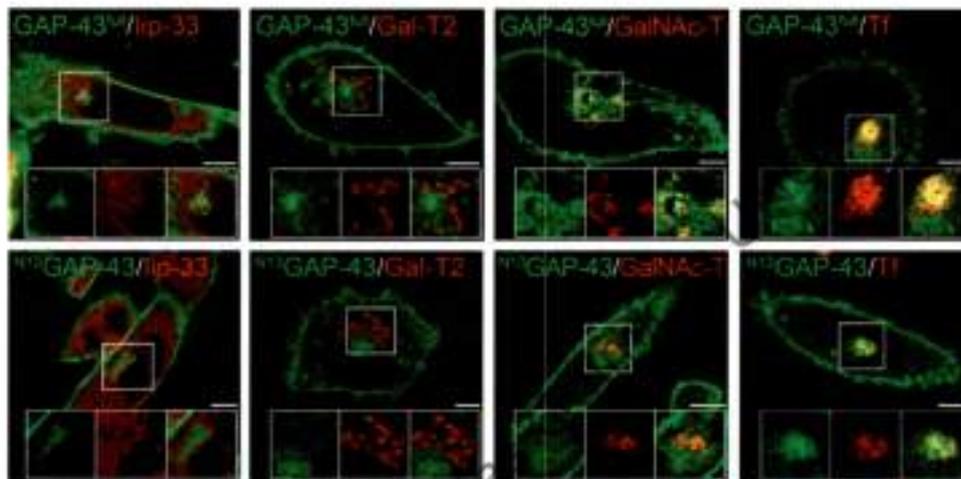


Figura 10. Localización de GAP-43 y N¹³GAP-43 en células CHO-K1. Células CHO-K1 fueron cotransfectadas para expresar GAP-43 o N¹³GAP-43 (pseudocoloreadas en verde) e lip-33 (marcador de RE), Gal-T2 (marcador de Golgi proximal) y GalNAc-T (marcador de TGN) o fueron incubadas con transferrina (Tf, marcador de ER). Los marcadores de las organelas se encuentran pseudocoloreados en rojo. (Extraído de Trenchi y colaboradores, 2009)

Interesantemente, para una versión trunca de GAP-43 conteniendo el motivo de acilación (aminoácidos 1-13 MLCCMRRTKQVEK, N13GAP-43) se demostró su localización en MP y ER (**Figura 10**) y una hidrofobicidad incluso mayor que la de la proteína salvaje [35, 70, 97], indicando que dicho motivo de acilación es suficiente para que la proteína logre esta localización subcelular. Sin embargo, no se descarta que motivos fuera del dominio mencionado influyan de alguna manera en el transporte y localización de GAP-43 ya que comparativamente la versión full de la proteína se encuentra más concentrada en TGN que la versión trunca, lo cual podría significar un distinto grado de palmitoilación de estas proteínas. Asimismo, se observó que la depalmitoilación no es suficiente para liberar a GAP-43 de membranas *in vitro*, sugiriendo que hay otros factores que contribuyen a la asociación a membranas de esta proteína [16]. Adicionalmente, se demostró que secuencias o señales

presentes en los primeros 60 aminoácidos, le permiten a GAP-43 interactuar con PI(4)P en membranas de TGN [Trenchi y Daniotti, resultados no publicados]. No obstante, la generación de mutantes fosfomimética y nula para la fosforilación en serina 41 permitió estudiar el efecto de esta modificación sobre la acilación, asociación a membranas y localización subcelular de GAP-43, sin encontrarse diferencias significativas en dichos procesos [Trenchi, Pedro y Daniotti, resultados no publicados]. Datos contrarios fueron reportados recientemente en un trabajo que demuestra que la fosforilación en serina 41 es necesaria pero no suficiente para la asociación de GAP-43 a MP en células PC12 [103].

Por otra parte, mutantes monoaciladas de GAP-43 mostraron una localización diferencial. GAP-43(C3S) se encuentra en citosol y en membranas de TGN, mientras que GAP-43(C4S) es totalmente soluble, al igual que la doble mutante de acilación GAP-43(C3,4S) (Figura 11) [35, 70, 101]. Este hecho podría indicar que la acilación de esta proteína (y posiblemente la de otras proteínas diaciladas) es un mecanismo cooperativo, facilitándose la palmitoilación de una cisteína luego de que la otra haya sido modificada. Estos datos son relevantes, ya que fue demostrado que el 75% de GAP-43 acilada se encuentra monoacilada en estado estacionario en células COS-1 [6].

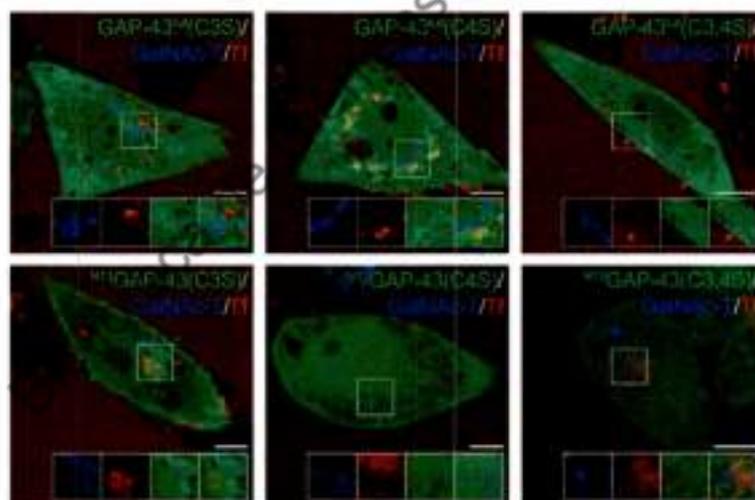


Figura 11. Localización subcelular de las mutantes de acilación en células CHO-K1. Células CHO-K1 fueron cotransfectadas para expresar las mutantes de acilación de GAP-43 y el marcador de TGN, e incubadas con TF. Las imágenes fueron pseudocoloreadas en verde, azul y rojo, respectivamente. (Extraído de Trenchi y colaboradores, 2009).

H-Ras (Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog)

Las proteínas Ras son GTPasas monoméricas de 21 kDa que ciclan entre dos estados: activo y unido a GTP, e inactivo y unido a GDP. De esta manera pueden regular un amplio

rango de procesos celulares como diferenciación, proliferación, apoptosis, etc. El efecto biológico de Ras será específico de la vía que se regule, lo cual depende de los efectores con los que esta proteína interactúe. Más de veinte efectores de Ras han sido identificados, sin embargo, la mayor parte de los trabajos se han focalizado en el estudio de la familia de quinasas Raf y fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP3) que regulan la proliferación y la supervivencia celular, respectivamente [104].

El intercambio entre GDP y GTP está regulado por enzimas GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) y GAP (*GTPase activating proteins*). Las GEFs activan a Ras induciendo la liberación de GDP y permitiendo la unión de GTP (ya que es diez veces más abundante que GDP en el citosol), mientras que las GAPs son enzimas que aumentan la velocidad de hidrólisis intrínseca de GTP (ya que la actividad GTPasa de Ras es débil), devolviendo la proteína al estado unido a GDP [104, 105]. La GEF más caracterizada, entre las ocho que expresan los mamíferos, es SOS (*Son of sevenless*), debido a su rol en la vía de MAPK (*Ras-mitogen-activated protein kinase*). En esta vía de señalización, los receptores tirosina quinasa (PTKRs) son activados (fosforilados) luego de su unión a factores de crecimiento. La proteína GRB2 (*growth factor receptor-bound 2*) se une a dichos receptores cuando los mismos se encuentran fosforilados y además se une a SOS y la recluta en la membrana, en donde puede activar a Ras. Ras, por su parte, comienza la cascada de señalización uniéndose a RAF1 y activando su actividad quinasa (Figura 12) [105]. Esta vía se encuentra frecuentemente desregulada en cáncer.

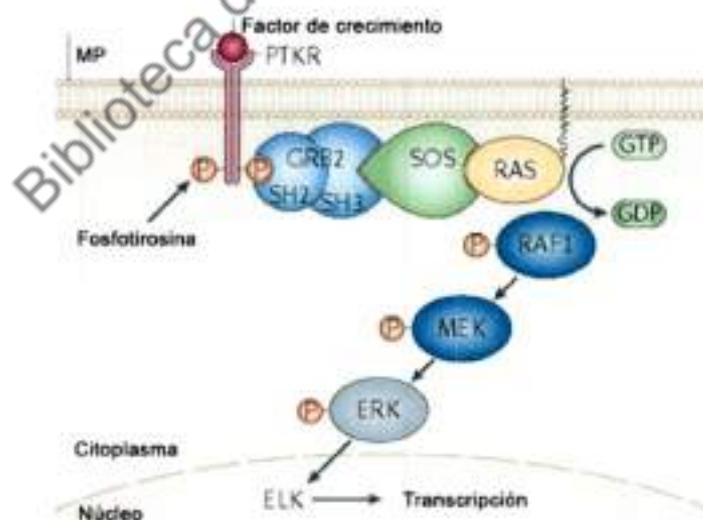


Figura 12. Cascada de señalización mediada por Ras. Representación esquemática de la vía de Ras-Raf1-Erk (*Extracellular signal-regulated kinase*). (Modificado de Ahearn y colaboradores, 2012).

Los mamíferos expresan siete tipos distintos de GAPs, de las cuales la mejor caracterizada es p120 RASGAP o RASA1. Estas proteínas incrementan la velocidad de hidrólisis del GTP en un factor de hasta 10^5 veces, regulando negativamente la actividad de Ras. Este proceso sucede gracias a que las mismas estabilizan el estado de transición de la reacción producida por el ataque nucleofílico del agua al GTP [105]. Mutaciones oncogénicas de Ras, tal como la mutación Gly12Val que se estudiará en este trabajo de tesis, previenen que las GAPs aumenten la actividad GTPasa, bloqueando a Ras en el estado unido a GTP.

En mamíferos existen tres genes Ras: *HRAS*, *NRAS* y *KRAS*. Debido a que en el transcripto de *KRAS* se puede producir *splicing* alternativo, estos tres genes dan lugar a la expresión de cuatro proteínas: H-Ras (*Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog*), N-Ras (*neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*), K-Ras4A y K-Ras4B (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*). Dichas proteínas comparten >90% de homología en los primeros 168-169 aminoácidos, lo que se conoce como dominio G, pero difieren en los últimos 20 aminoácidos, lo que se conoce como región hipervariable o HVR (por *hypervariable region*) [105]. A pesar de su gran similitud, las proteínas Ras no son redundantes en su función, lo que se puede demostrar debido a determinadas observaciones como el hecho de que sólo K-Ras sea esencial para el desarrollo en ratones, la preponderancia de mutaciones de K-Ras comparada con las otras isoformas en un amplio rango de cáncer, diferentes patologías y fenotipos causados por mutaciones en las isoformas y los distintos perfiles de señalización asociados a cada una de ellas en estudios de sobreexpresión de las mismas [104, 106, 107].

Las proteínas Ras se sintetizan como proteínas globulares e hidrofílicas, y su asociación a membranas depende de una serie de modificaciones postraduccionales. Dichas proteínas pertenecen a una familia que contienen en el extremo C-terminal la secuencia consenso anteriormente mencionada CAAX, en la que se producen las modificaciones postraduccionales que incluyen isoprenilación, endoproteólisis y carboximetilación [7]. De esta manera, una vez sintetizadas en el citosol, las proteínas Ras son sustratos de preniltransferasas (FTasa o GG-Tasa) citosólicas que le adicionan un isoprenoide (farnesilo o geranylgeranilo, respectivamente, según la identidad del aminoácido X) a la cisteína del motivo consenso, a través de un enlace tioéter. La proteína prenilada es a su vez sustrato de Rce1 (*Ras converting enzyme 1*), una endoproteasa localizada en RE que remueve los aminoácidos AAX. Esta actividad endoproteolítica requiere de la previa prenilación. Finalmente, la nueva cisteína C-terminal es sustrato de una carboxi-metiltransferasa también localizada en RE, Imct (*Isoprenylcysteine carboxymethyltransferase*), que metil-esterifica el grupo

carboxilo de la cisteína prenilada [7, 104-106]. El resultado de estas modificaciones es el de convertir una proteína hidrofílica a una que es capaz de asociarse a membranas celulares.

Además de estas modificaciones, se describió que una segunda señal es necesaria para que las proteínas Ras se localicen en MP [7, 105-108]. En el caso de H-, N- y K-Ras4a dicha señal es la palmitoilación de dos o una cisteína, mientras que para K-Ras4b (normalmente llamada K-Ras) la señal consiste en un dominio polibásico rico en lisinas (**Figura 13**).

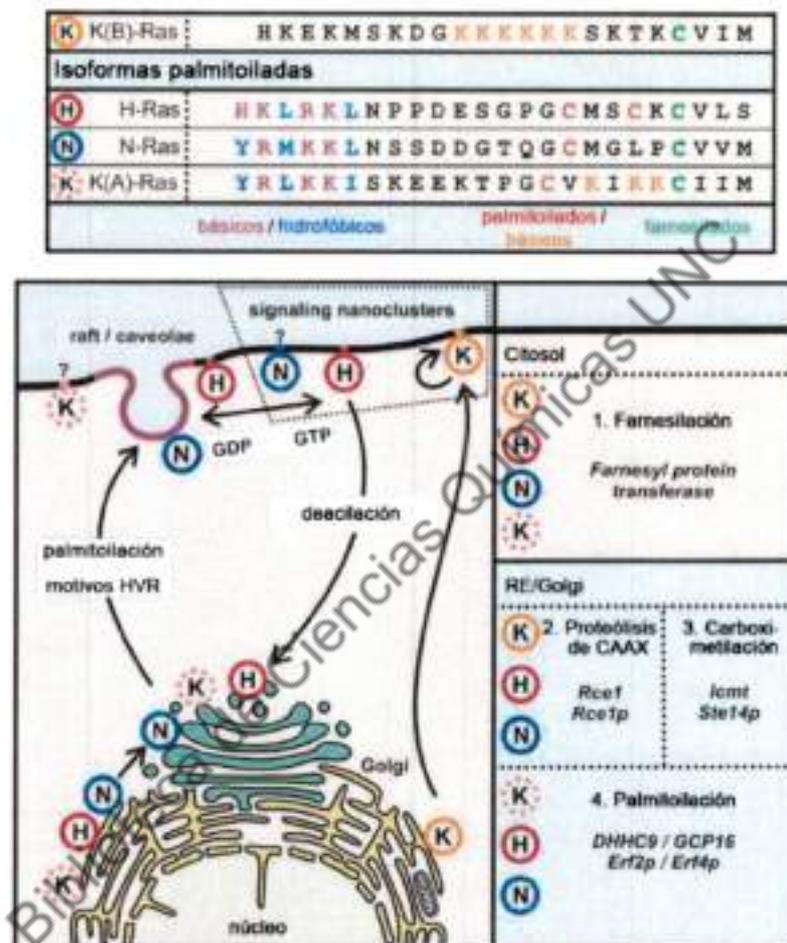


Figura 13. Región hipervariable de Ras. Las modificaciones postraduccionales de las isoformas de Ras modulan la distribución y el transporte diferencial entre RE, Golgi y MP. (Modificado de Eisenberg y colaboradores, 2013).

Debido a que la única PAT descrita de Ras (DHHC9/GCP16) se localiza principalmente en membranas de Golgi [109], la localización de las enzimas encargadas de las modificaciones postraduccionales (citosol-RE-Golgi) dan idea del tráfico anterógrado que experimentan estas proteínas por la cara citoplasmática del sistema de endomembranas, desde que son sintetizadas hasta que llegan a MP. En este sentido, ha sido demostrado que

la asociación de Ras palmitoiladas a MP es mediado por transporte de tipo vesicular [110, 111]. En el caso de K-Ras, la misma viaja desde RE hasta MP por una vía alternativa [111] que podría requerir de proteínas chaperonas [106].

Por lo anteriormente mencionado, queda claro que además de otorgarle hidrofobicidad a proteínas originalmente hidrofílicas, el procesamiento secuencial del motivo CAAX y de HVR de Ras regula etapas específicas del tránsito por la vía secretora de dicha proteína. Así, la compartimentalización y complejidad de este proceso permite una regulación de la llegada de Ras a MP [110].

Para las Ras palmitoiladas (H- y N-Ras) ha sido descripto además un transporte retrógrado dependiente de los ciclos de acilación/deacilación anteriormente mencionados. A través de experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*) en donde se fotoapagó completamente la fluorescencia de Golgi, se demostró que tanto N-Ras como H-Ras recuperan la fluorescencia en dicha organela por un transporte no vesicular [32, 33]. Asimismo, experimentos de fotoactivación demostraron que estas proteínas Ras viajan desde MP hasta Golgi y que la población de N-Ras en Golgi es más dinámica que el de H-Ras, consistente con el requerimiento de la deacilación de una *vs.* dos cisteínas [32].

Debido a que la señalización mediada por Ras desde el complejo de Golgi difiere de la mediada desde MP con respecto a los efectores y a las consecuencias biológicas, estas proteínas son un ejemplo de que los ciclos de acilación/deacilación pueden modular dicha actividad y sus respuestas [105].

En conclusión, la unión a GTP, la hidrólisis del GTP, y las consecuentes funciones de Ras, no requieren de las modificaciones postraduccionales. Sin embargo, dichas modificaciones son requeridas para un tráfico y localización correctos, lo cual, a su vez, es esencial para que Ras cumpla su función. Cada isoforma de Ras comparte su localización en MP y endomembranas, difiriendo en su microlocalización. Esto les permite el acceso a una población y a concentraciones diferentes de activadores y efectores lo cual lleva a un proceso de señalización específico de cada una de ellas [104, 106, 107]. Otra visión es que, como en un determinado compartimento subcelular todas las isoformas encuentran los mismos efectores, lo que hace que la señalización sea distinta es el acceso diferencial y el tiempo de residencia en una membrana específica [107].

Antecedentes de nuestro laboratorio demostraron que, al contrario de lo descripto en otros trabajos y en otras líneas celulares, H-Ras no se localiza en organelas de la vía secretora en células CHO-K1, sino que se encuentra, además de en MP, en ER [97]. Esta localización

es similar a lo encontrado para GAP-43 [70, 97], lo que indicaría que la doble palmitoilación es una señal de transporte a dicha organela. Otra posibilidad es que la actividad de deacilación en células CHO-K1 sea baja, por lo que H-Ras tiene un tiempo de residencia mayor en MP y, en consecuencia, es internalizada a ER mediante transporte vesicular. Esta población, que es dinámica y se intercambia con la de MP, depende de la actividad de las GTPasas Rab5 y Rab11 y es activa en ER, pudiendo iniciar el proceso de señalización desde esta organela [97].

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

ANTECEDENTES Y PLANTEO DEL PROBLEMA

Biblioteca de Ciencias Químicas UNQ

La modificación de proteínas solubles por unión covalente a lípidos constituye un importante mecanismo de regulación de la asociación a membranas, del transporte y de la distribución intracelular de las mismas.

De los distintos tipos de lipidaciones descriptos, la S-acilación o unión de un ácido graso (generalmente palmitato) a cisteínas a través de un enlace tioéster, es la más versátil por ser una modificación reversible.

El balance de las actividades de las enzimas involucradas en la acilación (PATs) y en la deacilación (APTs) podría determinar la estequiometría de esta modificación, también conocida como palmitoilación, teniendo importantes efectos en la localización, tráfico y función de las proteínas palmitoiladas.

A diferencia de lo que había sido descripto en otras líneas celulares con respecto a las rutas intracelulares que transitan las proteínas diaciladas GAP-43 y H-Ras, en nuestro laboratorio se demostró que en células derivadas de ovario de hamster chino (CHO-K1) estas proteínas se localizan en ER, en MP y en complejo de Golgi, y que la conexión entre las diferentes organelas es llevada a cabo mediante transporte vesicular exocítico y endocítico [70, 97]. Posteriormente, demostramos que las células CHO-K1 no expresan APT1, pero sí APT2, y que esta enzima sería la responsable de la deacilación de GAP-43 y H-Ras en dichas células [35]. Estas observaciones podrían indicar que existe una baja actividad APT en células CHO-K1, por lo que el transporte de ambas proteínas diaciladas sería fundamentalmente vesicular. De esta manera, nuestra hipótesis es que la particular presencia de GAP-43 y H-Ras en membranas de ER es probablemente el resultado de un mecanismo gobernado por la presencia de actividad PAT y una relativamente baja actividad APT en dicha línea.

Las enzimas APTs han sido escasamente caracterizadas, conociéndose muy poco acerca de su función como tioesterasas de proteínas aciladas y de su especificidad. Incluso hay estudios contradictorios acerca de su localización subcelular. En células CHO-K1 y HeLa observamos que APT1 y APT2 fusionadas a variantes espectrales de la proteína GFP tienen una localización citosólica. De este modo, una de las preguntas que quedan por contestar es de qué manera dichas enzimas citosólicas son capaces de deacilar sustratos asociados a membranas celulares.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y los interrogantes que surgen de ellos, nos planteamos los objetivos de este trabajo de tesis.

OBJETIVOS

Biblioteca de Ciencias Químicas UNIC

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar los mecanismos celulares que intervienen en la regulación del proceso de acilación/deacilación de proteínas periféricas y su efecto sobre la asociación a biomembranas y función de las mismas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el proceso de depalmitoilación *in vitro* utilizando las enzimas APT1 y APT2 recombinantes expresadas en *E. coli*.
- Analizar el efecto en las variaciones de los niveles de expresión de APT1 y APT2 sobre la asociación a membranas y distribución subcelular de las proteínas aciladas GAP-43 y H-Ras.
- Determinar las consecuencias de las variaciones en los niveles de expresión de APT1 y APT2 sobre la actividad y dinámica intracelular de H-Ras.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNO

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biblioteca de Ciencias Químicas UNIC

Para facilitar su lectura, los resultados de este trabajo de tesis fueron separados en dos capítulos: el capítulo I abarca los dos primeros objetivos específicos, mientras que el capítulo II se focaliza en contestar el tercer objetivo.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

CAPÍTULO I

De acuerdo a los objetivos planteados, apuntamos nuestros experimentos al estudio de la depalmitoilación de GAP-43 y sus consecuencias en la localización intracelular de esta proteína. Como se mencionó anteriormente, los conocimientos bioquímicos que se poseen acerca del funcionamiento de las tioesterasas que llevan a cabo la deacilación, son escasos, por lo que investigamos este proceso *in vitro* con las proteínas recombinantes, como una manera de realizar aportes al entendimiento de la deacilación.

Durante la realización de experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio para investigar el mecanismo de deacilación y asociación a membranas de GAP-43, se observó que a determinadas concentraciones de 2-BP, se inhibía la acilación de la proteína sintetizada *de novo*. Sin embargo, este tratamiento no modificaba el estado de palmitoilación ni la afinidad por membranas de GAP-43 a lo largo del tiempo, sugiriendo que dicha proteína no estaba siendo deacilada y que 2-BP no sólo podría estar inhibiendo a las PATs, sino también a las APTs [35].

El análogo de palmitato 2-BP es un ácido graso unido a Br en el C α , lo cual convierte a dicho carbono en electrofílico (Figura 8). Este compuesto ha sido ampliamente utilizado como inhibidor de la palmitoilación [83, 86]. 2-BP actúa irreversiblemente y bloquea de manera general la incorporación de palmitato en las proteínas, sin una aparente selectividad por sustratos específicos. De hecho, fue demostrado que este inhibidor actúa sobre diferentes enzimas relacionadas o no con el metabolismo lipídico [82]. Recientemente, estudios de espectrometría de masa demostraron que 2-BP tiene aproximadamente 450 blancos incluyendo proteínas palmitoiladas y enzimas PATs [84].

Como se mencionó anteriormente y teniendo en cuenta que el 2-BP es ampliamente utilizado como inhibidor de la palmitoilación, consideramos de importancia investigar más profundamente el efecto *in vivo* e *in vitro* de este compuesto sobre la deacilación en general y sobre las APTs en particular.

Por lo tanto, a continuación, se describen los experimentos realizados con este fin, que se engloban dentro de los dos primeros objetivos de esta tesis, los cuales incluyen la caracterización bioquímica de las APTs por estudios *in vitro* y el efecto de las mismas sobre la localización subcelular y afinidad por membranas de GAP-43.

Los resultados encontrados aquí pueden resultar de utilidad para el desarrollo de experimentos utilizando 2-BP en condiciones "controladas" para inhibir uno o ambos procesos (acilación/deacilación), las cuales se utilizarán a lo largo de todo el trabajo de tesis.

2-BP inhibe la actividad PAT y la asociación a membranas de GAP-43 monoacilada

Para investigar *in vivo* el efecto de 2-BP sobre la maquinaria de acilación/deacilación, utilizamos una mutante monoacilada de GAP-43 que sólo requiere un evento de acilación para su asociación a membranas.

GAP-43 es una proteína diacilada en cisteínas 3 y 4. Como se observó anteriormente, el extremo N-terminal fusionado a variantes de la proteína GFP, se localiza en estado estacionario en ER, MP y Golgi [35, 70]. La mutación de la cisteína 3 en ¹⁵³GAP-43 [¹⁵³GAP-43(C3S)] produce la acumulación de la proteína en el citosol y en Golgi, afectando su localización original [35, 70].

El efecto del 2-BP en la acilación de ¹⁵³GAP-43(C3S) sintetizada *de novo*, fue investigado a través de un experimento de síntesis sincronizada de proteínas en células CHO-K1 (**Figura 14.A**). En condiciones control, una fracción de la proteína se encontró asociada a membranas de *trans Golgi network* (TGN), debido a la acilación en dichas membranas por la PAT residente en Golgi [70]. Sin embargo, el tratamiento con 25, 50 y 150 μM de 2-BP inhibió la asociación a esta membrana, lo que está de acuerdo con la inhibición de la acilación por parte de dicho compuesto (**Figura 14.B**). Además de lo observado por microscopía de fluorescencia confocal, la asociación a membranas de ¹⁵³GAP-43(C3S) fue determinada, bajo las mismas condiciones de tratamiento, mediante ultracentrifugación. De esta manera, se encontró que el tratamiento con 2-BP, comparando con la condición control, produjo una disminución de ¹⁵³GAP-43(C3S) asociada a membranas a todas las concentraciones probadas (**Figura 14.C**). Esto se concluye debido a que, si bien la fracción citosólica de esta proteína es mayoritaria y participa en la fracción soluble, una población menor se encuentra en la fracción *pellet*, la cual se pierde completamente bajo el tratamiento con 2-BP.

En conclusión, estos resultados bioquímicos están de acuerdo con lo observado por microscopía y claramente indican que 2-BP afecta la asociación a membranas de ¹⁵³GAP-43(C3S), probablemente inhibiendo la actividad PAT.

2-BP afecta la cinética de deacilación de GAP-43 monoacilada

Habiendo demostrado que 2-BP inhibe la actividad PAT *in vivo* en un rango de concentración entre 25 y 150 μM , luego investigamos si dicho compuesto puede, además, perturbar la cinética de deacilación de GAP-43 monoacilada a las mismas concentraciones. Para esto, células CHO-K1 cotransfectadas transientemente con ¹⁵³GAP-43(C3S) y GalNAc-T (marcador de Golgi) fueron tratadas con 25, 50 y 150 μM de 2-BP (2-BP) o

DMSO (Control) y la localización subcelular de la proteína acilada fue monitoreada a diferentes tiempos por microscopía de fluorescencia confocal *in vivo*. En todos los casos, las células fueron incubadas con cicloheximida (CHX) 1 hora previa al agregado de 2-BP y mantenida en el medio durante el experimento (Figura 15.A). Observaciones previas de nuestro laboratorio demostraron que GAP-43 deacilada y soluble es sustrato para la degradación en proteosomas [35], por lo que el inhibidor MG132 fue utilizado con el fin de impedir dicha degradación.

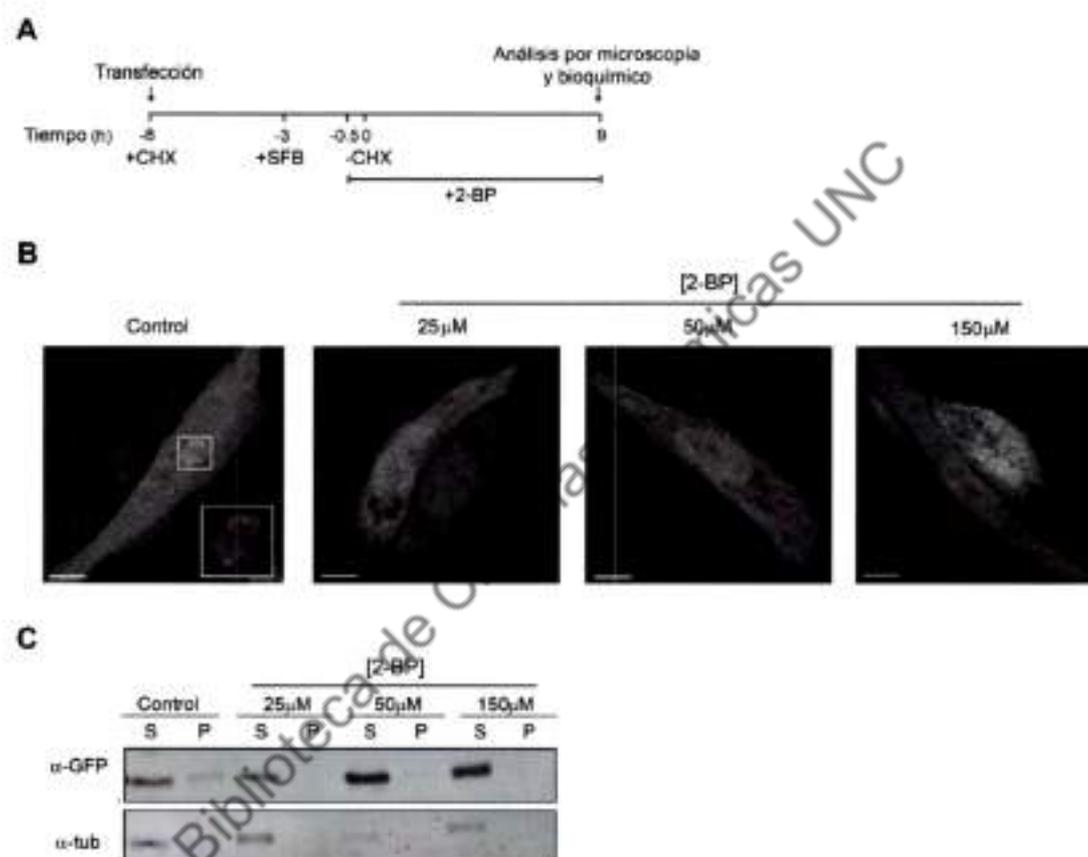


Figura 14. 2-BP inhibe la acilación y la asociación a membranas de N^{13} GAP-43(C3S) sintetizada *de novo*. A) Representación esquemática del procedimiento experimental utilizado en B y C. Las células CHO-K1 fueron transfectadas transientemente a -8 horas con el plásmido que codifica para N^{13} GAP-43(C3S)-YFP. 30 minutos previos al lavado de la CHX (-CHX), las células fueron incubadas con 25, 50 o 150 μ M de 2-BP o DMSO (vehículo, Control). A las 0 horas, la CHX fue retirada del medio de cultivo y las células fueron incubadas con 2-BP, a las concentraciones antes establecidas o DMSO, a 37°C durante 9 horas. Finalmente, las células fueron analizadas por microscopía de fluorescencia confocal o sometidas a ensayos bioquímicos. B) Imágenes representativas mostrando el efecto de 2-BP o DMSO (Control) en la asociación a TGN de N^{13} GAP-43(C3S). La señal de YFP fue pseudocoloreada en gris. El recuadro muestra detalles de la región marcada con mayor amplificación. Las barras de escala representan 5 μ m. C) Luego del tratamiento con 2-BP, las células CHO-K1 transfectadas con N^{13} GAP-43(C3S) fueron lisadas, ultracentrifugadas y las fracciones del sobrenadante (S) y *pellet* (P) fueron analizadas por Western blot utilizando anticuerpos anti-GFP (α -GFP) y anti-tubulina (α -tub).

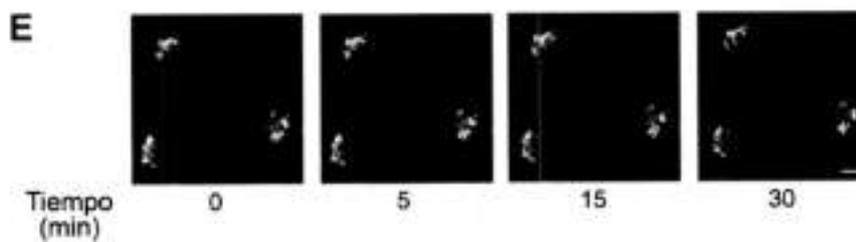
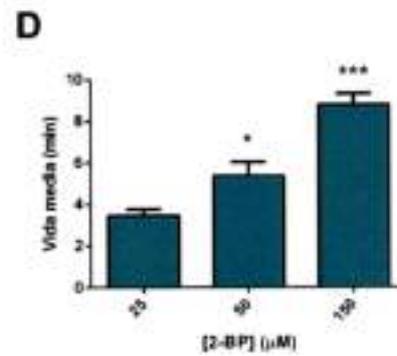
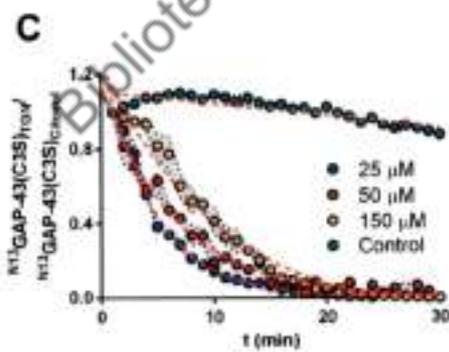
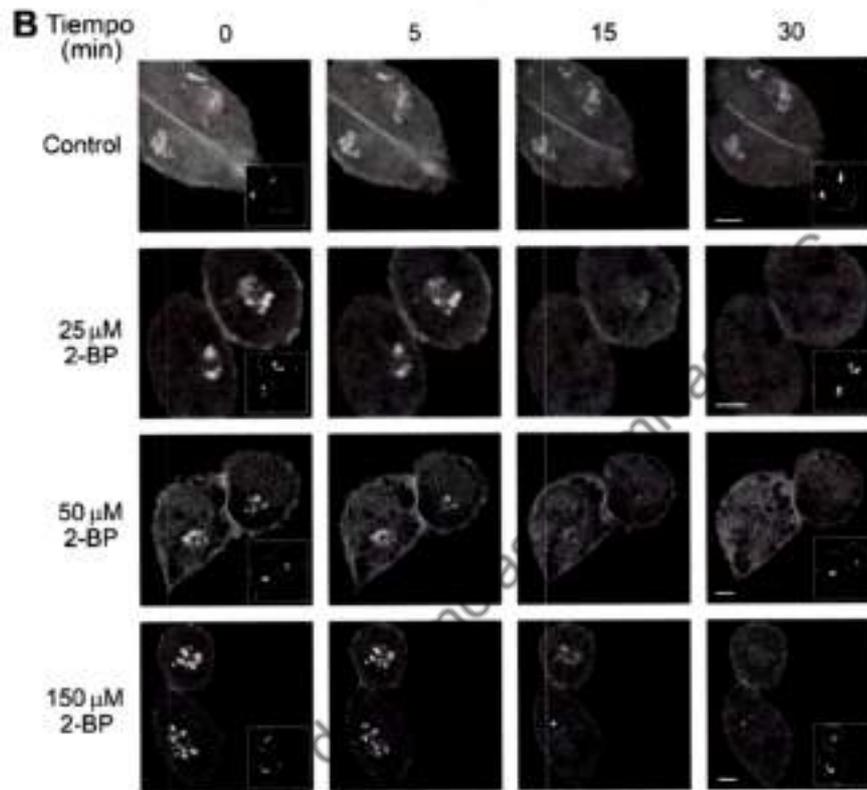
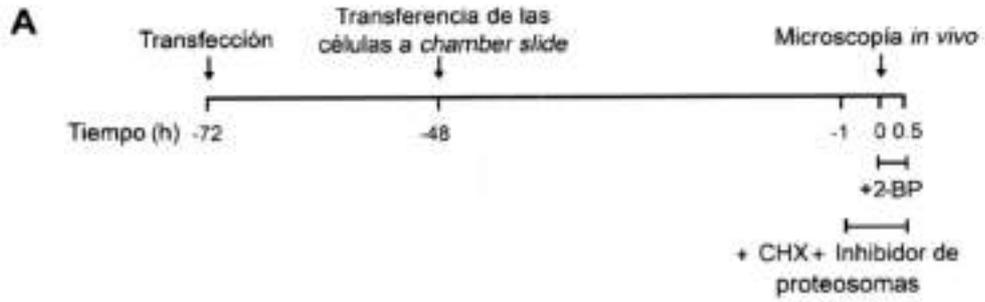


Figura 15. Cinética de deacilación de N^{13} GAP-43(C3S) a diferentes dosis de 2-BP. A) Representación esquemática del procedimiento experimental utilizado en B, C y E. Las células CHO-K1, 72 horas después de ser transfectadas con N^{13} GAP-43(C3S)-YFP, fueron tratadas a 20°C con 25, 50 o 150 μ M de 2-BP o DMSO (Control) en presencia de CHX e inhibidor de proteosomas, adicionados 1 hora previo al agregado de 2-BP y mantenidos a lo largo del experimento. La localización subcelular de N^{13} GAP-43(C3S) fue analizada por microscopía de fluorescencia confocal. B) Imágenes representativas mostrando el efecto de las distintas dosis de 2-BP o DMSO (vehículo, Control) sobre la asociación a membranas de TGN de N^{13} GAP-43(C3S)-YFP. La señal de YFP fue pseudocoloreada en gris y se muestra a 0, 5, 15 y 30 minutos posteriores al agregado de 2-BP o DMSO. Los recuadros muestran la expresión del marcador de Golgi GalNAc-T-CFP (pseudocoloreado en gris). El contorno de las células se indica con líneas punteadas blancas. C) Cuantificación de las imágenes mostradas en B (ver Materiales y métodos). Las curvas fueron ajustadas a una función de decaimiento exponencial para cada serie de datos. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM para un experimento representativo de nueve experimentos individuales. D) La vida media de deacilación para cada dosis de 2-BP calculada de C (n=6). (*p<0,05; ***p<0,0001; comparados con los datos de 25 μ M). E) Imágenes representativas mostrando el efecto de 50 μ M de 2-BP sobre la asociación a membranas de TGN de GalNAc-T-CFP a lo largo del tiempo indicado. La señal fluorescente de YFP (pseudocoloreada en gris) se muestra a 0, 5, 15 y 30 minutos luego de la adición de 2-BP. Las barras de escala representan 5 μ m.

En condiciones control, la cantidad de N^{13} GAP-43(C3S) asociada a membranas de Golgi no se modificó significativamente durante el período analizado. En contraste, en células tratadas con 25 μ M de 2-BP, la fracción asociada a dicha membrana disminuyó notablemente con una vida media de $3,5 \pm 0,1$ minutos. Resulta interesante que una disminución significativa en la velocidad de deacilación fue observada a mayores concentraciones de 2-BP (**Figura 15.B**). La vida media de asociación de N^{13} GAP-43(C3S) a membranas de Golgi en células tratadas con 50 y 150 μ M de 2-BP fue $5,4 \pm 0,6$ y $8,8 \pm 0,2$ minutos, respectivamente (**Figura 15.C y D**).

Cabe destacar que la disminución observada de la asociación a membrana de Golgi por parte de N^{13} GAP-43(C3S) en condiciones de tratamiento con 2-BP, no fue atribuible a una redistribución de las membranas de dicha organela, ya que el marcador GalNAc-T no se vio afectado bajo las condiciones experimentales utilizadas (**Figura 15.E**). Tampoco se produjo un incremento en el transporte vesicular de N^{13} GAP-43(C3S) desde TGN a MP, ya que los experimentos fueron realizados a 20°C, condición que disminuye drásticamente dicho proceso [70].

Finalmente, el efecto de 2-BP sobre la asociación a membranas de GAP-43 diacilada fue evaluada de manera similar (**Figura 16**). Así, pudimos observar que en células tratadas durante 6 horas con 150 μ M de 2-BP, la asociación a membranas de GAP-43 no se modificó significativamente con respecto a la condición control. En contraste, cuando las células fueron tratadas con 25 y 50 μ M de 2-BP, hubo un importante aumento de GAP-43 en el citosol a las 3 horas posteriores al agregado del inhibidor, siendo el mismo incluso más evidente a las 6 horas.

Teniendo en cuenta estos resultados, podemos afirmar que 2-BP, además de su rol ya establecido como inhibidor de la acilación, puede afectar la deacilación de proteínas *in vivo*, posiblemente afectando la reacción catalítica mediada por las tioesterasas.

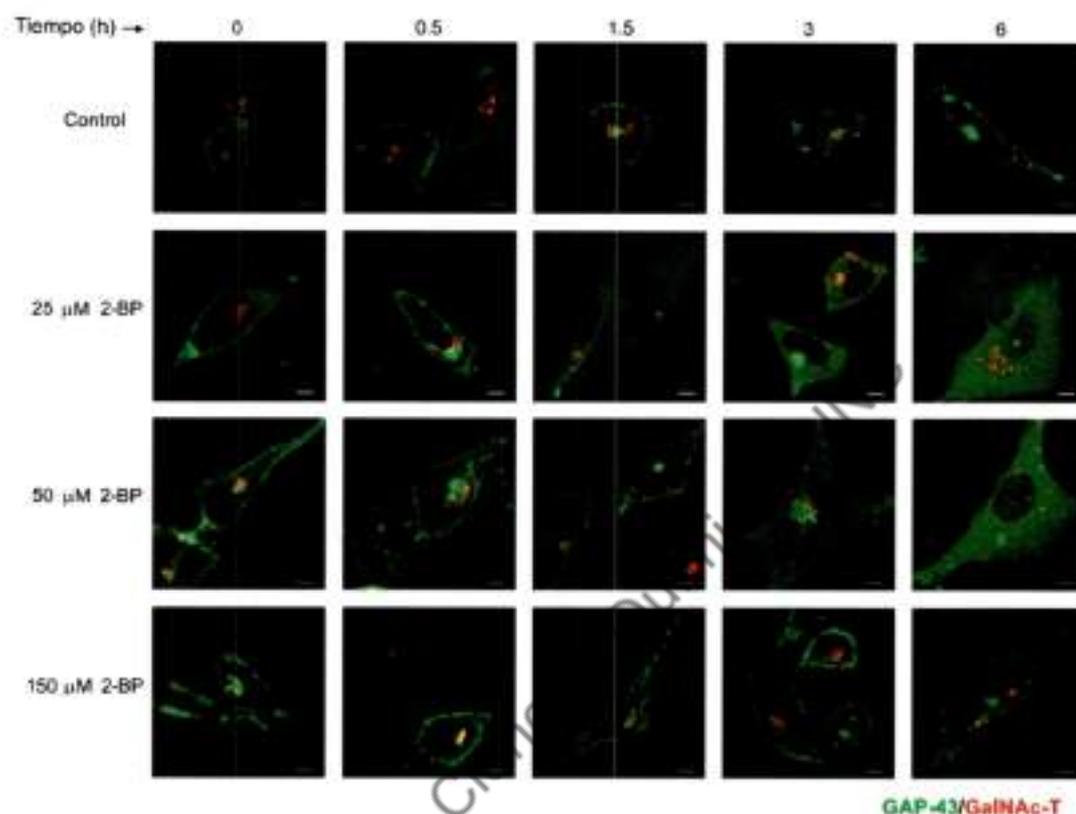


Figura 16. Cinética de deacilación y asociación a membrana de GAP-43 a diferentes dosis de 2-BP. Células CHO-K1 cotransfectadas con GAP-43-YFP y GalNAc-T-CFP fueron tratadas con 25, 50 y 150 μM de 2-BP o DMSO (vehículo, Control). La distribución subcelular de GAP-43 fue analizada por microscopía de fluorescencia confocal a los tiempos indicados. CHX e inhibidor de proteosomas fueron agregados y mantenidos en el medio hasta el final de cada experimento. Imágenes representativas muestran el efecto de las diferentes dosis de 2-BP en la asociación a membranas de GAP-43. Las señales de YFP y CFP fueron pseudocoloreadas en verde y rojo, respectivamente. Las barras de escala representan 5 μm .

Caracterización bioquímica y efecto del 2-BP sobre APT1 y APT2 recombinantes

Hasta este momento nuestros resultados indican que el 2-BP afecta la deacilación en células en experimentos *in vivo*. Por lo tanto, decidimos investigar el efecto de dicho compuesto sobre la actividad de APT1 y APT2 recombinantes, las dos tioesterasas citosólicas descritas con capacidad de deacilar diversas proteínas palmitoiladas [48, 49].

Con este objetivo, ambas tioesterasas fueron expresadas en *Escherichia coli*, purificadas y caracterizadas bioquímicamente, de acuerdo a lo que se explica en Materiales y métodos.

El porcentaje de pureza obtenido en ambos casos es superior al 90%. Como se observa en la **Figura 17.A y B**, tanto APT1 como APT2 migran con un peso molecular aparente de 26 kDa.

Posteriormente, para comprobar si estas tioesterasas son activas, evaluamos la habilidad para hidrolizar palmitoil-CoA, sustrato utilizado anteriormente para medir la actividad tioesterasa de enzimas [53]. De esta manera se observó que APT1 y APT2 hidrolizan dicho sustrato con valores de K_M de 0,14 y 0,35 mM, respectivamente (**Figura 17.C**).

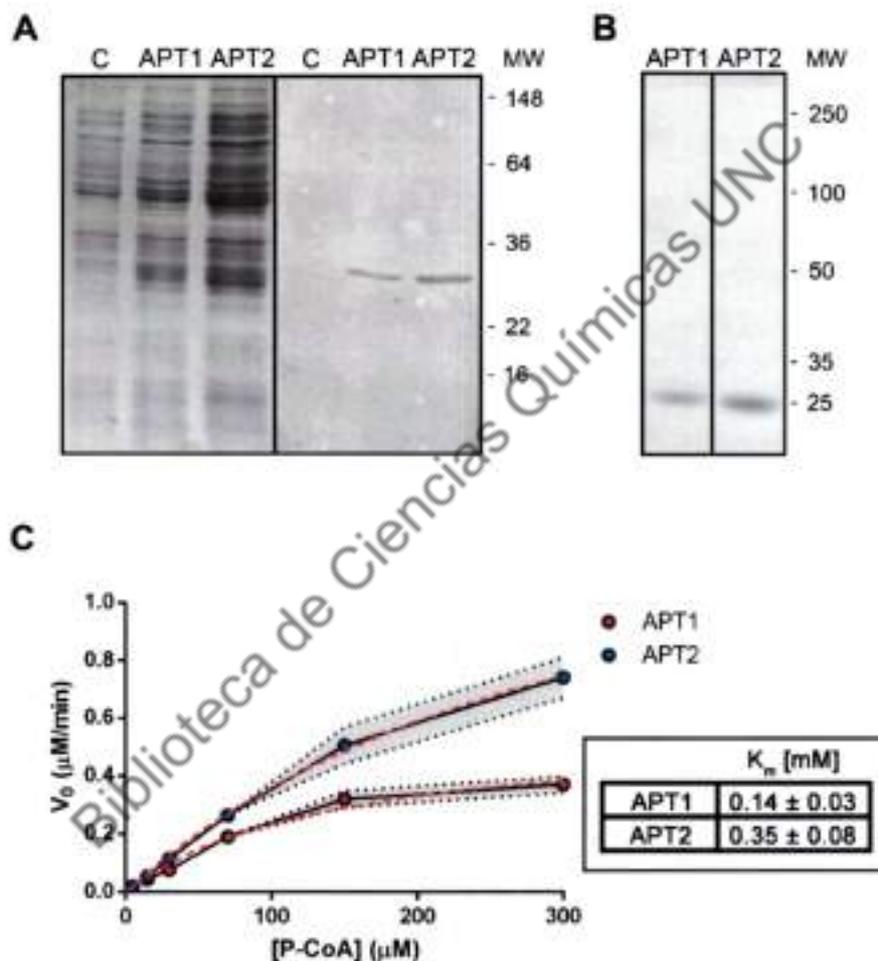


Figura 17. Purificación y caracterización bioquímica de APT1 y APT2 recombinantes. A) SDS-PAGE y tinción con Coomassie blue (izquierda) o Western blot (derecha) de fracciones solubles obtenidas de *Escherichia coli* transformadas con His-APT1, His-APT2 o el vector vacío (C). Las proteínas recombinantes fueron analizadas utilizando un anticuerpo anti-Hisx6 tag. B) Tinción de Coomassie blue de APT1 y APT2 recombinantes obtenidas por cromatografía de afinidad. Los pesos moleculares de marcadores en kDa se encuentran indicados a la derecha. C) La velocidad inicial de la actividad hidrolasa sobre palmitoil-CoA (P-CoA) fue medida utilizando 0,5 μ g de enzima recombinante. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo realizado por triplicado. Las curvas fueron ajustadas a la ecuación de Michaelis-Menten para cada grupo de datos y los parámetros cinéticos obtenidos se muestran en la tabla.

Un hecho que resulta interesante, es que ambas enzimas hidrolizan tanto la forma monomérica como el estado en micelas de palmitoil-CoA ($\text{CMC} \approx 100\text{-}180 \mu\text{M}$). Sin embargo, a mayores concentraciones de sustrato, la deacilación mediada por las APTs es inhibida (Figura 18.A y B). Estos resultados tienen una relevancia biológica, dado que tanto APT1 como APT2 son enzimas principalmente citosólicas en determinados tipos celulares (Figura 19.A) [35] y poseen un carácter altamente hidrofílico según lo observado en un experimento de ultracentrifugación y posterior partición en detergente (Figura 19.B y C). Esto podría indicar que son proteínas capaces de hidrolizar tanto sustratos solubles como sustratos asociados a membranas.

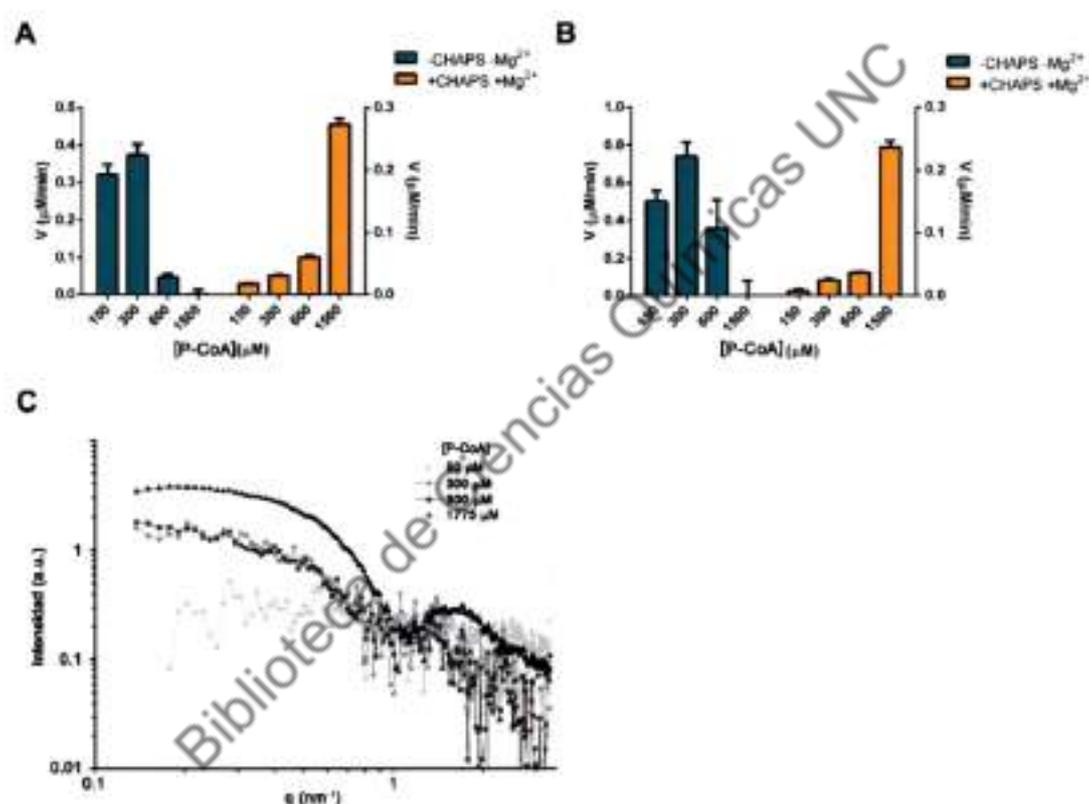


Figura 18. Actividad de APTs a distintas concentraciones de palmitoil-CoA y caracterización estructural del sustrato por SAXS. La velocidad de la reacción de hidrólisis de palmitoil-CoA (P-CoA) fue medida con 0,5 μg de APT1 (A) o APT2 (B) recombinantes, en condiciones control (-CHAPS Mg^{2+} , barras de la izquierda) o en presencia de 7,5 mM de CHAPS y 2 mM de MgCl_2 (+CHAPS Mg^{2+} , barras de la derecha) a 150, 300, 600 y 1500 μM de sustrato. Los gráficos muestran datos representativos de experimentos realizados por triplicado. C) Análisis por SAXS. Palmitoil-CoA fue resuspendido en buffer Hepes (50 mM, pH 8.0) a 50, 300, 600 y 1775 μM , y las mediciones fueron llevadas a cabo según lo indicado en Materiales y métodos. El gráfico muestra los datos de SAXS (luego de la sustracción del *background* del buffer y la normalización de la concentración) para valores crecientes de palmitoil-CoA. No se observan picos de difracción en ninguna curva.

Siguiendo con esta idea, y como la estructura del sustrato en la membrana podría ser relevante para determinar la cinética de deacilación del mismo, analizamos la estructura de palmitoil-CoA a distintas concentraciones por *Small-angle X-ray scattering* (SAXS) (Figura 18.C).¹ SAXS es una técnica que permite evaluar el tamaño y forma de partículas en general y la estructura de macromoléculas biológicas en particular.

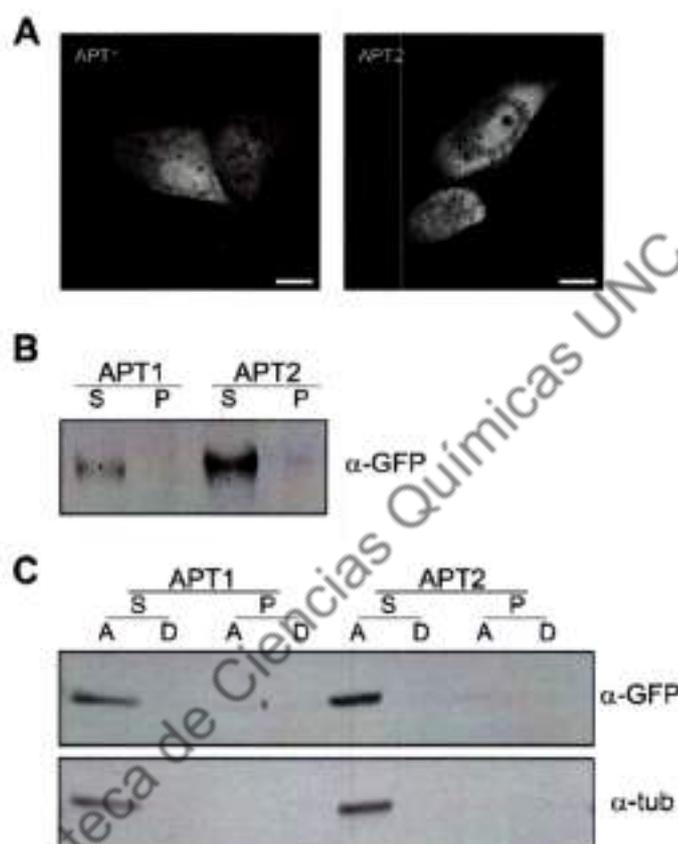


Figura 19. Análisis de la expresión de APTs en células CHO-K1 y caracterización bioquímica. A) Células CHO-K1 transfectadas transientemente con APT1-CFP (APT1) o APT2-CFP (APT2) fueron analizadas por microscopía de fluorescencia confocal. La señal se presenta pseudocoloreada en gris. B) Células CHO-K1 expresando APT1-CFP (APT1) o APT2-CFP (APT2) fueron lisadas, ultracentrifugadas y las fracciones sobrenadante (S) y *pellet* (P) fueron aisladas. A dichas fracciones se les añadió buffer conteniendo 1% v/v de Tritón X-114 y se indujo a la separación de fases incubando a 37°C. Las proteínas de la fase acuosa (A) y detergente (D) fueron analizadas por Western blot con un anticuerpo anti-GFP (α-GFP) y anti-tubulina (α-tub). El ensayo de partición en Tritón X-114 fue realizado según lo descrito en Materiales y métodos. Notar que APT1 y APT2 están principalmente en la fase acuosa de la fracción sobrenadante, demostrando su carácter hidrofílico. Las barras de escala representan 5 μm.

¹ Estos experimentos fueron realizados en colaboración con el Dr. Rafael Oliveira. Investigador independiente, CIQUIBIC, CONICET.

Como era esperado, no se encontró agregación de palmitoil-CoA a 50 μM , ya que la curva a esta concentración no mostró ninguna tendencia (**Figura 18.C**). Sin embargo, la formación de micelas resultó evidente a 300 y 600 μM , lo que se concluye a partir del incremento en la intensidad a ángulos pequeños. Para ambas concentraciones la curva adoptó formas y valores absolutos similares (**Figura 18.C**). A una concentración de palmitoil-CoA de 1775 μM , la curva de SAXS mostró un comportamiento diferente, indicando un nuevo tipo de agregado. En este caso, se observó un incremento a ángulos pequeños, un plateau por debajo de 0,3 nm^{-1} y una curva centrada en 1,6-1,7 nm^{-1} , característica de micelas y bicapas. El valor de saturación a bajos q (aproximación de Guiniers) para la concentración de 1775 μM podría indicar micelas globulares (**Figura 18.C**). Las diferencias presentadas entre las curvas de 300-600 μM y la de 1775 μM podría deberse al hecho de que las micelas posean distinta geometría a las concentraciones mencionadas. Como dichas diferencias ocurren en el rango de concentraciones en las cuales las APTs no son activas (**Figura 18.A y B**), probablemente indique que cambios en la estructura del sustrato lipídico afectan severamente la interacción enzima-sustrato. Es así que este fenómeno no fue observado cuando el detergente zwitteriónico CHAPS se agregó a la mezcla de reacción (**Figura 18.A y B**), el cual podría eventualmente llevar a la formación de micelas mixtas.

Luego de la caracterización bioquímica y enzimológica de APT1 y APT2 recombinantes, evaluamos el efecto de 2-BP sobre la actividad enzimática de dichas proteínas (**Figura 20.A y B**).

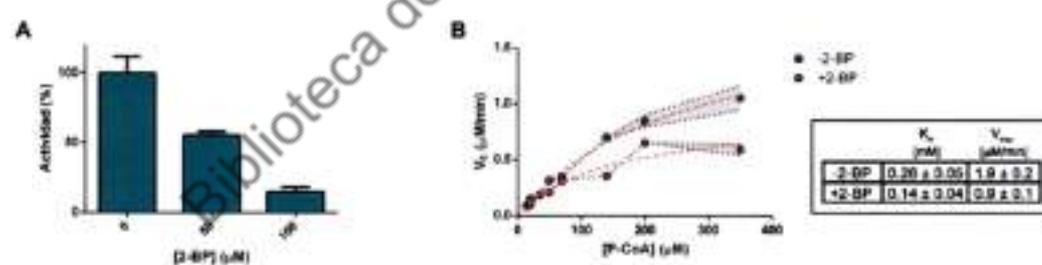


Figura 20. Inhibición *in vitro* de APT1 con 2-BP. A) La velocidad inicial de la actividad hidrolasa sobre palmitoil-CoA fue medida con 0,5 μg de APT1 recombinante en presencia de 50 o 100 μM de 2-BP o DMSO (vehículo), con dicha condición control tomada como el 100% de actividad. B) La velocidad inicial de la actividad hidrolasa fue medida utilizando 0,5 μg de APT1 recombinante en presencia de 50 μM de 2-BP (+2-BP) o en presencia de DMSO (vehículo, -2-BP). Los datos mostrados son experimentos representativos realizados por triplicado. Las curvas fueron ajustadas según la ecuación de Michaelis-Menten para cada grupo de datos. Los parámetros cinéticos (K_M y V_{max}) se muestran en la tabla.

Como se muestra, hubo una drástica y significativa reducción de la actividad de APT1 cuando la reacción se llevó a cabo en presencia de 50 y 100 μM de 2-BP, a través de un

mecanismo de inhibición acompetitivo (V_{max} y K_M disminuyen). Por lo tanto, de acuerdo a este tipo de inhibición, el 2-BP se uniría al complejo enzima-sustrato. En el caso de APT2, hubo una inhibición de 17% y 30% al realizar la reacción en presencia de 50 y 100 μM de 2-BP, respectivamente (datos no mostrados).

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

DISCUSIÓN

En este capítulo del trabajo de tesis, demostramos que el tratamiento *in vivo* con 2-BP, además de inhibir la actividad PAT, afecta el recambio de palmitato de GAP-43 inhibiendo a las enzimas tioesterasas. En particular, observamos que el 2-BP impide la S-acilación en un rango de concentraciones que van desde 25 a 150 μM . Asimismo, la asociación a membranas de Golgi de ^{35}S GAP-43(C3S), la cual es dependiente de su estado de palmitoilación, disminuye significativamente durante el tiempo de tratamiento con 2-BP, revelando una vida media de asociación a membranas que es proporcional a la concentración de dicho inhibidor. Un resultado similar fue observado para GAP-43 diacilada.

Para el 2-BP, que es altamente reactivo con los grupos tioles, ha sido demostrada su capacidad de alquilar una variedad de proteínas de membrana a través de mecanismos no específicos y no competitivos [82]. Como se mencionó previamente, se desconoce la manera en la que el 2-BP ejerce esta función, aunque debido a su naturaleza hidrofóbica podría insertarse en las membranas celulares y desde allí tener acceso a proteínas asociadas a dichas membranas perturbando su función. Adicionalmente, el inhibidor podría actuar indirectamente modificando el entorno lipídico de proteínas integrales de membrana, como las PATs, afectando sus propiedades catalíticas. Es importante recalcar que el 2-BP también podría afectar el metabolismo lipídico en general, y la S-acilación de proteínas en particular, reduciendo los niveles intracelulares de palmitoil-CoA, sustrato donador necesario para la palmitoilación [76, 78]. Por lo tanto, las evidencias indican que el 2-BP produce múltiples efectos en el metabolismo celular.

El análisis enzimático presentado con las APTs recombinantes, indica claramente que existe una inhibición por parte del 2-BP. Los resultados obtenidos nos permiten especular que dicho compuesto afecta la actividad tioesterasa a través de un mecanismo acompetitivo modificando el complejo enzima-sustrato mediante alquilación.

Trabajos recientes reportaron que tanto APT1 como APT2 se palmitoilan en cysteína 2 [66, 67], lo cual tendría consecuencias en la localización de estas enzimas en estado estacionario y en la función de dichas tioesterasas. Sin embargo, evidencias experimentales de nuestro laboratorio, obtenidas a través de ensayos bioquímicos y de biología celular en células CHO-K1, demostraron que las APTs son principalmente enzimas citosólicas con un alto carácter hidrofílico (**Figura 19**). Es importante destacar que, a pesar de reportar una distinta localización subcelular de estas enzimas en células MDCK, Vartak y colaboradores [67] proponen un modelo en el cual la enzima citosólica sería la encargada de llevar a cabo la

función de deacilación de proteínas en MP. Asimismo, la cisteína palmitoilada reportada en estos estudios no está conservada en todas las especies [69], con lo cual esta modificación no sería indispensable para la funcionalidad de las APTs.

Con este panorama, es probable que APTs no aciladas puedan asociarse transientemente con la interfase membrana-citosol con el fin de llevar a cabo su actividad sobre las proteínas asociadas a membranas. De acuerdo con esto, APT1 y APT2 recombinantes (que no son aciladas en bacterias) hidrolizaron el sustrato palmitoil-CoA en su forma monomérica y micelar. En contraste con lo que fue reportado para algunas enzimas fosfolipasas y lipasas [112, 113], observamos que estas enzimas no poseen activación interfásial, como ya había sido descrito para APT1 con respecto a su actividad como lisofosfolipasa sobre lisofosfatidilcolina [57]. Sin embargo, los resultados demuestran que cambios en la estructura del sustrato lipídico afectan drásticamente la interacción APTs-sustrato.

A través de la utilización de microscopía de fluorescencia confocal en células vivas, demostramos que la deacilación de la mutante monoacilada ³⁵S-GAP-43(C3S), fue mucho más rápida (minutos) que la de su contraparte diacilada GAP-43 (horas), incluso cuando se compararon con las dosis más altas de 2-BP. Un comportamiento similar fue observado para las isoformas palmitoiladas de Ras en células NIH-3T3 [9, 98, 114]. La vida media de recambio de palmitato es de 20 minutos para N-Ras monoacilada, mientras que la misma resulta de 2,4 horas para H-Ras diacilada. De esta manera, la doble acilación sería la responsable de la prolongación de dicha vida media, sugiriendo que las especies monoaciladas son mejores sustratos para las tioesterasas.

Sin embargo, se debe mencionar que en estado estacionario la fracción monoacilada de GAP-43 es mayoritaria con respecto a la dipalmitoilada [16], sugiriendo que la doble palmitoilación no es un mecanismo eficiente. En consecuencia, nuestra hipótesis es que un rol fisiológico de las APTs podría ser la deacilación de sustratos monoacilados, que podrían volver a sufrir otro ciclo de acilación o, eventualmente, ser degradadas en proteosomas [35, 115, 116].

En conclusión, nuestros resultados indican que el 2-BP debería ser utilizado cuidadosamente en el estudio del rol de las PATs en la regulación y función de la palmitoilación de proteínas, evitando una interpretación errónea de los análisis cinéticos, ya que esta droga inhibe también la deacilación. No obstante, condiciones experimentales controladas podrían resultar beneficiosas a partir de la utilización del 2-BP con el fin de

“congelar” el recambio de palmítico de proteínas dinámicamente palmitoíadas. Esto podría permitir la investigación de la importancia de la acilación/deacilación dinámica en la función de dichas proteínas.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

Los resultados de este capítulo forman parte de la publicación:

2-Bromopalmitate Reduces Protein Deacylation by Inhibition of Acyl-Protein Thioesterase Enzymatic Activities

Maria P. Pedro, Aldo A. Vilcaes, Vanesa M. Tomatis, Rafael G. Oliveira, Guillermo A. Gomez, Jose L. Daniotti

PLoS ONE 8(10): e75232 (2013)

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

CAPÍTULO II

Las proteínas Ras son GTPasas monoméricas que conectan estímulos extracelulares con procesos intracelulares vitales a través de la activación de diferentes vías de señalización. *RAS* se encuentran mutados en aproximadamente 20-30% de los tumores humanos, siendo los primeros genes descritos y los más comúnmente mutados en cáncer, por lo que la inhibición de su actividad oncogénica ha sido estudiada desde hace varias décadas [100].

Las estrategias que pretenden inhibir la señalización oncogénica de Ras buscan prevenir la formación del complejo Ras-GTP interfiriendo con la proteína GEF o bloqueando a Ras en su estado inactivo, impedir la interacción de Ras con diferentes efectores o perturbar la localización subcelular de Ras para prevenir dicha interacción [117].

Esta última estrategia se basa en la observación de que las proteínas Ras requieren de su asociación a membranas celulares para ejercer su actividad, convirtiendo dicha asociación en un importante blanco para el desarrollo de terapias anti-Ras [117, 118]. En particular, la distribución en endomembranas es una característica esencial de la biología de estas proteínas, y los ciclos de acilación/deacilación son necesarios para mantener la correcta localización subcelular de las isoformas palmitoiladas N-Ras y H-Ras [32, 33].

Por lo tanto, el balance entre las actividades de las enzimas PATs y APTs, podrían resultar en una distribución diferencial o heterogénea de las especies palmitoiladas. Antecedentes al respecto demostraron que perturbaciones en los ciclos de acilación/deacilación de las proteínas Ras producen reversión fenotípica de células epiteliales transformadas con H-Ras oncogénica e inhiben el crecimiento de células hematopoyéticas y células de melanoma con N-Ras mutada [74, 90, 91]. De acuerdo con estas observaciones, un estudio reciente de rastreo de RNAi identificó a APT2 como candidato en la regulación de H-Ras oncogénica [119]. De manera similar, APT1 y APT2 se encuentran sobreexpresadas en células de leucemia linfocítica crónica promoviendo la depalmitoilación del receptor de muerte celular CD95 (Fas/APO-1) e impidiendo la apoptosis mediada por dicha proteína [120]. Estos trabajos resaltan la importancia de un rol regulatorio de las APTs en determinados mecanismos moleculares que dan lugar a distintas respuestas celulares.

Debido a impedimentos técnicos, la fracción de proteínas "S-acilables" que se encuentran realmente palmitoiladas en un determinado contexto, es desconocida. Los antecedentes que abordan este interrogante son escasos, habiéndose estudiado por espectrometría de masa la población no acilada, monoacilada y diacilada de GAP-43 [16] y, a través de modelos *in silico*, las especies palmitoiladas o no de calnexina [13].

Teniendo en cuenta dichos antecedentes, y con la hipótesis que las especies no acilada y monoaciladas de H-Ras existen al menos de manera transiente (pudiendo coexistir con la especie diacilada en determinadas condiciones), nos focalizamos en el estudio de la deacilación mediada por APTs de las distintas especies palmitoiladas de H-Ras y cómo dichas tioesterasas afectan la localización subcelular y la afinidad por membranas de la GTPasa. Además, en esta sección, estudiamos la dinámica y el tráfico intracelular de estas especies diferencialmente lipidadas y especulamos las consecuencias que esto podría tener en la función de H-Ras y en la activación de efectores en las cascadas de señalización.

Estos experimentos se encuadran dentro del segundo y tercer objetivo de esta tesis: analizar el efecto en las variaciones de los niveles de APTs sobre la asociación a membranas y distribución subcelular de la proteína modelo H-Ras y determinar las consecuencias de las variaciones en los niveles de APTs sobre la actividad y dinámica intracelular de dicha proteína.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

Distribución diferencial de mutantes de S-acilación de H-Ras en endomembranas de distintas líneas celulares

Como se mencionó anteriormente, en trabajos previos de nuestro laboratorio, se demostró que H-Ras está localizada, además de en la cara citoplasmática de la MP, en ER de células CHO-K1 [97]. Por el contrario, diversos trabajos reportan la localización de H-Ras en MP y complejo de Golgi [32, 98, 110, 111, 121], sugiriendo una distribución de la GTPasa característica según el tipo celular empleado.

Para comprender cómo los ciclos de acilación/deacilación contribuyen a la distribución subcelular particular de H-Ras, decidimos caracterizar en detalle esta localización y el proceso de S-acilación de dicha GTPasa utilizando mutantes de monoacilación (en cisteínas 181 o 184), comparándolas con la mutante no acilable (mutante C181,184S) así también como con la versión salvaje de la proteína. De esta manera podremos conocer si la cantidad y la posición de palmitatos que modifican a H-Ras tienen alguna influencia en la asociación a membranas y en la localización subcelular de la proteína en distintas líneas celulares.

En células CHO-K1 la versión salvaje de la GTPasa se localizó en MP y ER, colocalizando con Transferrina-Alexa Fluor 647 y no con los marcadores de TGN y Golgi proximal GalNAc-T y Sial-T2, respectivamente (**Figura 21**). En contraste, H-Ras(C181S) se encontró predominantemente en membranas de Golgi, mostrando una colocalización parcial con ambos marcadores, con muy poca presencia en MP. Resulta interesante que la otra mutante de monoacilación, H-Ras(C184S), se localizó en MP y en complejo de Golgi. Finalmente, la mutante no palmitoilada H-Ras(C181,184S), se encontró en complejo de Golgi y en endomembranas que reconocemos como RE. Como fue previamente demostrado para GAP-43, la doble acilación parece ser una señal de transporte a ER, ya que ninguna de las mutantes de acilación se encuentra en dicha organela [70]. Nuestros resultados están de acuerdo con lo previamente descrito para estas mutantes en otras líneas celulares [32, 98, 110, 122], e indican un rol diferencial en cuanto a la localización subcelular por parte de los sitios de acilación de H-Ras.

El análisis de la localización de las variantes de H-Ras en células COS7 (**Figura 22**), NIH-3T3 (**Figura 23**) y HeLa (**Figura 24**), reveló una distribución similar a la observada en células CHO-K1 para las mutantes. Sin embargo, H-Ras diacilada fue detectada en MP y complejo de Golgi en dichas líneas celulares, con poca o nula presencia en ER.

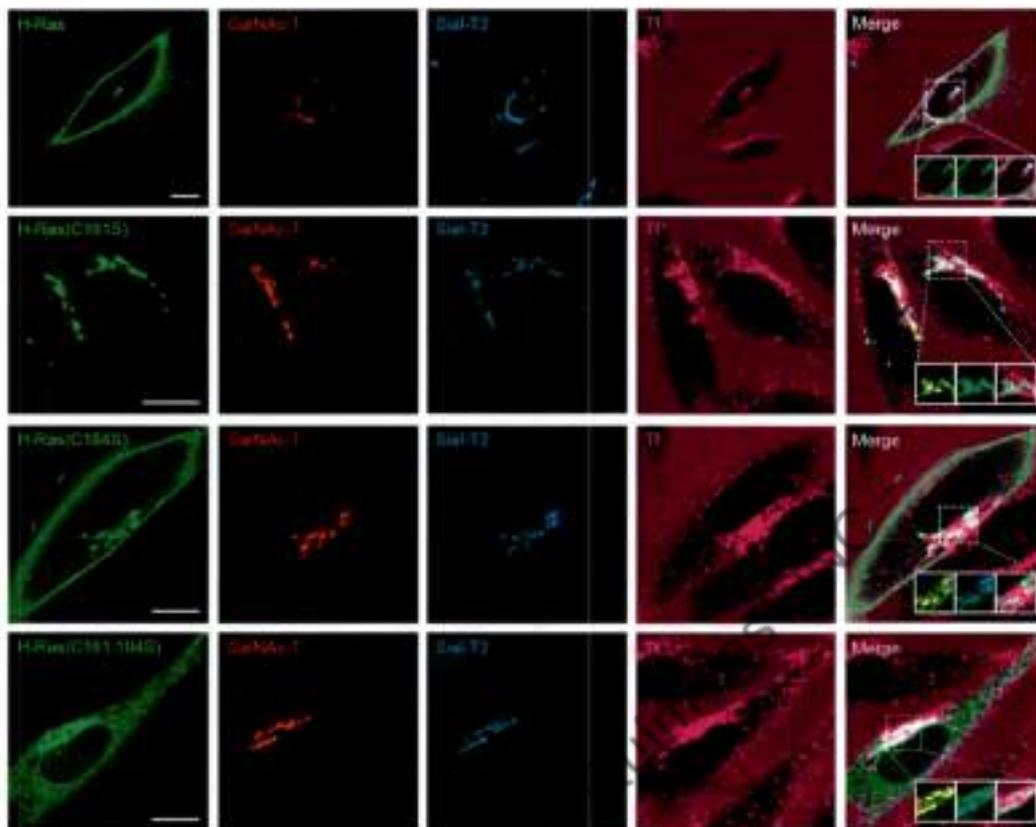


Figura 21. Análisis de la localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células CHO-K1. Células CHO-K1 fueron transfectadas con H-Ras, H-Ras(C181S), H-Ras(C184S) o H-Ras(C181,184S)-YFP (pseudocoloreadas en verde) y los marcadores de Golgi GalNAc-T-Cherry (pseudocoloreada en rojo) y Sial-T2-CFP (pseudocoloreada en cyan). Posteriormente fueron incubadas con Transferrina-Alexa Fluor 647 (pseudocoloreada en magenta) y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal. Los recuadros muestran ampliaciones de la región marcada, para evidenciar la colocalización. Las barras de escala representan 10 μm .

Las diferencias observadas entre estas variantes de H-Ras, podrían ser una consecuencia de una distinta afinidad por membranas celulares y/o diferencias en las modificaciones postraduccionales (más precisamente en la S-acilación). Para comprobar estas posibilidades, llevamos a cabo experimentos bioquímicos para analizar la asociación a membranas y la palmitoilación de las variantes de H-Ras expresadas en células CHO-K1.

Dichos experimentos, demostraron que H-Ras, H-Ras(C181S), H-Ras(C184S) y H-Ras(C181,184S), particionan preferentemente a la fracción particulada (P) luego de una ultracentrifugación a 400000 g (**Figura 25.A**). Esto indica que, todas las mutantes de palmitoilación se asocian a membranas celulares, tal como lo hace la proteína salvaje. De esta manera, y como H-Ras(C181, 184S) se encuentra también en la fracción P, la presencia y la cantidad de palmitato asociado a la proteína, no sería necesario para dicha asociación,

contrario a lo que había sido reportado [98, 108, 123]. Además, todas las versiones de H-Ras se encontraron enriquecidas en la fase detergente luego de una partición con Tritón X-114 (**Figura 25.B**), experimento que puede ser tenido en cuenta cómo una medida del grado en que estas proteínas han sido modificadas por lipidación [97], indicando un alto carácter hidrofóbico de dichas proteínas, incluso si la misma se encuentra modificada sólo con farnesilo.

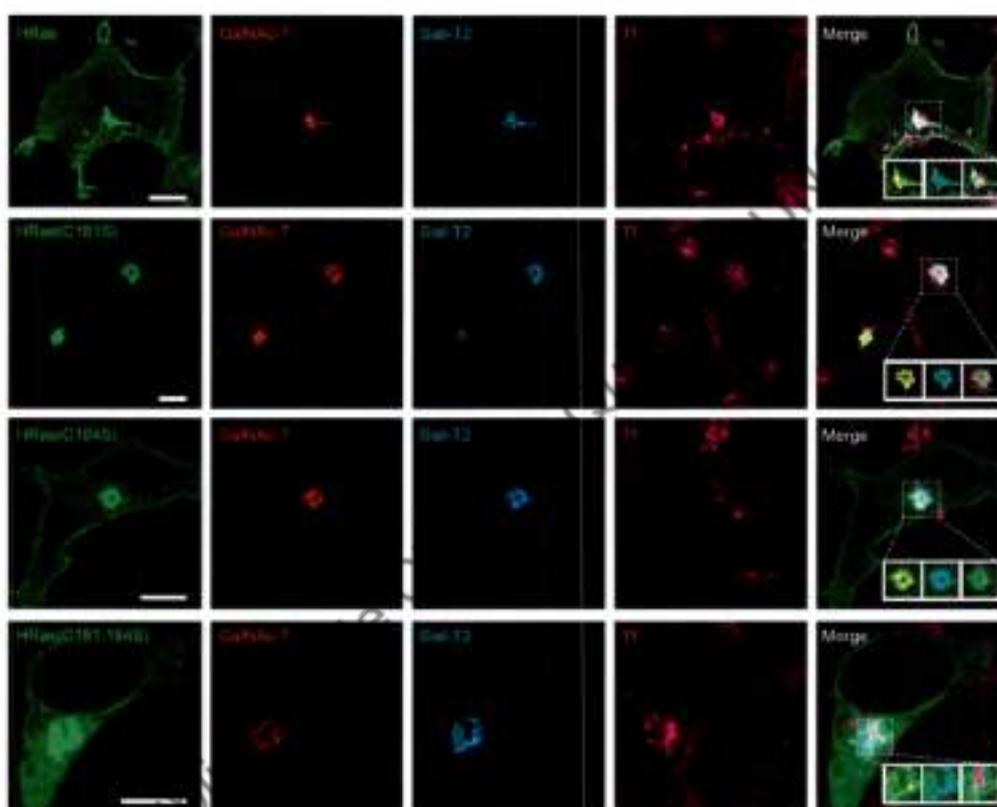


Figura 22. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células COS7. (Ver leyenda Figura 21).

Como los experimentos de microscopía demuestran que H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S) tienen un comportamiento diferencial cuando se las compara con H-Ras(C181,184S), esto podría sugerir que las mismas se encuentran S-aciladas. Para contestar esta pregunta, utilizamos dos metodologías independientes. En primer lugar, evaluamos la S-acilación de las mutantes por el método de ABE (**Figura 7**) [81], lo cual nos permitió confirmar la S-acilación de las mutantes monoaciladas (**Figura 25.C**).

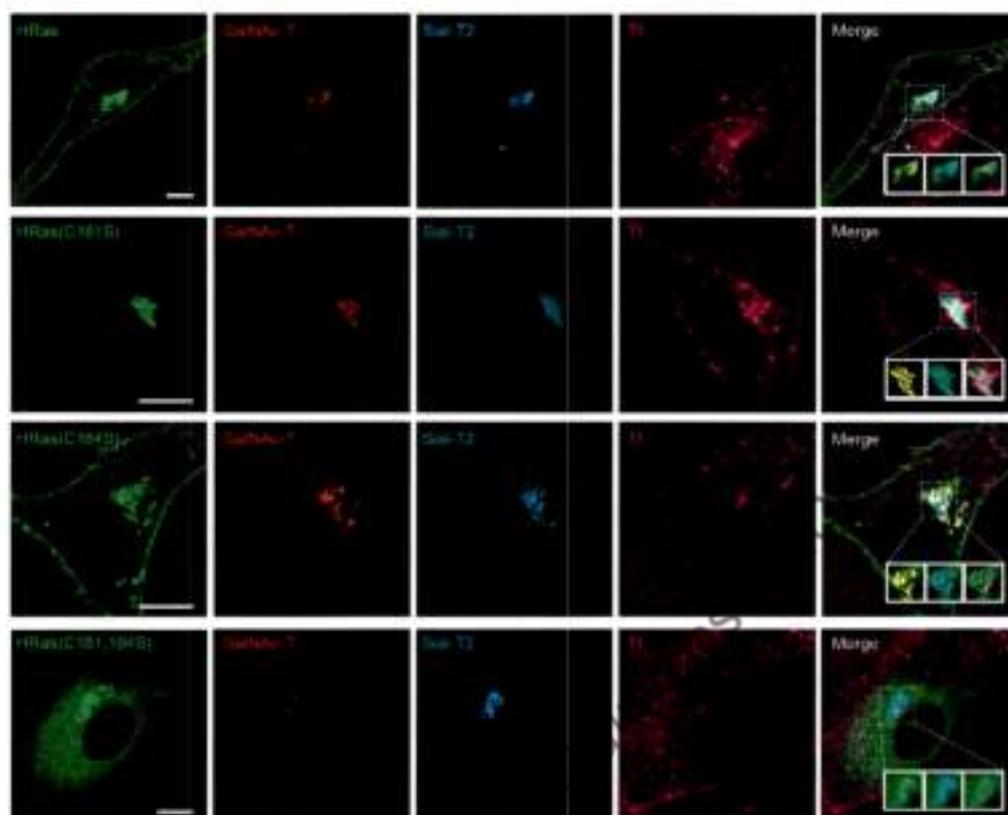


Figura 23. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células NIH-3T3. (Ver leyenda Figura 21).

Por otra parte, a través de un experimento de síntesis sincronizada de proteínas (Figura 14.A) [70] en presencia de 2-BP, investigamos el rol de la S-acilación *de novo* de las variantes di, mono y no acilada de H-Ras sobre la localización subcelular de las mismas.

Por análisis de las células transfectadas por microscopía de fluorescencia confocal, observamos que la asociación a MP de H-Ras, H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S), se ve significativamente disminuida por el tratamiento con 50 μ M de 2-BP (Figura 25.D). Sin embargo, dichas proteínas se encontraron asociadas a membranas de complejo de Golgi y RE, de acuerdo con la distribución observada para la mutante no acilada H-Ras(C181,184S) (Figura 21). Como era esperado, la incubación con 2-BP, no afectó a la localización subcelular de dicha mutante (Figura 25.D). Notoriamente, el efecto de 2-BP en la asociación a membranas de H-Ras sintetizada *de novo*, demuestra y confirma la importancia de la S-acilación y su dinámica para alcanzar una correcta localización subcelular. La proteína farnesilada, pero no palmitoilada, se localiza en RE y complejo de Golgi, tal como fue

descripto para el motivo CAAX [110], lo cual indica que el procesamiento de dicho motivo es necesario pero no suficiente para una correcta localización subcelular y para la asociación a MP [108]. A su vez, los resultados están de acuerdo con el concepto de que H-Ras, una vez sintetizada, se asocia, al menos de manera transiente, a RE y Golgi, en donde se localizan las enzimas para su posterior procesamiento (**Figura 13**). Esta distribución no se observa en estado estacionario, indicando el dinamismo con el que ocurre.

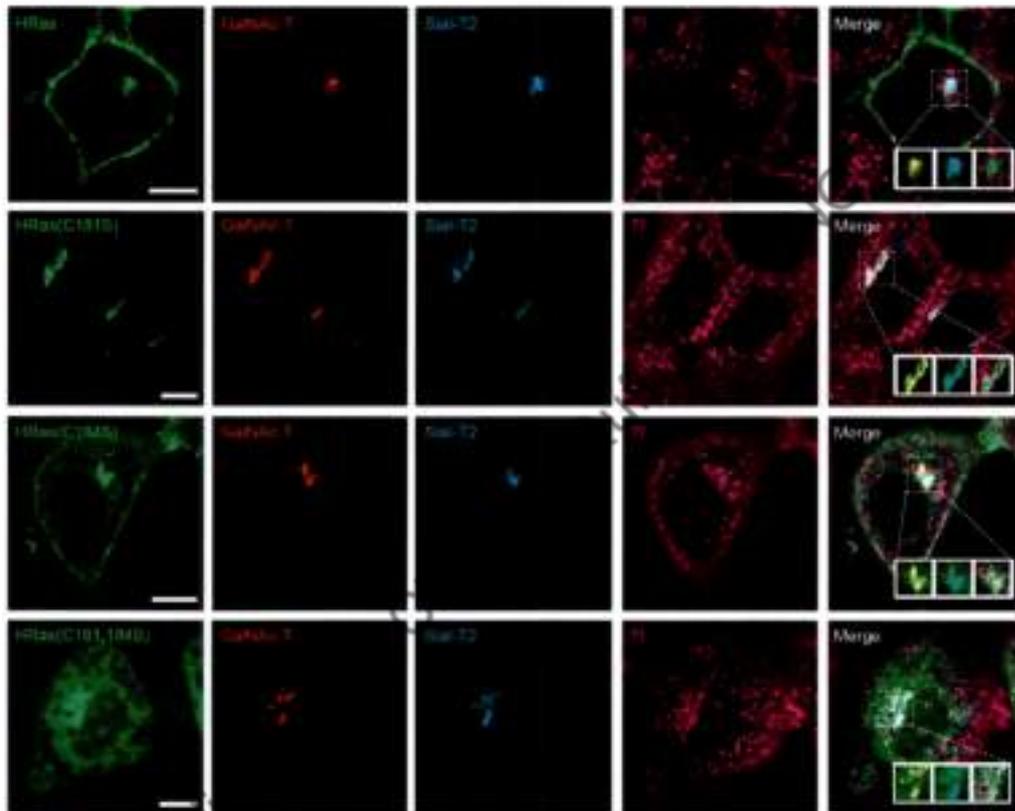


Figura 24. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células HeLa. (Ver leyenda Figura 21).

En conjunto, los datos de microscopía y bioquímicos demuestran que la S-acilación de H-Ras no es esencial para que dicha proteína se asocie a membranas celulares, pero sí es indispensable para una correcta localización subcelular. Tanto la estequiometría como la posición de los palmitatos tienen una gran influencia en dicha localización, que parecería depender del tipo celular analizado. Para GAP-43 se demostró en nuestro laboratorio que las mutantes monoaciladas en cisteína 3 o cisteína 4 no poseen la misma localización subcelular, probablemente debido a una ineficiente palmitoilación de la proteína en cisteína 3 [35]. En

el caso de H-Ras, la hidrofobicidad del grupo prenilo y de los ácidos grasos, así también como el espaciamiento entre ellos, serían relevantes para una apropiada distribución de la GTPasa.

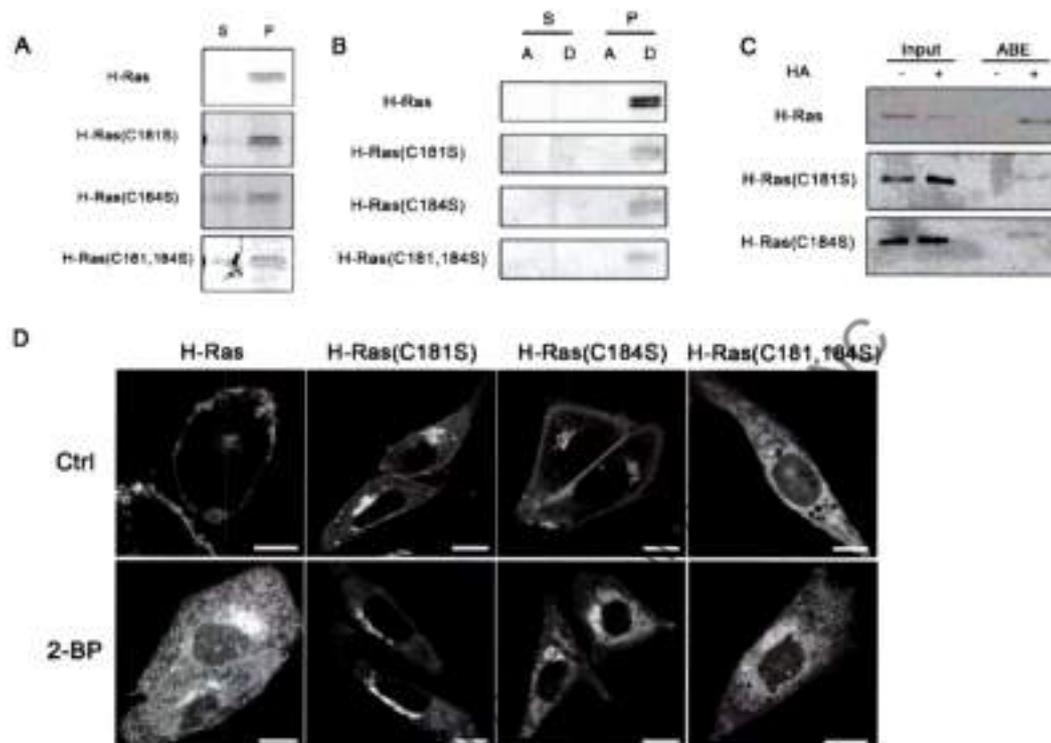


Figura 25. Asociación a membranas y S-acilación de las variantes de palmitoilación de H-Ras en células CHO-K1. A) Experimento de *pellet/sobrenadante*. Células CHO-K1 expresando H-Ras, H-Ras(C181S), H-Ras(C184S) o H-Ras(C181,184S) fueron lisadas, ultracentrifugadas y las fracciones sobrenadante (S) y *pellet* (P) fueron aisladas. Las proteínas de dichas fracciones fueron analizadas por Western blot con un anticuerpo anti-GFP. B) Experimento de partición en Tritón X-114. Células CHO-K1 expresando H-Ras, H-Ras(C181S), H-Ras(C184S) o H-Ras(C181,184S) fueron lisadas, ultracentrifugadas y las fracciones sobrenadante (S) y *pellet* (P) fueron aisladas. A dichas fracciones se les añadió buffer conteniendo 1% de Tritón X-114 y se indujo la separación de fases incubando a 37°C. Las proteínas de la fase acuosa (A) y detergente (D) fueron analizadas por Western blot con un anticuerpo anti-GFP. C) Experimento de ABE. Células CHO-K1 transfectadas con H-Ras, H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S) fueron lisadas e incubadas con NEM para bloquear los tioles libres. Posteriormente se trataron las alícuotas con buffer conteniendo o no hidroxilamina. Luego de la incubación con HPDP biotina se procedió al *pull-down* con estreptavidina agarosa y análisis por Western blot. Los blots muestran las alícuotas analizadas antes (Input) y después (ABE) del *pull-down*, en condiciones sin (-HA) y con (+HA) hidroxilamina. El Western blot se realizó con un anticuerpo anti-GFP. D) Imágenes representativas de H-Ras, H-Ras(C181S), H-Ras(C184S) y H-Ras(C181,184S)-YFP (pseudocoloreadas en gris) en donde se muestra el efecto del tratamiento con 50 μM de 2-BP o DMSO (Ctrl) sobre la asociación a MP de las proteínas en células CHO-K1. El esquema mostrando los pasos del protocolo experimental realizado se muestra en la Figura 14.A. Las barras de escala representan 10 μm.

Las mutantes de acilación de H-Ras constitutivamente activas producen activación de Erk1/2

Como nuestros resultados demuestran que la doble acilación de H-Ras no es indispensable para que la proteína se asocie a membranas celulares, decidimos investigar si las mutaciones en los sitios de acilación afectan la capacidad de la GTPasa de interactuar con los efectores para activar una determinada cascada de señalización. Para esto, generamos las mutantes constitutivamente activas reemplazando Gly 12 por Val (G12V). Dicha mutación está descrita como una de las que impide la acción GTPasa de H-Ras mediada por las proteínas GAPs.

Analizando la localización subcelular de las mismas en células CHO-K1, no se observaron cambios significativos de estas versiones oncogénicas con respecto a las versiones sin la mutación (**Figura 26**).

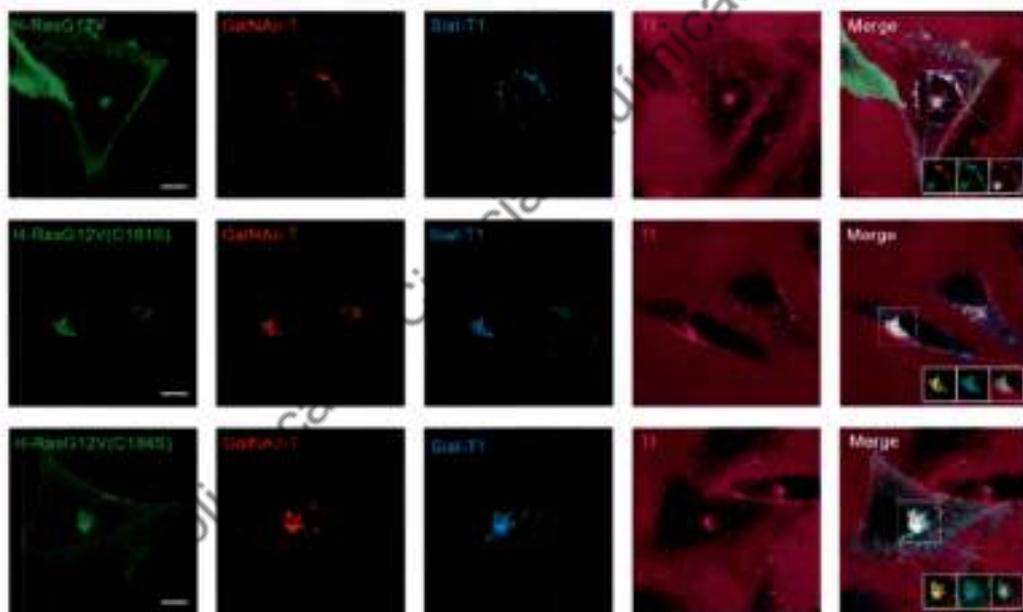


Figura 26. Localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-RasG12V en células CHO-K1. (Ver leyenda Figura 21). En este caso se utilizó Sial-T1 como marcador de cis-Golgi.

Células CHO-K1 transfectadas o no con dichas construcciones, fueron incubadas en medio de cultivo sin suero fetal bovino y procesadas para el análisis por Western blot. De esta manera, observamos que no hay diferencias significativas entre la fosforilación de Erk1/2 (indicativa de la activación de esta quinasa) en las células que expresan la versión diacilada con respecto a las mutantes monopalmitoiladas (**Figura 27.A y B**). Este resultado

indica que el estado de acilación no afecta la actividad de H-Ras en señalización y que, a pesar de tener distinta localización subcelular, H-Ras, H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S), son capaces de activar Erk1/2 en igual medida. Sin embargo, la membrana celular desde la cual estas proteínas inician el proceso de señalización podría tener consecuencias distintas en cuanto a la cinética de activación, los efectores reclutados en determinada localización subcelular y la propagación de la señal en una vía en particular [96, 121, 124].

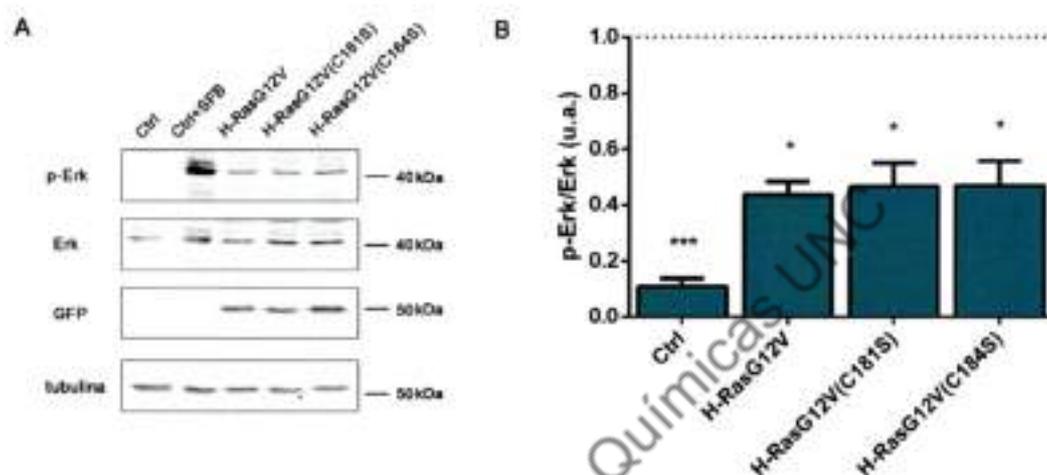


Figura 27. Activación de Erk1/2 por variantes de acilación de H-Ras. A) Células CHO-K1 no transfectadas (Ctrl) o transfectadas con H-RasG12V, H-RasG12V(C181S) o H-RasG12V(C184S)-YFP, fueron incubadas en medio sin suero y lisadas para su posterior análisis por Western blot. Una condición control fue utilizada incubando las células con 10% de suero (Ctrl + SFB) durante 10 minutos, con el fin de evidenciar la fosforilación de Erk1/2. Los blots muestran la señal obtenida por la incubación de los mismos con anticuerpos anti-Erk1/2 fosforilada (p-Erk), anti-Erk1/2 totales (Erk), anti-GFP (GFP) y anti-tubulina (tubulina) como control de carga. A la derecha se muestran los pesos moleculares en kDa. La imagen es representativa de 3 experimentos realizados independientemente. B) Cuantificación de A. Las barras muestran el promedio de la intensidad de la señal de Erk fosforilada en relación al total de Erk obtenida en 3 experimentos independientes \pm SEM. La línea de puntos indica el valor relativo del control (Ctrl + SFB). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

APT1 y APT2 deacilan H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S) en MP

Después de haber demostrado la importancia de la S-acilación en la localización subcelular de H-Ras, decidimos estudiar la reacción de deacilación de dicha proteína. Más específicamente, nos planteamos indagar el rol de las tioesterasas citosólicas en este proceso.

Con este fin, decidimos investigar el efecto de la actividad de APT1 y APT2 en la distribución de las variantes de palmitoilación de H-Ras. Para esto, células CHO-K1 fueron transfectadas con H-Ras, H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S) unidas a YFP, y tratadas con cicloheximida 1 hora previo al inicio del experimento. Luego, las células fueron incubadas con 50 μ M de 2-BP, de tal manera de inhibir la actividad PAT, pero no la APT, según los

datos obtenidos en el capítulo I de esta tesis. La localización subcelular de las variantes de H-Ras fue monitoreada por microscopía de fluorescencia confocal durante 150 minutos. El protocolo experimental utilizado se detalla en la **Figura 15.A**, con algunas modificaciones.

Los resultados muestran que la fluorescencia de H-Ras en MP permanece constante durante el tiempo del análisis, sin notorias diferencias con las células que sobreexpresan APT1 o APT2 (**Figura 28.A y B**). Esto no implica que dicha proteína no sufra deacilación, sino que posiblemente este evento no ocurre en la ventana de tiempo analizada. A favor de esta hipótesis, un cambio significativo se observó en la localización subcelular de H-Ras coexpresada con APT1 y APT2, cuando se la analizó a 3 y 6 horas post-incubación con 2-BP [35]. De esta manera, la cinética de deacilación de las versiones monoaciladas es considerablemente más rápida que la de H-Ras diacilada (ver más abajo), tal como fue demostrado anteriormente [123] para N-Ras comparada con H-Ras [91] y para GAP-43 en el capítulo anterior.

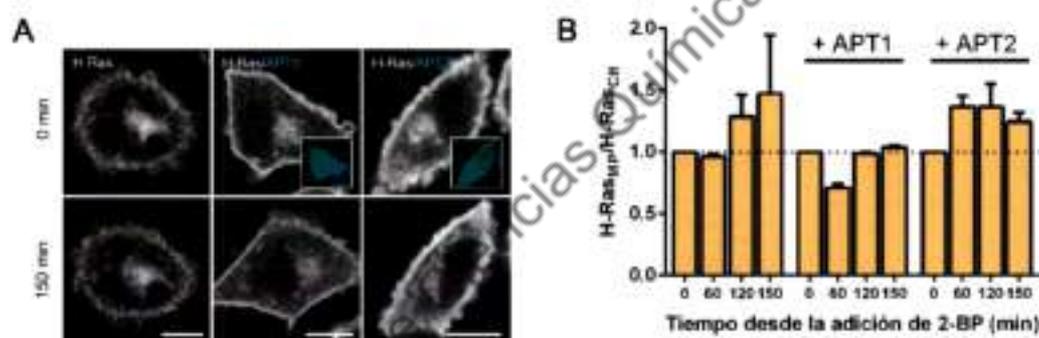


Figura 28. Deacilación de H-Ras. A) Células CHO-K1 fueron transfectadas con H-Ras-YFP o cotransfectadas con la GTRas y APT1 o APT2-CFP (pseudocoloreadas en cian, + APT1 y + APT2), y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal *in vivo*. Al comienzo del experimento, se agregó 50 μ M de 2-BP, el cual se mantuvo en el medio durante todo el procedimiento. Las imágenes que se muestran son fotos representativas tomadas al principio (0 min) y al final (150 min) de cada experimento. Los recuadros muestran la expresión de las APTs. Las barras de escala representan 10 μ m. B) Cuantificación de las imágenes obtenidas (para detalles ver Materiales y métodos). Las barras representan la fluorescencia en MP en relación a la fluorescencia en citosol en la célula (Cit) en función del tiempo a los distintos tiempos seleccionados. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM de 2 experimentos. El análisis estadístico no arrojó diferencias significativas en ningún caso. La línea de puntos representa el valor relativo al inicio del experimento.

En el caso de H-Ras(C181S), la fluorescencia en MP es casi imperceptible. Sin embargo, se puede observar en las imágenes mostradas una pérdida de la señal en dicha membrana a tiempo final (**Figura 29.A y B**). Asimismo, la fluorescencia intracelular (probablemente RE y citosol) aumenta en el tiempo, sugiriendo que esta variante de H-Ras se deacila en la MP (**Figura 29.A**). En contraste, la fracción de fluorescencia en complejo de

Golgi (la mayoritaria para esta proteína) fue significativa incluso al final del experimento, aunque se vio afectada por el agregado de 2-BP (Figura 29.A y C).

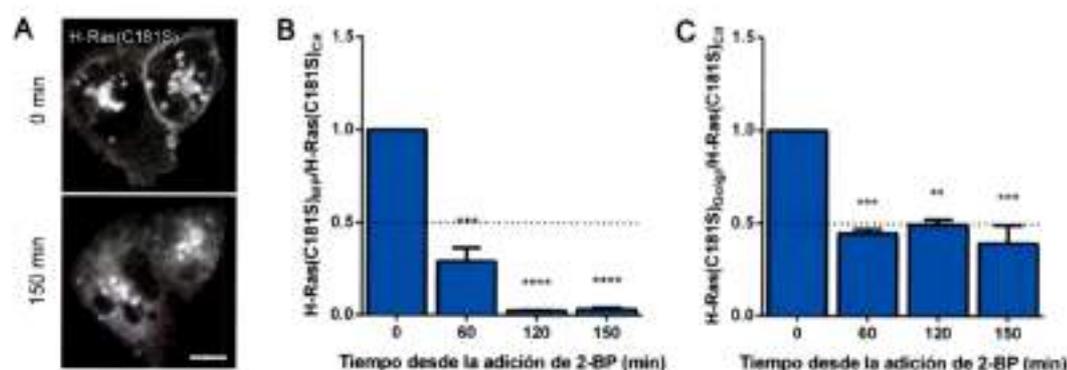


Figura 29. Deacilación de H-Ras(C181S). A) Células CHO-K1 fueron transfectadas con H-Ras(C181S)-YFP y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal *in vivo*. Al comienzo del experimento, se agregó 50 μ M de 2-BP, el cual se mantuvo en el medio durante todo el procedimiento. Las imágenes que se muestran son fotos representativas tomadas al principio (0 min) y al final (150 min) de cada experimento. La barra de escala representa 10 μ m. B y C) Cuantificación de las imágenes obtenidas (para detalles ver Materiales y métodos). Las barras representan la fluorescencia en MP (B) o complejo de Golgi (C) en relación a la fluorescencia en citosol en la célula (Cit) en función del tiempo a los distintos tiempos seleccionados. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM de 3 experimentos. La línea de puntos representa el 50% del valor relativo al inicio del experimento. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Por otra parte, la inhibición de la S-acilación modificó la presencia de H-Ras(C184S) en MP en menor medida que lo observado para H-Ras(C181S) (Figura 30.A y B). Asimismo, la fluorescencia de esta proteína en complejo de Golgi también disminuyó más lentamente que para la mutante monoacilada en cisteína 184 (Figura 30.C). Estos efectos se pueden observar claramente en las imágenes mostradas en las que a tiempo final tanto la marca en MP como en el complejo de Golgi es distinguible (Figura 30.A).

En conjunto, estos resultados sugieren que las poblaciones de H-Ras en MP y en complejo de Golgi se deacilan con dinámicas diferentes. Estos procesos dependerían además de la cantidad y posición de los residuos de cisteína acilables (H-Ras salvaje vs. mutantes monoaciladas). Mediante estos experimentos proponemos que la deacilación de H-Ras monoacilada en complejo de Golgi es menos eficiente que en MP. Es importante mencionar que la deacilación de los residuos C181 y C184 no serían equivalentes, lo cual estaría de acuerdo con la distribución diferencial de H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S).

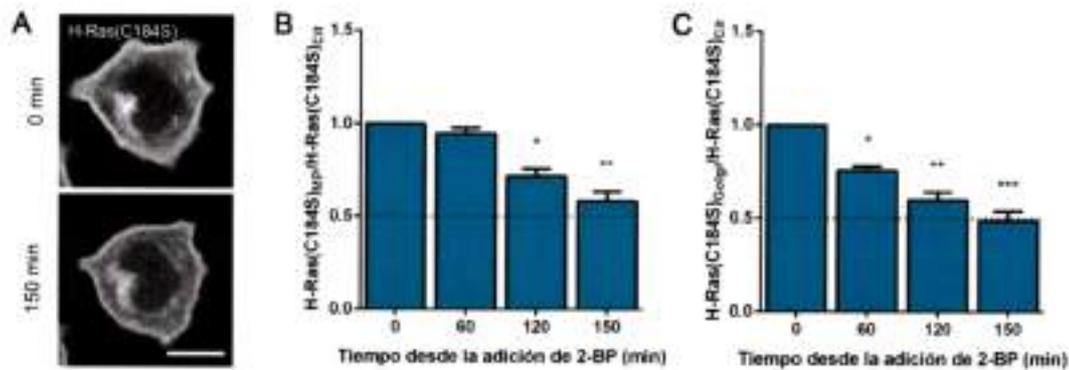


Figura 30. Deacilación de H-Ras(C184S). A) Células CHO-K1 fueron transfectadas con H-Ras(C184S)-YFP y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal *in vivo*. Al comienzo del experimento, se agregó 50 μM de 2-BP, el cual se mantuvo en el medio durante todo el procedimiento. Las imágenes que se muestran son fotos representativas tomadas al principio (0 min) y al final (150 min) de cada experimento. La barra de escala representa 10 μm . B y C) Cuantificación de las imágenes obtenidas (para detalles ver Materiales y métodos). Las barras representan la fluorescencia en MP (B) o complejo de Golgi (C) en relación a la fluorescencia en citosol en la célula (Cit) en función del tiempo a los distintos tiempos seleccionados. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM de 4 experimentos. La línea de puntos representa el 50% del valor relativo al inicio del experimento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Con el fin de explicar la diferencia observada con respecto a la deacilación de H-Ras en MP en comparación con la deacilación en complejo de Golgi, planteamos la hipótesis de que la misma podría deberse a diferencias en la interacción entre las APTs y su sustrato en estas dos localizaciones [67]. Si bien la deacilación de H-Ras mediada por APT1 y APT2 ha sido descrita anteriormente [35, 90], la interacción entre dichas proteínas no ha sido estudiada. Por lo tanto, para investigar si existe una interacción física entre las APTs y H-Ras asociada a membranas realizamos la técnica de microscopía de FRET (*Förster Resonance Energy Transfer*), cuyos datos proveen información que supera a la resolución de la microscopía óptica.

El proceso de FRET ocurre cuando un par de fluoróforos determinado (por ejemplo, CFP e YFP) se encuentran lo suficientemente cercanos y con una orientación específica, de tal manera que la excitación (y consecuente emisión) de uno de ellos (el fluoróforo considerado donador), resulta en la emisión "sensibilizada" del fluoróforo aceptor [125]. En el caso del par CFP/YFP, el espectro de emisión del donador CFP se solapa significativamente con el espectro de excitación del aceptor YFP. De esta manera, y como el FRET depende de la proximidad, las proteínas unidas a sendos fluoróforos deben encontrarse entre 1-10 nm de distancia para que se produzca la transferencia de energía. Esto puede ser interpretado como una interacción proteína-proteína, ya que las mismas ocurren en la misma escala

espacial. En este experimento se midió el proceso de FRET a través de la emisión sensibilizada del aceptor (que se produce en presencia del donador).

Por lo tanto, células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras-YFP y APT1-CFP o APT2-CFP. Como control positivo de FRET se utilizó una proteína quimérica formada por el fluoróforo CFP fusionado a YFP (datos no mostrados). El control negativo fue realizado transfecando las células con la GTPasa-YFP y el vector vacío de CFP. Como esta última proteína tiene una localización citosólica cuando se expresa en células, nos permite comparar los resultados con lo obtenido con las igualmente citosólicas APTs. Los análisis estadísticos fueron realizados, entonces, teniendo en cuenta estos controles.

El resultado del análisis realizado muestra que ambas tioesterasas citosólicas interactúan físicamente con H-Ras diacilada principalmente en MP y en menor medida en ER (**Figura 31A y B**). Por el contrario, no ocurre FRET entre las APTs y la mutante localizada exclusivamente en endomembranas, H-Ras(C181,184S) (**Figura 31A y B**).

En conjunto, los datos son consistentes con la idea de que el sustrato palmitoilado es necesario para que las enzimas tioesterasas interactúen con H-Ras, y que la deacilación ocurriría principalmente en MP. Como fue descrito anteriormente, dicha GTPasa sería sustrato tanto de APT1 como de APT2 [35]. Esto también es consistente con el hecho de que el inhibidor de las APTs, Palmostatin B, afecta severamente la localización subcelular de H-Ras [90].

Como se mencionó anteriormente, nuestros resultados muestran que la deacilación de los residuos C181 y C184 no es equivalente, sugiriendo una sensibilidad diferencial frente a la acción de las APTs. Antecedentes de nuestro laboratorio demostraron que las células CHO-K1 no expresan APT1, y que APT1 y APT2 no tienen la misma afinidad por la versión monoacilada de GAP-43 [35]. Por lo tanto, para conocer si las diferencias en la cinética de deacilación de las mutantes monoaciladas de H-Ras se deben a una distinta afinidad por las APTs, investigamos la depalmitoilación de dichas proteínas en células CHO-K1 que sobreexpresan APT1 o APT2, en presencia de 2-BP (**Figura 32**).

De esta manera encontramos que la sobreexpresión de las tioesterasas redujo significativamente la población de H-Ras(C184S) en MP acompañado de un notorio incremento en la fracción presente en RE, lo cual podría sugerir que existe una conexión entre dicha organela y MP (**Figura 32.B y E**). Esto a su vez indica que se produce la deacilación de la proteína, demostrando que APT1 y APT2 son capaces de depalmitoilar H-Ras monoacilada en cisteína 181. Además, APT2 demostró tener una mayor afinidad por

esta mutante que APT1, ya que la cinética de deacilación en presencia de la primera fue más rápida (Figura 32.E). En este caso, la fluorescencia de la proteína asociada a complejo de Golgi no se modificó en el tiempo (Figura 32.F). El incremento de la señal asociada a dicha organela que se observa en la Figura 32.B se vio acompañado de un aumento de la fluorescencia en RE, lo cual resulta en una relación constante entre estas dos fracciones en los tiempos analizados. A su vez, al ser dicha fluorescencia considerablemente mayor que en la condición sin la sobreexpresión de APT1 y APT2 (por una mayor deacilación), es posible que esto influya en la cuantificación del proceso, impidiendo una correcta delimitación de la fluorescencia que corresponde a complejo de Golgi.

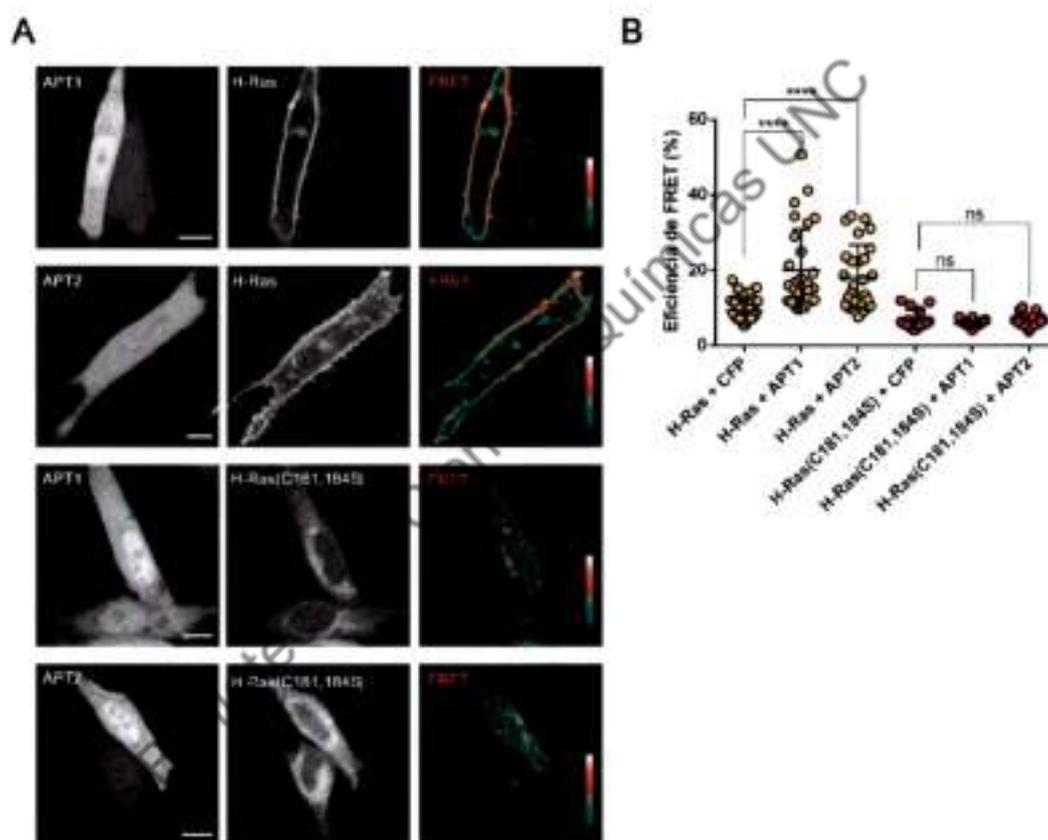


Figura 31. APT1 y APT2 interactan con H-Ras S-acylada. A) Células CHO-K1 fueron cotransfectadas con APT1 o APT2-CFP (donor, pseudocoloreadas en gris) y H-Ras o H-Ras(C181,184S)-YFP (aceptor, pseudocoloreadas en gris), y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal para realizar el experimento de FRET. La eficiencia de FRET fue evaluada por emisión sensibilizada del aceptor (FRET, tercera columna). Las imágenes mostradas son representativas de células que muestran señal de FRET. La barra con la escala de colores utilizada para representar el porcentaje de eficiencia se muestra en la esquina inferior derecha de cada panel. Las barras de escala representan 10 μ m. B) Cuantificación de A. Los datos muestran los valores de la eficiencia de FRET expresados como porcentaje. H-Ras + CFP y H-Ras(C181,184S) + CFP son los controles negativos empleados. El gráfico muestra un experimento representativo de 3 experimentos realizados independientemente. El número de células analizadas en cada caso es de aproximadamente 40. **** $p < 0,0001$; ns = no significativo.

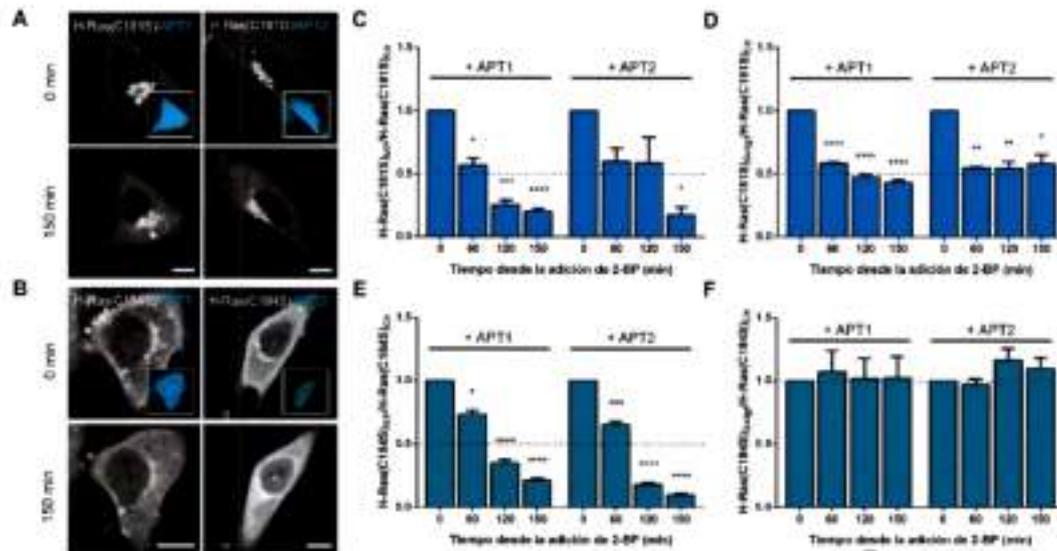


Figura 32. Efecto de APT1 y APT2 en la deacilación de H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S). A y B) Células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S)-YFP (A) o H-Ras(C184S)-YFP (B) y APT1 o APT2-EGFP (pseudocoloreadas en cian, + APT1 y + APT2) y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal *in vivo*. Al comienzo del experimento, se agregó 50 μ M de 2-BP, el cual se mantuvo en el medio durante todo el procedimiento. Las imágenes que se muestran son fotos representativas tomadas al principio (0 min) y al final (150 min) de cada experimento. La barra de escala representa 10 μ m. C, D, E y F) Cuantificación de las imágenes obtenidas (para detalles ver Materiales y métodos). Las barras representan la fluorescencia en MP (C y E) o complejo de Golgi (D y F) en relación a la fluorescencia en citosol en la célula (Citr) en función del tiempo a los distintos tiempos seleccionados. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM de 4-6 experimentos. La línea de puntos representa el 50% (C, D y E) o el 100% (F) del valor relativo al inicio del experimento. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, ****p<0,0001.

Sin embargo, como la Semaforación no es necesaria para la asociación de la proteína a Golgi, es probable que una importante fracción de H-Ras localizada en dicha organela, se encuentre deacilada. Por otra parte, es posible que esta versión monoacilada de la proteína se esté deacilando en membranas de Golgi (tal como lo hace la versión monoacilada de GAP-43), pero que el H-Ras deacilada tenga una rápida velocidad de intercambio entre Golgi y RE por eventos de unión reversible a membranas, tal como fue descrito anteriormente para la mutante H-Ras(C181,184S) [33]. De esta manera, la fluorescencia en complejo de Golgi permanecería constante, lo cual, siguiendo esta hipótesis, no quiere decir que se trate de una población estática.

En el caso de H-Ras(C181S), la pérdida de fluorescencia en MP resultó evidente, aunque no se vio incrementada con respecto a la condición sin la sobreexpresión de las tioesterasas (Figura 32.A y C). Esto puede deberse a que la fracción inicial en dicha membrana es casi imperceptible, lo cual lleva a una rápida pérdida de la señal produciendo que, si hubiera una diferencia en la cinética de deacilación debida a la sobreexpresión de

APT1 y APT2, no sea evidenciable según el diseño experimental empleado. Al igual que para H-Ras(C184S), observamos un incremento de la fluorescencia en membranas de RE (**Figura 32.A**), lo cual es una consecuencia del proceso de deacilación, aunque en este caso es mucho menor por la menor cantidad de esta proteína presente en MP inicialmente. Además, la cuantificación de la relación de la fluorescencia entre Golgi y citoplasma reveló un efecto similar al anteriormente observado para esta proteína (**Figura 29.C** y **Figura 32.D**), con lo cual existe un efecto de la deacilación por el agregado de 2-BP, pero el mismo no es significativamente incrementado debido a la sobreexpresión de las tioesterasas. A diferencia de lo analizado para la mutante monoacilada en cisteína 181, para esta proteína sí ocurre una disminución en la relación Golgi/citoplasma (y/o RE), lo cual podría deberse a una cantidad considerablemente menor en este último compartimento.

Las fracciones de las mutantes de monoacilación de H-Ras en MP, complejo de Golgi y RE son dinámicas e intercambiables

Además de las diferencias en la cinética de deacilación y la sensibilidad a la sobreexpresión de las APTs, un aspecto fundamental en el comportamiento de H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S) es la relación relativa en la localización en complejo de Golgi y MP de ambas mutantes. Esta distribución diferencial podría sugerir que la acilación en los residuos de cisteína 181 y 184 contribuyen de manera distinta a la dinámica de salida y/o entrada de Golgi. En este sentido, a pesar de que la deacilación resulta evidente en presencia de 2-BP (se observan cambios en la distribución subcelular aumentando significativamente la población de RE), la presencia y permanencia de las proteínas en Golgi es llamativa.

Por este motivo, quisimos investigar si la fracción de las mutantes monoaciladas de H-Ras encontrada en complejo de Golgi se corresponde con una fracción dinámica, según las posibilidades planteadas anteriormente. Esto lo hicimos a través de la técnica de microscopía de fluorescencia conocida como FLIP (*Fluorescence Loss In Photobleaching*).

Brevemente, en esta técnica se monitorea la pérdida de la fluorescencia en un área distinta a la región fotoapagada. El fotoblanqueo de la proteína se realiza de manera repetitiva en la zona seleccionada, mientras que se colectan imágenes de la totalidad de la célula. Si las moléculas fluorescentes pueden difundir al área apagada, la pérdida de la fluorescencia será notoria en ambos lugares, indicando que los mismos están conectados y que la proteína puede difundir entre ellos [125].

Por lo tanto, por FLIP podemos medir la salida de H-Ras de complejo de Golgi, tal como ha sido descrito en nuestro laboratorio para GAP-43 [70]. Con este fin, células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S)-YFP, y GalNAc-T-Cherry como control interno. Posteriormente, fueron tratadas con cicloheximida, para impedir la síntesis de proteína. Una región de la MP fue seleccionada e irradiada cada dos minutos durante 1 hora (Figura 33.A). La fluorescencia correspondiente al complejo de Golgi fue posteriormente cuantificada.

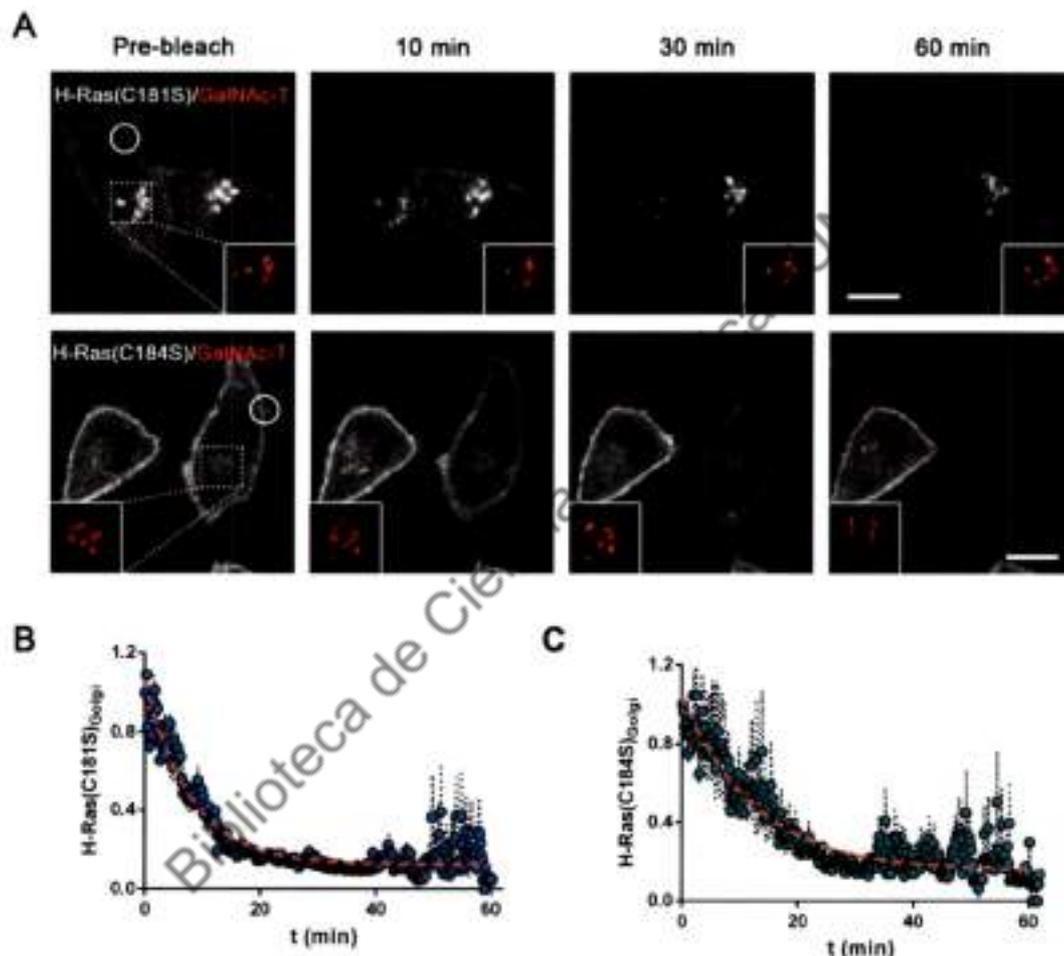


Figura 33. Intercambio entre las fracciones de MP y complejo de Golgi de las mutantes de monoacilación de H-Ras. A) Experimento de FLIP. Células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S)-YFP y GalNAc-T-Cherry como control interno (pseudocoloreada en rojo), y tratadas con CHX 1 hora previo al comienzo del experimento. Las imágenes mostradas son fotos representativas de lo observado a distintos tiempos (Pre-bleach, 10, 30 y 60 minutos). El *bleaching* fue repetido cada 2 minutos en la región indicada con el círculo blanco. Las barras de escala representan 10 μ m. B y C) Cuantificación de A. La fluorescencia en complejo de Golgi de H-Ras(C181S) (B) y H-Ras(C184S) (C) fue cuantificada como se indica en Materiales y métodos. Los datos están representados como el promedio \pm SEM de tres experimentos realizados independientemente. La línea roja representa el ajuste de los datos a una función de decaimiento exponencial.

De esta manera, observamos una importante disminución en la señal correspondiente a H-Ras(C181S) y H-Ras(C184S) asociada a complejo de Golgi, con una vida media de $5,5 \pm 0,2$ y $8,7 \pm 0,4$ minutos², respectivamente (**Figura 33.B y C**). Este resultado sugiere que las fracciones de proteína asociadas a MP y a complejo de Golgi están conectadas y son intercambiables. La cinética de salida de esta organela es más rápida para H-Ras(C181S), apoyando nuestra hipótesis de un rol diferencial en la acilación de las distintas cisteínas en cuanto al tráfico de H-Ras.

Cabe destacar que cuando el experimento de FLIP fue llevado a cabo en células previamente incubadas con 2-BP, la fluorescencia en complejo de Golgi también fue disminuyendo en el tiempo (resultados no mostrados). Este resultado es inesperado, ya que si la proteína no se puede acilar (como en el caso de la incubación con el inhibidor de las PATs), no se incorpora a vesículas en su tráfico hacia MP [32, 111] (**Figura 3**). Esto podría ser explicado si la acilación en células CHO-K1 no fuera fundamental para el tránsito de H-Ras por la vía exocítica. Por otra parte, la región apagada en cada experimento, podría no corresponder sólo a MP, por lo que una porción de RE cercana a dicha membrana estaría siendo apagada concomitantemente. De esta manera, si existiera un intercambio rápido y reversible entre membranas de complejo de Golgi y RE, como se planteó anteriormente, la fluorescencia de la proteína asociada a Golgi tendría que disminuir en función del tiempo, al fotoapagar la proteína presente en RE, tal como se observa experimentalmente.

Para confirmar nuestra hipótesis y estudiar el dinamismo de las mutantes monoaciladas en complejo de Golgi mediante otra técnica, utilizamos una mutante fotoactivable de la GFP (PA-GFP) fusionada a H-Ras(C181S) o a H-Ras(C184S). Dicha proteína fluorescente es una variante de la proteína fluorescente verde de *Aequorea victoria* que contiene mutaciones. Esto permite que su fluorescencia inicial por excitación a 488 nm sea muy baja y se incremente luego de un proceso de fotoconversión por irradiación con un láser de 405 nm [126].

Como se observa en la **Figura 34.A**, la fotoactivación de H-Ras(C181S) en complejo de Golgi, resultó en un rápido descenso de la fluorescencia en dicha organela, con una vida media² de $3,3 \pm 0,1$ minutos, llegando a un nivel de aproximadamente un 20% de la fluorescencia inicial a los 20 minutos luego de la fotoconversión (**Figura 34.C y E**). Se puede observar, además, la asociación de la proteína a estructuras semejantes a vesículas (**Figura 34.A**). Sin embargo, no fuimos capaces de evidenciar el destino de dichas vesículas, ya que la

² En este caso, definí la vida media como el tiempo necesario para alcanzar un valor igual al 50% con respecto a la fluorescencia inicial.

fluorescencia que se pierde en Golgi no apareció en otra organela en los tiempos estudiados, posiblemente por una dilución de la marca en membranas más extensas (RE y/o MP).

Por otra parte, para H-Ras(C184S) también se evidenció una salida de complejo de Golgi, luego de la fotoactivación, en estructuras vesiculares (**Figura 34.A**). Sin embargo, en este caso el proceso fue más lento, con una vida media de $5,0 \pm 0,2$ minutos (**Figura 34.D y E**). Dicho retraso en la salida con respecto a H-Ras(C181S) está de acuerdo con los resultados obtenidos a través de FLIP.

Cuando estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de 2-BP, hubo una reducción significativa en la salida de H-Ras(C181S) de Golgi, con una vida media de $3,8 \pm 0,5$ minutos y un *plateau* en el 50% del valor de la fluorescencia inicial (**Figura 34.B, C y E**). Esto indicaría que una fracción de la proteína depende de la S-acilación para su salida eficiente. En este caso se observa cómo comienza a incrementarse la fluorescencia en membranas de RE cercanas a Golgi, para rápidamente difundir a la totalidad de la organela (**Figura 34.B**, ver imagen con sobreexposición en la esquina superior derecha). Este fenómeno también se evidenció para H-Ras(C184S) (**Figura 34.B**), acompañado de una disminución en la dinámica de salida de la organela estudiada con una vida media de $8,5 \pm 0,8$ minutos (**Figura 34.D y E**). El hecho de no observar una diferencia importante con respecto al control en cuanto a la cantidad de proteína asociada a Golgi a tiempo final, podría deberse a una deacilación menos dinámica para esta mutante con respecto a H-Ras(C181S), lo cual no modificaría la proporción palmitoilada de H-Ras(C184S) al tiempo analizado.

Estos resultados y los obtenidos anteriormente mediante FLIP, nos permiten sugerir que hay una fracción de H-Ras no acilada que requiere de dicha modificación para su salida apropiada (vesicular) de complejo de Golgi, en los tiempos estudiados. Por otra parte, la fracción de proteína no palmitoilada en dicha organela, lleva a cabo un intercambio muy dinámico con membranas de RE.

Para estudiar dicho intercambio entre las proteínas en complejo de Golgi y RE, fotoactivamos repetidamente una región distinta al complejo de Golgi (probablemente una mezcla de RE y citosol), y monitoreamos la fluorescencia en función del tiempo. De esta manera observamos que, luego de la difusión por membranas de RE, la proteína se comienza a concentrar en Golgi, ya que colocaliza parcialmente con los marcadores GalNAc-T y ST3Gal-II [127] (**Figura 35.A**). Cabe destacar que cuando realizamos el experimento en presencia de 2-BP, observamos el mismo resultado, con la mayoría de las células mostrando una acumulación de la proteína en membranas de Golgi minutos después de la fotoactivación

en RE/citosol (Figura 35.B). Este resultado apoya la observación de que existe un intercambio rápido de proteína entre membranas de RE y Golgi, y que dicho intercambio es independiente de una S-acilación activa.

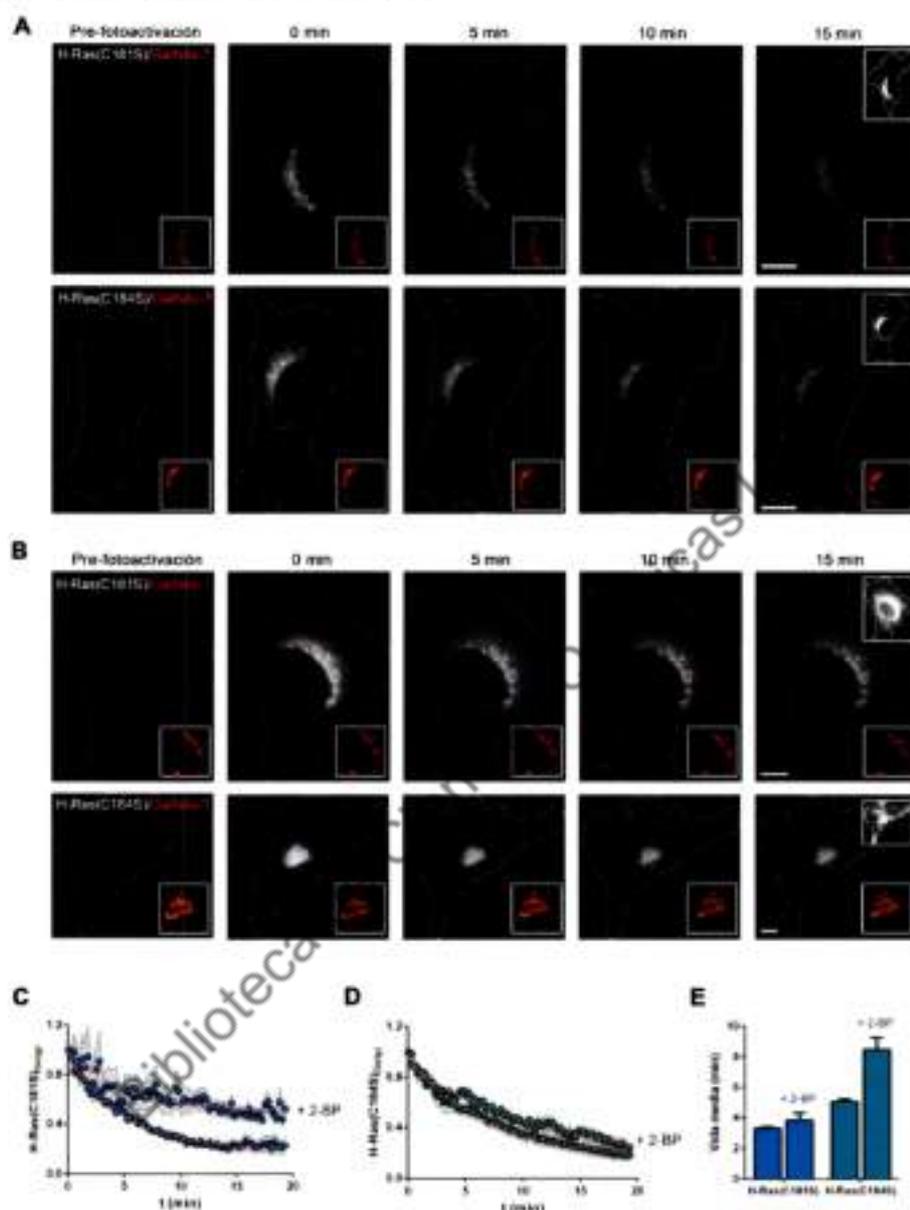


Figura 34. Salida de las mutantes de monoacilación del complejo de Golgi. A y B) Fotoactivación en complejo de Golgi. Células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S)-PA-GFP y GalNAc-T-Cherry (pseudocoloreada en rojo). El área a fotoactivar fue elegida de acuerdo a la expresión de dicho marcador. En los experimentos con 2-BP (B), el inhibidor fue agregado al medio 15-30 minutos antes de la adquisición de las imágenes. Las fotos muestran imágenes representativas tomadas a diferentes tiempos (Pre-fotoactivación, 0, 5, 10 y 15 minutos). Los *insets* de abajo a la derecha muestran la expresión de GalNAc-T-Cherry. En la esquina superior derecha, una imagen con sobre-exposición se muestra para evidenciar la localización subcelular de la proteína fotoactivada. Las barras de escala representan 10 μ m. C y D) Cuantificación de A y B. La fluorescencia en complejo de Golgi fue cuantificada como se indica en Materiales y métodos. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM de 3-4 experimentos independientes. Las líneas rojas representan el ajuste de cada conjunto de datos a una ecuación de decaimiento exponencial. E) Vida media de las proteínas en complejo de Golgi calculadas a partir de los datos en C y D.

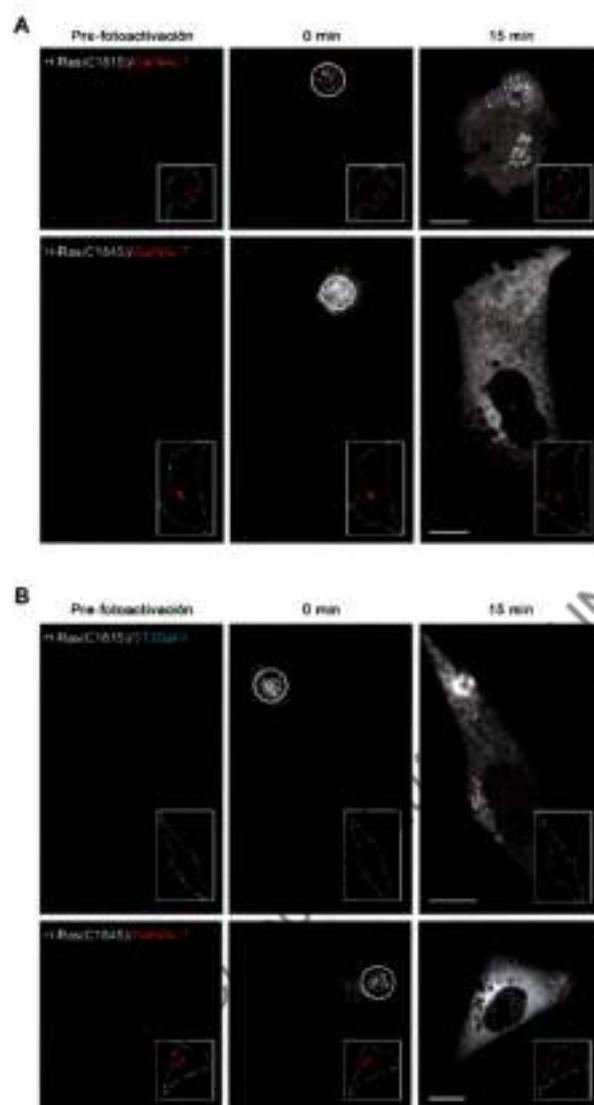


Figura 35. Intercambio de las mutantes de monoacilación de H-Ras entre RE y complejo de Golgi. A y B) Fotoactivación en RE/Citosol. Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S)-PA-GFP y GalNAc-T-Cherry (pseudocoloreada en rojo) o ST3Gal-II-Cherry (pseudocoloreada en cyan). El área a fotoactivar está indicada con un círculo blanco. CHX fue agregada 1 hora previo al inicio. En el experimento con 2-BP (B), el inhibidor fue añadido 15-30 minutos previo al comienzo del experimento, y mantenido en el medio durante el tiempo de la adquisición de las imágenes. La fotoactivación se realizó repetidamente cada 2 minutos. Imágenes representativas a distintos tiempos (Pre-fotoactivación, 0 y 15 minutos) se muestran en la figura. Los *insets* de la esquina inferior derecha, muestran la expresión de GalNAc-T o ST3Gal-II durante el tiempo. Las barras de escala representan 10 μm .

Dinámica de las mutantes de monoacilación de H-Ras en el complejo de Golgi

Nuestros resultados demostraron que las mutantes monoaciladas de H-Ras son deaciladas en MP. Por lo tanto, para investigar si la deacilación contribuye directamente a la población de dichas proteínas asociada a complejo de Golgi, y para estudiar la dinámica de

las versiones monoaciladas de H-Ras en dicha organela, realizamos experimentos de FRAP (*Fluorescence Recovery After Photobleaching*). En este tipo de experimentos, las moléculas fluorescentes concentradas en un área determinada, son fotoapagadas irreversiblemente, y el movimiento de las moléculas fluorescentes encendidas hacia la región seleccionada, es entonces monitoreada [125].

Por lo tanto, células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S)-YFP y el marcador de Golgi GalNAc-T-Cherry. Posteriormente, fueron tratadas con cicloheximida. Durante el experimento, el área correspondiente a complejo de Golgi fue fotoapagada y dicha región fue monitoreada durante 15 minutos para evaluar la recuperación de la fluorescencia.

Como se observa en la **Figura 36.A**, H-Ras(C181S) se concentra en membranas de complejo de Golgi, colocalizando parcialmente con GalNAc-T. Luego de la irradiación adecuada con el fin de producir el apagado de la fluorescencia, la misma fue considerablemente reducida y comenzó a reaparecer en dicha localización minutos después. La cuantificación de este evento, demostró que la fluorescencia se recuperó con un tiempo de recuperación media de $3,2 \pm 0,4$ minutos (**Figura 36.B**). Este resultado confirma que la población de proteína monoacilada en Golgi es altamente dinámica. El bajo porcentaje de recuperación de la fluorescencia (aproximadamente 18% del valor inicial) (**Figura 36.D**), podría deberse a la casi indetectable fracción de H-Ras(C181S) que se encuentra en MP (u otro lugar) desde el comienzo del experimento. Por otra parte, la recuperación de la fluorescencia en complejo de Golgi no parece depender de la actividad PAT, ya que el tratamiento con $50 \mu\text{M}$ de 2-BP produjo una recuperación de la fluorescencia, sin diferencias significativas en cuanto a la cantidad, con un tiempo de recuperación media de $4,7 \pm 1,2$ minutos (resultado no mostrado). Este resultado contrasta con datos reportados previamente [32], en los que la palmitoilación activa es necesaria para redireccionar H-Ras deacilada desde MP hacia complejo de Golgi en células MDCK, conforme el ciclo de acilación/deacilación (**Figura 3**). Además, sugiere que H-Ras monoacilada es capaz de intercambiarse con las fracciones de proteína que se encuentran en distintas localizaciones en la célula y que la población de Golgi no refleja necesariamente una fracción que está siendo acilada por las PATs. Este hecho confirma los datos obtenidos a partir de los experimentos de fotoactivación.

De manera similar, los experimentos de FRAP llevados a cabo con H-Ras(C184S) resultaron en una recuperación de la fluorescencia en el complejo de Golgi, con un tiempo

de recuperación media de $3,5 \pm 0,7$ minutos (**Figura 36.C**). A pesar de tener una mayor presencia en MP con respecto a la proteína acilada en Cys 184, la fluorescencia recuperada en Golgi para H-Ras(C184S), fue de aproximadamente un 17% con respecto al valor inicial, similar a lo observado para H-Ras(C181S) (**Figura 36.E**). El hecho de que el porcentaje recuperado sea bajo, podría deberse a que la deacilación de la proteína en células CHO-K1 es baja (de ahí que para evidenciarla haya que inhibir la palmitoilación), por lo que habría poca cantidad de H-Ras disponible en el transporte retrógrado hacia Golgi. Siguiendo con nuestra hipótesis de un rápido intercambio de la proteína entre membranas de RE y Golgi, parte de la fluorescencia que se recupera podría deberse a este evento. En este caso, como la proteína en RE es prácticamente indetectable en estado estacionario, es probable que dicha contribución no sea lo suficientemente importante como para obtener porcentajes de recuperación más elevados.

Cuando realizamos los experimentos de FRAP utilizando H-Ras(C184S) en células tratadas con 2-BP, observamos que la recuperación de la fluorescencia ocurría con un tiempo de recuperación media de $2,8 \pm 0,5$ minutos. Sin embargo, la fracción móvil (es decir, la fracción de proteína fluorescente que se mueve hacia la región apagada durante el experimento) se vio significativamente incrementada llegando a un valor aproximado del 50% con respecto al inicial (**Figura 36.E**). Esto podría explicarse debido a que, en presencia de 2-BP, evidenciamos el proceso de deacilación, con lo cual hay una mayor cantidad de H-Ras(C184S) deacilada disponible para el retorno por difusión (posiblemente a través de RE) hacia membranas de complejo de Golgi. De igual manera, este proceso de deacilación y tráfico podría estar ocurriendo para H-Ras(C181S), a pesar de no ser evidente con dicha proteína debido al bajo nivel de señal en MP (u otra localización distinta de Golgi).

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que existen distintos mecanismos que contribuyen a la localización de H-Ras monoaciladas en complejo de Golgi en estado estacionario. A pesar de que la localización de H-Ras(C184S) en MP es significativa, la recuperación de la fluorescencia en membranas de Golgi luego del *bleaching* fue relativamente baja, similar a lo observado para H-Ras(C181S). Como se mencionó, esto se podría explicar por una baja actividad de deacilación en células CHO-K1, pero también podría implicar que una importante fracción de la proteína es inmóvil o se mueve a través de un transporte más lento (no necesariamente dependiente de una deacilación previa). Si bien estas posibilidades

no son excluyentes, la inmovilidad de la proteína puede ser descartada por los experimentos de FLIP y fotoactivación presentados y discutidos anteriormente.

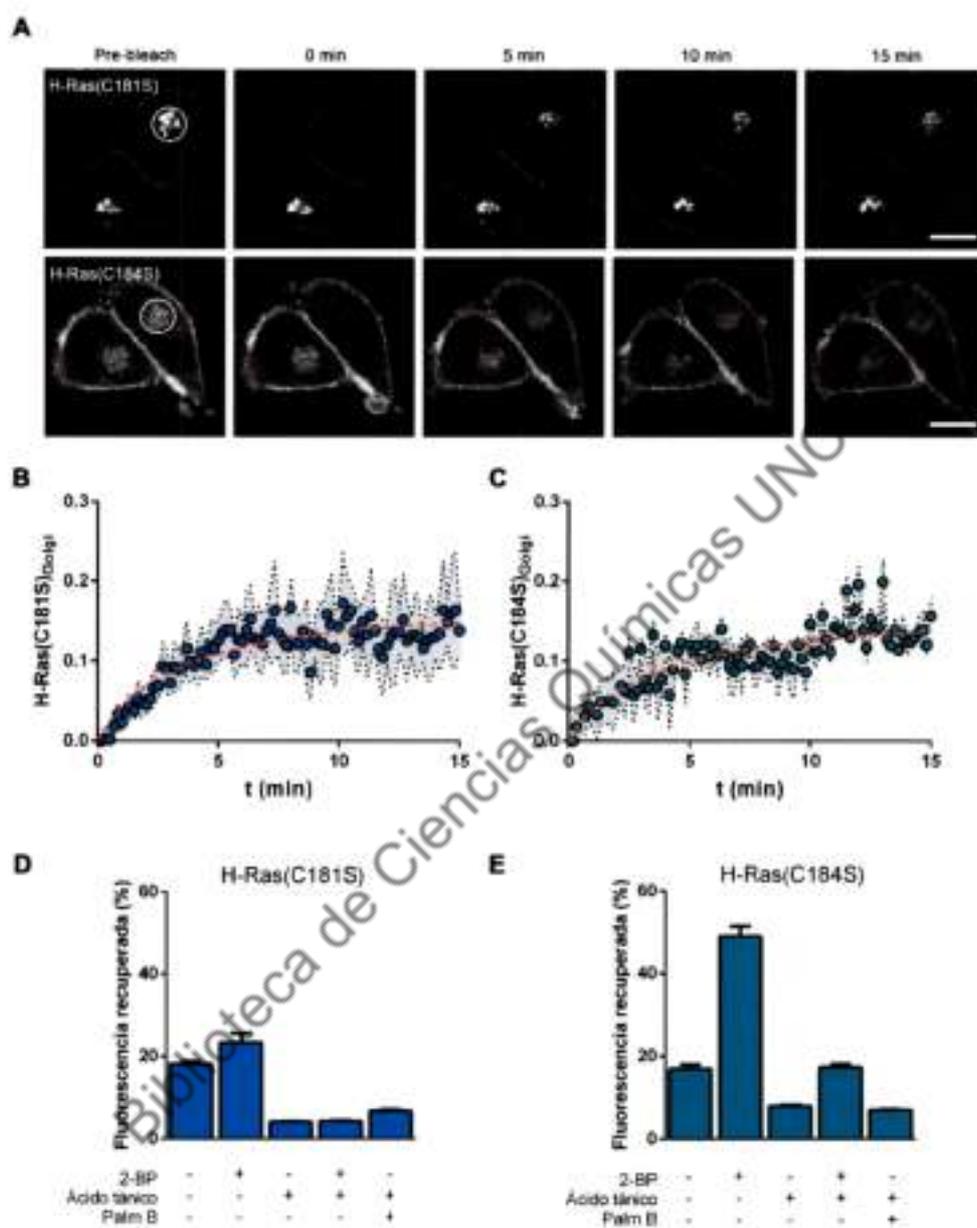


Figura 36. Dinámica de las mutantes de monoacilación de H-Ras en complejo de Golgi. A) Experimento de FRAP. Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S) y el marcador de Golgi GalNAc-T-Cherry (no mostrado), y tratadas con CHX 1 hora previo al comienzo del experimento. Las imágenes mostradas son fotos representativas tomadas a diferentes tiempos (Pre-bleach, 0, 5 y 15 minutos). El área fotoapagada colocaliza con el marcador de Golgi. Las imágenes fueron tomadas cada 30 segundos durante 15 minutos luego del *bleaching*. Las barras de escala representan 10 μ m. B y C) Cuantificación de A. La fluorescencia en complejo de Golgi fue cuantificada como se indica en Materiales y métodos. Los datos están expresados como el promedio \pm SEM de 3-6 experimentos realizados independientemente. Las líneas rojas representan el ajuste de cada conjunto de datos a la ecuación de una hipérbola. D y E) Porcentaje de fluorescencia recuperada en las condiciones indicadas (para más detalles ver Materiales y métodos).

En consecuencia, para analizar la forma de transporte de estas proteínas en células CHO-K1, realizamos experimentos de FRAP en presencia de ácido tánico, el cual impide la fusión de vesículas y la endocitosis en la MP sin afectar otras vías de tráfico intracelular [70]. Bajo estas condiciones, la recuperación de la fluorescencia en Golgi resultó inhibida para ambas GTPasas mutantes (los valores obtenidos son similares a los de la recuperación reversible luego del fotoblanqueo de YFP [32]), demostrando que las proteínas arriban al complejo de Golgi por transporte vesicular desde la MP (**Figura 36.D y E**).

Para conocer si la deacilación también juega un rol en el tráfico retrógrado desde MP, incubamos las células con 50 μ M 2-BP por 15-30 minutos previos al tratamiento con ácido tánico. En este caso, la recuperación no fue notoria para H-Ras(C181S) pero sí para H-Ras(C184S), mostrando una fluorescencia significativa en Golgi al final del experimento (**Figura 36.D y E**). A modo de control, cuando realizamos el experimento incubando con el inhibidor de las APTs Palmostatin B, previo al agregado de ácido tánico, la fluorescencia no se recuperó para ninguna de las dos proteínas (**Figura 36.D y E**).

En conclusión, estos resultados indican que tanto un transporte de tipo vesicular como un intercambio dependiente de la deacilación entre membranas de distintas organelas, están involucrados en el tráfico retrógrado de las mutantes en cisteínas de H-Ras. Como fue discutido previamente, la escasa cantidad de H-Ras(C181S) en MP, impide que veamos la contribución de la deacilación, la cual, sin embargo, no puede ser descartada.

Cabe destacar que imágenes tomadas por microscopía de TIRF (*Total Internal Reflection Fluorescence*) que permite ver eventos en MP o cercanos a ella (unos 200 nm de espesor), evidenciaron la presencia y dinámica de estructuras vesiculares para H-Ras(C181S) en células CHO-K1 (resultados no mostrados).

En conjunto, a través de las distintas técnicas de microscopía empleadas, podemos observar que el transporte y la dinámica de H-Ras y sus variantes monoaciladas en células CHO-K1, es más complejo que lo que hasta aquí estaba descripto con los ciclos de acilación/deacilación gobernando la localización y la forma de transporte (vesicular o por difusión) dentro de la célula. Si bien nuestros experimentos no descartan dicho proceso, habría un movimiento de proteína entre MP, Golgi y RE en permanente intercambio, que no dependería absolutamente del estado de acilación de H-Ras, pero que probablemente este regulado para evitar una deslocalización de la GTPasa en estado estacionario.

DISCUSIÓN

A pesar de que se conoce que la localización subcelular de proteínas involucradas en señalización es importante para dicha función, en contraposición a la antigua creencia que dicho proceso ocurría sólo desde MP, los mecanismos celulares y moleculares que gobiernan esta distribución, no están del todo descritos y entendidos. Tal es el caso para la GTPasa monomérica H-Ras.

En particular para esta proteína, ha sido descrito un recambio de palmítico dinámico que regula el tráfico intracelular de H-Ras desde y hacia el complejo de Golgi, el cual alterna entre transportes de tipo vesicular y no vesicular [32, 33]. Al mismo tiempo, en nuestro laboratorio se aportó evidencia de que H-Ras es endocitada y dirigida hacia ER, mediante un transporte vesicular dependiente de Rab5 y Rab11 [97]. Debido a que no se observó un efecto completo en la internalización de H-Ras cuando mutantes inactivas (unidas a GDP) de las proteínas Rab fueron sobreexpresadas en células CHO-K1, nuestra hipótesis es que H-Ras podría estar siendo transportada a través de un proceso alternativo y simultáneo. Dicho proceso podría depender de los ciclos de acilación/deacilación.

En esta parte del trabajo de tesis, nos focalizamos en el estudio de la deacilación dependiente de APTs de las diferentes especies S-aciladas de H-Ras, y realizamos aportes con respecto a la dinámica intracelular de las mismas.

Experimentos realizados en distintas líneas celulares, indicaron que la S-acilación de H-Ras no es absolutamente esencial para que la proteína se asocie a membranas, pero es necesaria para que adquiera una correcta localización subcelular. Sin embargo, la localización de H-Ras en MP, sí resultó dependiente de dicha modificación postraduccionial. Además, tanto la estequiometría como la posición de los ácidos grasos que modifican a H-Ras, tienen una gran influencia en su distribución subcelular. Esto está de acuerdo con el hecho de que no sólo la hidrofobicidad sino también el espaciamiento de los palmíticos en relación al farnesilo, son relevantes en la asociación a membranas. Al respecto, un estudio *in silico* postuló que los distintos palmíticos tienen un rol diferencial en la asociación a la bicapa lipídica, y que la contribución a la hidrofobicidad aportada por cada residuo de ácido graso no es aditiva [128]. De esta manera, el farnesilo en cisteína 186 y el palmítico en cisteína 181 serían suficientes para la asociación a membrana, mientras que el palmítico en cisteína 184 tendría un rol en la regulación de la segregación lateral.

Sin embargo, a pesar de sus distintas localizaciones subcelulares, las versiones constitutivamente activas (mutantes oncogénicas G12V) de H-Ras y H-Ras mutantes en

cisteínas, fueron capaces de activar la vía de señalización de Erk1/2 en igual medida, apoyando resultados que demuestran dicha señalización mediada por H-Ras desde endomembranas [121]. Como fue discutido anteriormente, las vías activadas y los efectores reclutados por cada una de las variantes de H-Ras, así también como la cinética de propagación de la señal, podrían ser diferentes en cada caso, teniendo como consecuencia, una respuesta celular distinta. A su vez, hay que tener en cuenta que estos experimentos fueron realizados en condiciones de sobreexpresión de las distintas mutantes oncogénicas de H-Ras, lo cual podría enmascarar o impedir la observación de diferencias sutiles en la actividad de dichas proteínas.

Por otra parte, experimentos de microscopía *in vivo* mostraron que en células que sobreexpresan APT1 o APT2, las cinéticas de deacilación en MP y en complejo de Golgi son distintas. Debido a que la fluorescencia en dicha organela fue notoria a lo largo de todo el experimento, esto podría llevar a suponer que una gran parte de la proteína que se encuentra en Golgi está en su estado no acilado. Si este fuera el caso, los ciclos de acilación/deacilación de la proteína "monoacilable" deberán ser lo suficientemente rápidos como para impedir una localización en endomembranas similar a la observada para H-Ras(C181,184S). Sin embargo, no podemos descartar una deacilación de la proteína en dichas membranas, tal como lo observamos para ³⁵S-GAP-43(C3S), que se intercambia rápidamente con H-Ras localizada en RE, enmascarando la pérdida de fluorescencia esperada. En contraste, la fluorescencia de las proteínas mutantes en MP disminuye significativamente en el tiempo, lo cual se incrementa cuando las células coexpresan APT1 o APT2. Este efecto no pudo verse para la versión salvaje, llevándonos a estimar una diferencia en la cinética de dicho proceso, como habíamos observado para las versiones de GAP-43, ya que anteriormente se había reportado la deacilación de esta proteína a tiempos mayores [35].

Como los datos obtenidos hasta este momento nos llevaban a plantearnos la posibilidad de la existencia de una población altamente dinámica de las proteínas mutantes en membranas de complejo de Golgi, a continuación estudiamos las mismas a través de técnicas de microscopía de fotoblanqueo (FLIP y FRAP) y fotoactivación. En primer lugar, observamos que la fracción de H-Ras localizada en membranas de Golgi es muy dinámica, intercambiándose con la fracción en MP y RE. Dicho intercambio y dinámica entre estos compartimentos no pareciera depender del proceso de acilación, ya que no se observaron notorias diferencias, en estos aspectos, en los experimentos realizados en presencia de 2-BP. Sin embargo, cuando las células se incubaron con el inhibidor, la fracción de proteína

recuperada en Golgi aumentó significativamente. En este sentido, especulamos que, como a través de la utilización de dicho compuesto somos capaces de evidenciar el proceso de deacilación, una mayor cantidad de H-Ras(C184S) deacilada se estaría originando en MP, la cual quedaría disponible para su regreso a complejo de Golgi. Esto podría implicar la existencia de un proceso de S-acilación, y, por ende, la presencia de PATs a nivel de MP. Al respecto, la localización de algunas enzimas DHHC de mamíferos ha sido reportada en la misma [14, 42]. Incluso, ciclos locales de acilación/deacilación han sido descritos para la proteína palmitoilada PSD-95 en membranas post-sinápticas por PATs presentes en dicha localización [129]. Para la PAT de H-Ras, si bien no se descarta la posibilidad de que otra enzima transferasa sea responsable de su palmitoilación, se había descrito su distribución en membranas de complejo de Golgi [109], aunque posteriormente se la encontró asociada, además, a RE [42]. Esta última localización, también podría explicar los resultados obtenidos, debido al alto intercambio de proteína existente entre MP y RE, propuesto en el desarrollo de este trabajo.

Sin embargo, el efecto de 2-BP podría generar una mayor población de la proteína en RE (como fue evidenciado en los experimentos de deacilación) que quedaría disponible para su intercambio con membranas de Golgi, generando una mayor recuperación de la fluorescencia con respecto al control. En este sentido, para la enzima diacilada que sintetiza GABA, GAD65, se describió mediante experimentos de FRAP la presencia de una población hidrofóbica no palmitoilada que se intercambia rápidamente entre membranas de RE/Golgi, y otra fracción que depende de un proceso de deacilación previo para la recuperación de la fluorescencia [130].

Otra posibilidad es que la S-acilación ocurra en membranas de Golgi y que sea un proceso rápido, impidiendo la acumulación de la proteína en dicha organela. En este caso, en presencia de 2-BP, H-Ras quedaría "retenida" en Golgi. Esta hipótesis está apoyada por los experimentos de fotoactivación en donde observamos una dinámica muy alta en la salida de dicho compartimento, que es disminuida en presencia del inhibidor.

Por otra parte, estos experimentos de fotoactivación nos permitieron estudiar en mayor profundidad la salida de la proteína monoacilada de complejo de Golgi, encontrando un alto dinamismo en la fracción asociada a esta organela, como se mencionó anteriormente. Resulta interesante que ambas mutantes de monoacilación mostraron cinéticas distintas en su salida, lo que se podría relacionar con la diferente localización subcelular de las mismas en estado estacionario. Dicha salida no parece depender en un 100% de la actividad de acilación,

ya que realizando el experimento en presencia de 2-BP, también observamos una salida de complejo de Golgi, aunque en menor proporción, en tiempos ligeramente mayores a la condición control. Si bien en circunstancias en que la proteína no puede acilarse (como en el caso de la incubación con el inhibidor) no se esperaría que la misma siga su tránsito por la vía exocítica, según lo planteado en el modelo de trampa cinética (**Figura 3**), como observamos una importante localización de la proteína fotoactivada en membranas de RE, en contraste con lo observado en la condición control, esto aportaría aún más evidencia de la existencia de un intercambio rápido de la proteína entre las diferentes membranas, el cual sería independiente del estado de acilación. En este sentido, queda por investigar de qué manera es controlado o regulado dicho intercambio, de tal forma de mantener la proporción relativa de proteína asociada a cada organela en estado estacionario.

Además, observamos que las fracciones de MP y Golgi son intercambiables tanto por un transporte de tipo vesicular como por un rápido intercambio entre membranas, en su tráfico retrógrado. En particular, el bloqueo de la internalización y fusión de vesículas a MP mediante el tratamiento con ácido tánico, afectó el tráfico de ambas proteínas monoaciladas, evidenciando la necesidad de un transporte vesicular activo. Un resultado similar se describió en nuestro laboratorio para GAP-43 diacilada en su tránsito hacia ER [70, 97].

En resumen, nuestros resultados realizan un aporte al entendimiento de la dinámica intracelular de H-Ras y sus variantes, de acilación. La visión descrita y aceptada hasta el momento de una acilación "exclusiva" a nivel de membranas de Golgi, el posterior transporte vesicular hacia MP, y la deacilación en dicha membrana con su consecuente difusión hacia complejo de Golgi para una eventual reacilación, parece no ser la única manera en que esta proteína se mueve dentro de la célula. Si bien nuestros resultados no contradicen aquellos que demuestran el mecanismo mencionado, contribuyen a la construcción de un modelo mucho más complejo, en el que coexisten distintos tipos de transporte e interacciones, y un intercambio altamente dinámico entre la proteína localizada en las distintas endomembranas (**Figura 37**). Una pregunta pendiente a ser contestada es si este estudio es extensivo a otras proteínas S-aciladas.

Un párrafo aparte merece la discusión de las técnicas empleadas, las cuales permitieron contestar las preguntas sobre los procesos planteados. Las mismas nos permitieron profundizar en aspectos dinámicos desconocidos, cuya interpretación hubiera resultado errónea si sólo analizábamos a la proteína en estado estacionario. Tal es el caso, por mencionar un ejemplo, de la particular localización subcelular de H-Ras(C181S) que pareciera

estar “estancada” en membranas de Golgi, hecho que fue totalmente descartado al estudiar el dinamismo de esta población.

Para finalizar, los resultados presentados indican una información espacial y temporal diferente aportada por cada palmítico, y sugieren una accesibilidad diferencial de las APTs a cada ácido graso. Por lo tanto, la modulación de la actividad tioesterasa en un contexto en particular, ya sea fisiológico o patológico, podría resultar relevante para regular y organizar el tipo de transporte y la cinética en el tráfico de H-Ras. Esto podría, en consecuencia, influenciar la conexión de la GTPasa con efectores que se encuentren *downstream* en una determinada ruta de señalización. Como se mencionó, la implicancia funcional que las versiones con distinta estequiometría en la S-acilación pudieran tener, ha sido subestimada y escasamente estudiada. Al respecto, un estudio realizado recientemente en células HEK293T reveló que H-Ras salvaje se encuentra preferencialmente diacilado, con una población importante en estado deacilado [75]. Las mutantes de monoacilación, por su parte, se encontraron en aproximadamente un 50% no aciladas [75]. De acuerdo a nuestros resultados, sus existencias transientes o más prolongadas en la célula en asociación con el dinamismo y la capacidad de activar efectores desde sus distintas localizaciones, debería tenerse en cuenta cuando se estudia la biología de H-Ras y en el desarrollo de terapias anti-cáncer.

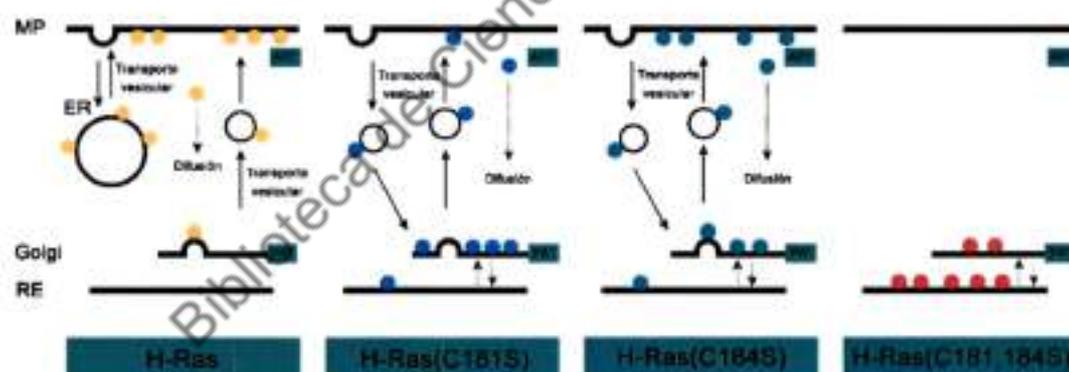


Figura 37. Modelo del tráfico intracelular de las diferentes versiones de acilación de H-Ras. El modelo propuesto fue diseñado teniendo en consideración los aportes realizados por este trabajo, así como los presentados anteriormente en publicaciones de diferentes laboratorios. Luego de un primer procesamiento del motivo CAAX en el citosol y RE, H-Ras se palmitoila en Golgi en cisteínas 181 y 184. De esta manera, es incorporada a vesículas de transporte con destino hacia MP. En dicha localización, H-Ras puede ser endocitada y llevada a ER. Una fracción podría, sin embargo, deacilarse por acción de las APTs, retornando al Golgi o RE por un transporte no vesicular. Las versiones monoaciladas en cisteína 184 o 181, se asocian principalmente a membranas de Golgi o a Golgi y MP, respectivamente. La fracción de las proteínas en estas localizaciones es altamente dinámica e intercambiable por transporte vesicular o por difusión. La versión no acilada de H-Ras se encuentra en complejo de Golgi con conexión rápida y reversible con las membranas de RE.

Los resultados de este capítulo forman parte del trabajo:

Individual S-acylated cysteines differentially contribute to H-Ras endomembrane trafficking and acylation/deacylation cycles.

Maria P. Pedro, Aldo A. Vilcaes, Guillermo A. Gomez, Jose L. Daniotti

Manuscrito en revisión

2016

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

CONCLUSIONES

Biblioteca de Ciencias Químicas UN

La S-acylación de proteínas es una modificación postraducciona por la que un ácido graso, generalmente palmítico, se une a cisteínas mediante un enlace tioéster. La particular característica de reversibilidad de esta lipidación, permite que la palmitoilación pueda actuar como una modificación sujeta a regulación, de manera similar a la fosforilación, si bien los eventos involucrados en dicha regulación no son conocidos actualmente.

El principal efecto de la S-acylación sobre proteínas periféricas que carecen de otra modificación y/o motivo de aminoácidos particular, es el aumento de su hidrofobicidad y la consecuente asociación a membranas celulares de las mismas. Sin embargo, es sabido que los ácidos palmíticos incorporados juegan un rol adicional al de simples "anclajes" a la membrana, pudiendo tener efectos sobre la función, estabilidad y tráfico de las proteínas modificadas.

Con respecto a las enzimas que llevan a cabo la palmitoilación, las más caracterizadas son las PATs, proteínas transmembrana encargadas del proceso de acilación. Las tioesterasas (las enzimas que catalizan la deacilación) han sido menos estudiadas, tanto en su función, especificidad, localización, e incluso su identificación, ya que sólo un pequeño número de enzimas han sido descritas hasta el momento. La variedad y cantidad de sustratos palmitoilados lleva a pensar en la existencia de más enzimas tioesterasas que restan por identificar.

En el presente trabajo, nos centramos en el estudio de APT1 y APT2, las únicas dos tioesterasas descritas al momento del inicio de esta tesis. Dichas enzimas, que demostraron ser citosólicas y tener un alto carácter hidrofílico en células CHO-K1 y HeLa, deacilaron GAP-43 (sólo APT2) y H-Ras. Estudios *in vitro* con las enzimas recombinantes purificadas a partir de la expresión de las mismas en *Escherichia coli*, nos permitieron realizar experimentos cinéticos, utilizando palmitoil-CoA como sustrato. El hecho de que las tioesterasas puedan hidrolizar dicho sustrato tanto en su forma monomérica como estructurada, nos llevó a especular que lo mismo podría suceder en un contexto celular, en donde la enzima citosólica sería capaz de catalizar la deacilación de proteínas en la interfase membrana/citosol.

A su vez, utilizando microscopía de fluorescencia, fuimos capaces de medir indirectamente el evento de deacilación, monitoreando la intensidad de fluorescencia en MP y complejo de Golgi para GAP-43 y H-Ras di- y monoaciladas. En ambos casos corroboramos que la cinética con la que ocurre este proceso es muy distinta, pudiendo medir la deacilación de las mutantes monopalmitoiladas en una escala de tiempo mucho menor que para las proteínas salvajes.

Cabe destacar que la deacilación sólo fue evidente en condiciones de inhibición de la actividad PAT, lo que nos habla de una competencia y regulación entre los niveles de ambos procesos enzimáticos. Especulamos, además, que la actividad de deacilación en células CHO-K1 podría ser baja con respecto a otras líneas celulares, hipótesis que se condice con la observación de la particular localización subcelular de H-Ras en dichas células. Según este planteo, una baja actividad de deacilación implicaría que la proteína permanezca por un tiempo prolongado en la MP, lo cual sería favorable para su internalización mediante vesículas a ER. Por el contrario, si la deacilación fuera alta, se esperaría una menor concentración de la proteína en MP, acompañada de un aumento de la misma en membranas de RE o complejo de Golgi.

La dificultad con la que nos encontramos en este punto, es la escasa cantidad de inhibidores de la acilación y la falta de investigación en el área. Como se mencionó anteriormente, los compuestos disponibles y utilizados actualmente con este fin distan mucho de ser específicos, conociéndose blancos de los mismos no relacionadas con esta modificación. Tal es el caso del 2-BP, cuyo empleo ha sido ampliamente difundido en la inhibición de la palmitoilación, a pesar de ser un compuesto altamente reactivo que se une covalentemente a cientos de proteínas. Nosotros demostramos aquí que el 2-BP no sólo es capaz de inhibir la acilación, sino también el proceso inverso. El efecto de dosis elevadas de dicho compuesto retrasó la deacilación de GAP-43 *in vivo*, además de tener un efecto inhibitorio sobre las APTs en los estudios *in vitro*. Debido a estos resultados, proponemos una mayor precaución en el empleo del 2-BP y en la interpretación de los resultados obtenidos con el mismo. Sin embargo, en condiciones controladas, creemos que podría ser de utilidad para "congelar" el ciclo de acilación/deacilación de determinadas proteínas.

Por último, valiéndonos de metodologías de microscopía de fluorescencia que nos permiten medir procesos dinámicos, fuimos capaces de describir en mayor profundidad la dinámica en el tráfico de H-Ras en células CHO-K1. Descubrimos que el mismo es un proceso complejo en el que coexisten distintos tipos de transporte (vesicular y no vesicular), y un intercambio y conexión sumamente dinámico entre las fracciones de la proteína localizada en las distintas endomembranas y en MP. Nuestros resultados contribuyen a ampliar el modelo actual, en el cual el estado de acilación de la proteína y los ciclos de recambio de palmitico, son los determinantes para el tipo de transporte y la localización subcelular adoptada por la proteína en un momento específico.

Preguntas que surgen de esta última parte, tales como la posibilidad de medir la coexistencia de las distintas variantes de palmitoilación de H-Ras en la célula y estudiar el rol de las especies monoaciladas en procesos celulares que dependan de la función de H-Ras, así también como una mayor profundización en el entendimiento del proceso de deacilación dependiente de APTs, son las que nos planteamos seguir estudiando en el futuro y las perspectivas que se nos abren para la continuidad de nuestra investigación.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

MATERIALES Y MÉTODOS

Biblioteca de Ciencias Químicas UNG

Plásmidos

Los vectores de expresión pECFP-C1 (en donde ECFP se refiere a *enhanced cyan fluorescent protein*), pEYFP-N1 y -C1 (en donde EYFP se refiere a *enhanced yellow fluorescent protein*), pmCherry-C1 y PA-GFP-C1 son de Clontech (CA, USA). En dichos plásmidos se subclonaron las proteínas GAP-43, ⁸¹³GAP-43 y sus mutantes de acilación, H-Ras, H-RasG12V, ⁸²⁵GalNAc-T, Sial-T1, Sial-T2, ST3Gal-II, APT1 y APT2 según lo descrito en [35, 70, 97, 127, 131, 132].

Las mutantes monoaciladas de H-Ras se subclonaron en pEYFP-C1 utilizando como templado la construcción *wild type* y los plásmidos correspondientes en los sitios BamHI y KpnI (*forward*: CCGCGGATCCAGATCTATGACCGAATACAAGCTTGTTGTTG, *reverse*: CGGGGTACCTCAGGAGAGCACACACTTGCAGCTCATGGAGCCGGGG y CGGGGTACCTCAGGAGAGCACACACTTGGAGCTCATG).

La doble mutante de acilación de H-Ras fue construida utilizando como templado H-Ras(C181S) y el primer *reverse* utilizado para la construcción de H-Ras(C184S).

Las versiones constitutivamente activas de H-Ras monoaciladas se obtuvieron por PCR y mutagénesis dirigida, a partir de la construcción *wild type* y los plásmidos *reverse* utilizados previamente y *forward* que adiciona la mutación indicada.

La proteína His-APT1 se describió previamente en [35], y fue subclonada en los sitios BamHI/EcoRI utilizando el vector de expresión en bacterias pRSET-A (Invitrogen, CA, USA). His-APT2 se obtuvo de manera similar, utilizando como templado APT2 obtenida por RT-PCR a partir de ARN de células CHO-K1 y los plásmidos correspondientes.

Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo se detallan a continuación:

- Anticuerpo mezcla de dos anticuerpos monoclonales desarrollados en ratón anti-GFP (Roche Diagnostics, Indianápolis, IN, USA). Dilución 1:800.
- Anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón anti-fosfo-p44/42 MAPK (Erk1 y Erk2) (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Dilución 1:1000.
- Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo anti-p44/p42 MAPK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Dilución 1:1000.
- Anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón anti-tubulina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Dilución 1:3000.

- Anticuerpo secundario policlonal IRDye 800CW desarrollado en cabra anti-IgG de ratón (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Dilución 1:15000.
- Anticuerpo secundario policlonal IRDye 680RD desarrollado en cabra anti-IgG de conejo (Li-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Dilución 1:15000.

Cultivos celulares y transfecciones

Las células CHO-K1 (ATCC, Manassas, VA, USA) fueron mantenidas a 37°C, en una atmósfera conteniendo 5% CO₂, en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*), suplementado con 10% de SFB (suero fetal bovino) y antibióticos (100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin). Las células crecieron en placas de Petri, tanto para la realización de experimentos de microscopía como para los análisis bioquímicos por Western blot. Las mismas fueron transfectadas con 0,1-1,5 µg/placa de 35 mm de cada plásmido según corresponda. Los reactivos utilizados para tal fin fueron liposomas catiónicos (Lipofectamine, Invitrogen, CA, USA) o polietilenimina (PEI, Polysciences, Inc., Warrington, PA, USA), según las instrucciones de los fabricantes. 24 horas post-transfección, las células fueron procesadas para análisis por Western blot, o sembradas en cámaras Lab-Tek (Thermo Scientific Nunc, IL, USA), incubadas por 24 horas y posteriormente analizadas por microscopía *in vivo*.

Electroforesis y Western blot

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (p/v) en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), y posteriormente fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa por 60 minutos a 300 mA. Las bandas de proteínas fueron visualizadas por tinción con Ponceau. Para realizar el *immunoblot*, los sitios de unión no específicos fueron bloqueados con 5% p/v de leche descremada en buffer TBS (*Tris-buffered saline*, 200 mM NaCl, 50 mM Tris/HCl, pH 7,5), o 4% p/v de BSA (*Bovine Serum Albumin* o albúmina sérica bovina) en TBS. Posteriormente, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes *overnight* a 4°C. Los mismos fueron detectados utilizando fluorescencia en el infrarrojo cercano (Li-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA) con anticuerpos secundarios acoplados a IRDye 800CW o IRDye 680RD. La contribución relativa de cada banda fue cuantificada con el software ImageJ (National Institute for Health, Bethesda, MA, USA).

Tratamiento con 2-BP

Una solución madre de 2-BP 0,5 M (Fluka, St. Louis, MO, USA) fue preparada en DMSO (dimetilsulfóxido). Para analizar el efecto de 2-BP en la distribución de las proteínas fluorescentes en estado estacionario por microscopía, las células fueron incubadas con 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cicloheximida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). En los experimentos en que se indica, se añadieron inhibidores de la degradación de proteínas (60 μM de cloroquina y 7,5 μM de MG132). Para analizar el efecto de la inhibición de la S-acilación en la asociación de membranas de las proteínas aciladas, 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cicloheximida fueron incorporados al medio de cultivo durante la transfección. 5 horas después, se agregó 10% de SFB y en las 3 horas posteriores, las concentraciones indicadas de 2-BP fueron también agregadas. Finalmente, la cicloheximida fue removida del medio. Luego de 8 horas de síntesis de proteínas, las células fueron utilizadas en microscopía de fluorescencia confocal, o procesadas para su análisis por Western blot.

Fraccionamiento subcelular

Las células crecidas en placas de 60 mm fueron lavadas con buffer PBS (*phosphate-buffered saline*, 140 mM NaCl, 8,4 mM Na_2HPO_4 , 1,6 mM NaH_2PO_4 , pH 7,5) y cosechadas por *scraping* en PBS conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (PIC por *Protease Inhibitor Cocktail*, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin, 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin y 0,7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin). Los extractos fueron centrifugados a 4°C durante 5 minutos a 13000 g y resuspendidos en 400 μl de Tris-HCl 5 mM (pH 7,0) en presencia de inhibidores de proteasas. Los pellets fueron resuspendidos y dispersados en un agitador. Luego de 30 minutos, los mismos fueron lisados mecánicamente con una aguja y jeringa de tuberculina, y la fracción nuclear fue removida por centrifugación a 4°C durante 5 minutos a 600 g. Para los experimentos de ultracentrifugación, la fracción sobrenadante fue centrifugada a 4°C durante 1 hora a 400000 g, utilizando un rotor TLA 100.3 (Beckman Coulter, Inc., CA, USA). Sobrenadante (S) y pellet (P) fueron separados y P fue resuspendido en 400 μl de Tris-HCl. Las proteínas de cada fracción fueron precipitadas por cloroformo/metanol (1:4 v/v) para el posterior análisis por Western blot.

Experimento de partición en Tritón X-114

Para los experimentos de partición en detergente, a las fracciones S y P obtenidas por ultracentrifugación se les agregó 100 μl de Tritón X-114 5% (v/v) en Tris-HCl 5 mM (pH 7,0). Las muestras se incubaron a 4°C durante 1 hora. Posteriormente, las mismas fueron

llevadas a 37 °C durante 3 minutos y centrifugadas a 13000 g. La fase superior acuosa (A) y la inferior rica en detergente (D) fueron separadas y extraídas nuevamente con detergente y buffer, respectivamente. Las fracciones resultantes fueron ajustadas a iguales volúmenes y contenido de detergente, y las proteínas fueron precipitadas con cloroformo/metanol (1:4 v/v) para el análisis por Western blot.

Precipitación de proteínas con cloroformo/metanol

La solución de cloroformo/metanol utilizada para la precipitación de proteínas previo a su análisis por Western blot, se preparó en una relación 1:4. A las muestras conteniendo las proteínas se les agregó el correspondiente volumen de cloroformo/metanol tal que la fase acuosa sea igual a la cantidad de metanol agregado. Posteriormente se mezclaron por agitación y se centrifugaron 3 minutos a 4 °C a 15000 g. Se retiró la fase superior y se agregó un volumen de metanol. Se repitió la centrifugación y se retiró el sobrenadante. Por último, se dejó evaporar los restos de solvente antes de resuspender el pellet obtenido.

Expresión y purificación de APT1 y APT2 recombinantes

Los ADNc de APT1 y APT2 fueron obtenidos por RT-PCR utilizando *primers* específicos y ARN de células HeLa y CHO-K1, respectivamente. Los fragmentos amplificados fueron subclonados en el vector de expresión pRSET-A que le adiciona un Hisx6 *tag* en el extremo N terminal. Bacterias *Escherichia coli* transformadas con dichas construcciones fueron crecidas a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) conteniendo 75 µg/ml de ampicilina, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0,6. Luego, las bacterias fueron lisadas y una fracción soluble fue generada utilizando un homogeneizador de alta presión (EmulsiFlex, Avestin, Inc., Ottawa, Canadá) y posterior centrifugación a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. Las proteínas fueron purificadas de dicha fracción, utilizando una columna de Ni²⁺-NTA (GE Healthcare, Fairfield, VT, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las proteínas fueron posteriormente desalinizadas usando una columna HiTrap *desalting column* (GE Healthcare, Fairfield, VT, USA) y diluidas en buffer Hepes 10 mM pH 8.

Los buffers utilizados en el proceso fueron:

- Binding Buffer 8X: 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7,9, 40 mM Imidazol.
- Wash Buffer 8X: 4 M NaCl, 160 mM Tris-HCl pH 7,9, 480 mM Imidazol.
- Eluate Buffer 4X: 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl pH 7,9, 4 M Imidazol.

- Strip Buffer 4X: 2 M NaCl, 80 mM Tris-HCl pH 7,9, 400 mM EDTA.

Adquisición de imágenes por microscopía confocal de fluorescencia

Las imágenes confocales fueron tomadas con un microscopio Olympus FluoView FV1000 (Olympus Latin America, Miami, FL, USA) equipado con un láser de Argón (458, 488 y 514 nm) y láseres de Helio y Neón (543 y 633 nm, respectivamente). La fluorescencia de YFP fue adquirida utilizando excitación a 514 nm, un espejo dicróico de 458/514 nm y un filtro de emisión *band pass* de 530-560 nm. La fluorescencia de la proteína Cherry fue adquirida con excitación a 543 nm, un espejo dicróico de 488/543/633 nm y un filtro de emisión *long pass* de 560 nm. La fluorescencia de CFP fue detectada utilizando excitación a 458 nm, un espejo dicróico de 458/514 nm y un filtro de emisión *band pass* de 470-500 nm. Alexa Fluor 647 fue adquirida con excitación a 633 nm, un espejo dicróico de 488/543/633 nm y un filtro de emisión *long pass* de 650 nm. Para la adquisición de las imágenes con triple marca de CFP/YFP/Cherry, las mismas fueron tomadas secuencialmente un modo lineal, ya que de esta forma se minimiza el *bleed-through* entre los canales por el solapamiento de los espectros de emisión de los fluoróforos.

Microscopía de *live cell* y medida de la cinética de deacilación

Los experimentos con células vivas fueron realizados utilizando un incubador con control de temperatura y CO₂, a 37 °C (Tokai hit, Japón).

Para los experimentos de distribución subcelular y colocalización, se utilizó un objetivo de inmersión en aceite 63X/1,42 NA (apertura numérica) PlanApo (Olympus, Japón). Las imágenes fueron tomadas con un zoom digital 3X y un *pinhole* apropiado de tal manera de obtener 1 unidad de Airy para el fluoróforo de menor longitud de onda de excitación y emisión (feta óptica de 0,8 μm).

Para la medición de la deacilación, se utilizaron células CHO-K1 transfectadas con GAP-43 o H-Ras y sus variantes de acilación, según corresponda. Las mismas fueron, además, cotransfectadas con GalNAc-T-Cherry y APT1 o APT2-CFP. La cicloheximida (60 μg/ml) se agregó 1 hora previo al inicio de la adquisición de las imágenes, y el 2-BP se agregó al comienzo del experimento. Los experimentos fueron realizados a 20°C en el microscopio Olympus FluoView FV1000, para reducir el tráfico vesicular. Luego de la selección de las células, las imágenes fueron adquiridas en el canal de la YFP y de Cherry, utilizando un objetivo 63X/1,42 NA (apertura numérica), de inmersión en aceite (Olympus), con un zoom

digital de 3X. El tamaño de las imágenes fue de 512x512 píxeles, y se utilizó una velocidad de *scaneo* de 10 $\mu\text{s}/\text{pixel}$. El *pinole* fue ajustado para obtener una feta óptica de 3 μm . Las imágenes fueron tomadas con una frecuencia de 1 min^{-1} o 5 min^{-1} durante 30 o 150 minutos en los experimentos de GAP-43 o H-Ras, respectivamente. Las condiciones fueron optimizadas para la adquisición del complejo de Golgi, para minimizar el *bleaching* y para tomar las imágenes lo más rápido posible. El análisis y cuantificación de las mismas fueron realizados utilizando el software ImageJ, como se describe en [35] y se encuentra detallado más adelante.

Ensayo de hidrólisis de palmitoil-CoA

El ensayo de hidrólisis de P-CoA utilizando APT1 o APT2 recombinantes, se realizó siguiendo el protocolo descrito en [53], con algunas modificaciones. Brevemente, al [^3H]Palmitoil-CoA en buffer HMEC (50 mM NaHEPES (pH 8,0), 2 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA y 7,5 mM CHAPS) se le adicionó la enzima recombinante correspondiente, y las reacciones fueron incubadas a 30 $^\circ\text{C}$ durante el tiempo especificado. El palmitato libre fue entonces separado del P-CoA por adición de tolueno. Luego de la centrifugación por 1 minuto en una microcentrífuga, la fase superior orgánica fue procesada para conteo con líquido de centelleo.

Mediciones por *Small-angle X-ray Scattering* (SAXS)

Los experimentos de SAXS fueron realizados en el *Brazilian Synchrotron Light Laboratory* (LNLS) en Campinas, Brasil. El P-CoA fue resuspendido en buffer Hepes 50 mM, pH 8,0 a concentraciones de 50, 300, 600 y 1775 μM . Las condiciones de medición fueron 5 minutos de exposición, una distancia muestra-detector de 1 m, irradiación a 1,5 \AA y $30 \pm 1^\circ\text{C}$. El buffer fue medido y restado de las señales obtenidas. Los datos fueron recolectados con MARCCD e integrados utilizando FIT2D V 12.077 en ESRF. Las curvas de SAXS fueron generadas utilizando el software SASFIT, y la intensidad de SAXS se graficó como una función del vector de *scattering* q :

$$q = \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \theta$$

donde λ es la longitud de onda del rayo X y 2θ es el ángulo total de *scattering*.

Endocitosis de transferrina

Para marcar el endosoma de reciclado en células CHO-K1, HeLa, COS-7 y NIH3T3, se incubaron las mismas en medio libre de suero por 1 hora a 37 °C. Posteriormente, 14 µg/ml de Alexa Fluor⁴⁸⁸-Transferrin (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) fueron adicionados al medio conteniendo 0,1% de BSA, y las células fueron incubadas por 30 minutos. Luego, se analizaron las muestras por microscopía de fluorescencia confocal. La transferrina fue mantenida en el medio durante el experimento para impedir la disminución de la marca fluorescente por el reciclado de la proteína.

Acyl Biotinyl Exchange (ABE)

El ensayo de ABE fue realizado siguiendo el protocolo descrito en [81], con algunas modificaciones. Brevemente, las células CHO-K1 transfectadas y crecidas en cápsulas de 100 mm, fueron lavadas con buffer PBS pH 7,5 y cosechadas por *scrapping* en PBS/PIC. La lisis mecánica de las mismas se llevó a cabo como fue descrito anteriormente. Luego, se adicionó Tritón X-100 a una concentración final de 1,7%, y se incubó a 4°C durante 1 hora con agitación. Las proteínas fueron precipitadas con cloroformo/metanol (1:4 v/v) y resuspendidas en SB (4% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA) con 10 mM de N-ethylmaleimida (NEM, ICN Biomedicals Inc, Aurora, OH, USA), incubando a 37°C con agitación. LB (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl) con 1 mM de NEM, 0,2% de Tritón X-100, PIC y PMSF, fueron añadidos a cada muestra, y las mismas fueron incubadas *overnight* a 4°C. La NEM de las muestras fue posteriormente removida por tres precipitaciones secuenciales con cloroformo/metanol, las cuales fueron finalmente resuspendidas en SB. Cada muestra fue dividida en dos fracciones, y una de ellas fue incubada con HB (1 M hidroxilamina pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,2% Tritón X-100, PIC, PMSF y 1 mM HPDP-Biotina), mientras que a la otra se le agregó TB (LB, 0,2% Tritón X-100, PIC, PMSF y 1 mM HPDP-Biotina). Esta última muestra se utilizó como control. Las mismas fueron incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Luego, las proteínas fueron precipitadas con cloroformo/metanol, para remover la biotina que no reaccionó, e incubadas con *beads* de estreptavidina agarosa, posterior a su resuspensión. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. La elución se realizó en buffer conteniendo DTT y se procedió al procedimiento de Western blot antes descrito.

Ensayo de fosforilación de Erk

Las células CHO-K1 fueron transfectadas con las mutantes constitutivamente activas H-RasG12V, H-RasG12V(C181S) o H-RasG12V(C184S), o no fueron transfectadas para utilizarlas como control. Las mismas fueron incubadas *overnight* en DMEM con 0,5% de SFB. Posteriormente, las células se dejaron en medio sin suero durante 3 horas a 37 °C, y el experimento control fue estimulado con 10% SFB en DMEM durante 15 minutos. Luego, las muestras fueron procesadas para el análisis por Western blot.

Forster Resonance Energy Transfer (FRET). Experimento y análisis

Las células CHO-K1 crecieron en cápsulas de 35 mm conteniendo cubres, hasta un 70-80% de confluencia al momento de la transfección. Posteriormente fueron cotransfectadas con H-Ras o H-Ras(C181,184S)-YFP y pECFP (control negativo), APT1-CFP o APT2-CFP. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído 1% (p/v). Los cubres fueron visualizados utilizando un microscopio confocal Olympus FV300, con un objetivo de inmersión en aceite 60X/1,42 NA, y un zoom digital de 3X. La resolución de las imágenes fue de 512x512. La fluorescencia de CFP (donor) e YFP (aceptor) fue adquirida por excitación con láser de Argón a 458 y 515 nm, respectivamente. El canal de emisión fue de 465-495 nm para el donador y de 530-560 nm para el aceptor. Como control positivo, las células fueron transfectadas con una proteína quimérica del vector CFP fusionada con YFP. La técnica elegida para el análisis de FRET fue la de emisión sensibilizada del aceptor. Las imágenes obtenidas fueron posteriormente procesadas utilizando el módulo PFRET para el software FV10-ASW del microscopio FV1000. Los valores obtenidos fueron sometidos a distintos análisis estadísticos para identificar los datos *outliers*, y representados en un *scatter plot* mostrando los datos de un experimento representativo.

Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) y Fluorescence Loss In Photobleaching (FLIP)

Los experimentos de FRAP y FLIP fueron realizados en un microscopio confocal Olympus FluoView FV1000, utilizando un objetivo de inmersión en aceite 63X/1,42 N. En estos experimentos, el *pinhole* fue abierto totalmente para minimizar cambios en la fluorescencia debido al *Z-drift* que pudiera ocurrir durante el tiempo de la adquisición de las imágenes. Para los experimentos de FRAP, el *bleaching* fue realizado utilizando un zoom digital de 50X, 50 escaneos de la región de interés (ROI) seleccionada, 8 μ s/píxel y 100% de

transmisión de los láseres de 515 y 543 nm. Bajo estas condiciones, la fluorescencia de YFP luego del *bleaching* fue menor al 10% del valor inicial. Imágenes pre- y post-*bleaching* (3 y 90, respectivamente) fueron adquiridas cada 10 segundos, con una resolución de 512x512 píxeles. Las imágenes fueron adquiridas secuencialmente para cada canal (YFP y Cherry).

Para los experimentos de FLIP, el *bleaching* del ROI y la adquisición de las imágenes fueron realizadas cada 2 minutos. Las mismas fueron tomadas empleando los mismos parámetros descriptos para FRAP.

Tratamiento con ácido tánico

El tratamiento con ácido tánico fue realizado como se describe en [70], con algunas modificaciones. Brevemente, las células transfectadas fueron traspasadas a Lab-Tek, e incubadas a 37 °C con ácido tánico 1% (p/v) (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) en PBS (pH 7,0) por 10 minutos. Luego, las células fueron preparadas e incubadas para los experimentos de FRAP, como se describió previamente, manteniendo el ácido tánico en el medio. El efecto del mismo fue corroborado analizando la internalización de transferrina.

En los casos indicados, 50 μ M de 2-BP o 10 μ M de Palmostatin B (EMD Chemicals Inc., San Diego, CA, USA) fueron adicionados 45 minutos previo al tratamiento con ácido tánico.

Experimentos de fotoactivación

Las células CHO-K1 fueron cotransfectadas con H-Ras(C181S) o H-Ras(C184S) fusionadas a PA-GFP [32,126] y los marcadores de Golgi GalNAc-T-Cherry o ST3Gal-II-Cherry, y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal. Como se describió previamente, los experimentos fueron realizados utilizando un controlador de temperatura y CO₂ (Tokai hit, Japón) a 37 °C, en el microscopio Olympus FluoView FV1000. El objetivo utilizado fue el de 63X/1,42 NA con una apertura confocal de 370 μ m (feta óptica de 2,3 μ m).

Para la fotoactivación en complejo de Golgi, el área a ser fotoactivada fue seleccionada teniendo en cuenta la señal de los marcadores de Golgi, en el canal Cherry. Dicho ROI fue irradiado con un láser de 405 nm, a una intensidad de 1-10%, durante 5 segundos. Las imágenes post-activación fueron tomadas con excitación a 488 y 543, para adquirir la fluorescencia de GFP y Cherry, respectivamente. Las mismas se tomaron cada 15 segundos durante 20 minutos.

Para la fotoactivación en el retículo endoplásmico/citosol, una región alejada del complejo de Golgi fue seleccionada e irradiada con el láser de 405 nm, a una intensidad del 1%, durante 5 segundos. Las imágenes post-activación fueron tomadas cada 15 segundos durante 15 segundos. Luego, el proceso fue repetido 7 veces. En este caso, las células fueron incubadas con cicloheximida 1 hora previo al inicio del experimento.

Experimentos control para descartar el bleaching de la fluorescencia fueron realizados utilizando el vector vacío de PA-GFP, con las condiciones de adquisición de las imágenes descritas.

Análisis cuantitativo de las imágenes

El análisis de todas las imágenes de microscopía de las diferentes técnicas empleadas, fue realizado con el software ImageJ.

Los píxeles con fluorescencia significativa fueron seleccionados aplicando un *threshold* para discriminar los píxeles con intensidad diferente al ruido del *background*.

Máscaras binarias (con valores de 1 en la señal y 0 en los píxeles del *background*) fueron generadas con dicho umbral, utilizando los canales de los marcadores (en el caso de la cuantificación de fluorescencia en Golgi) o el mismo canal de la proteína a analizar, según corresponda para cada caso. Dichas máscaras fueron multiplicadas por las imágenes "crudas" correspondientes, utilizando la herramienta de cálculos de imágenes. Distintos ROIs fueron generados en las imágenes resultantes, según el área a analizar. Los datos obtenidos fueron relativizados de tal manera de poder realizar la comparación entre los distintos experimentos llevados a cabo.

En todos los casos, los gráficos y el análisis estadístico de los mismos fueron realizados con el software GraphPad Prism.

BIBLIOGRAFÍA

Biblioteca de Ciencias Químicas UN

1. Nadolski, M.J. and M.E. Linder, *Protein lipidation*. FEBS J, 2007. **274**(20): p. 5202-10.
2. Levental, I., M. Grzybek, and K. Simons, *Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts*. Biochemistry, 2010. **49**(30): p. 6305-16.
3. Hang, H.C. and M.E. Linder, *Exploring protein lipidation with chemical biology*. Chem Rev, 2011. **111**(10): p. 6341-58.
4. Paulick, M.G. and C.R. Bertozzi, *The glycosylphosphatidylinositol anchor: a complex membrane-anchoring structure for proteins*. Biochemistry, 2008. **47**(27): p. 6991-7000.
5. Mann, R.K. and P.A. Beachy, *Novel lipid modifications of secreted protein signals*. Annu Rev Biochem, 2004. **73**: p. 891-923.
6. Nusse, R., *Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface*. Development, 2003. **130**(22): p. 5297-305.
7. Wright, L.P. and M.R. Philips, *Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras*. J Lipid Res, 2006. **47**(5): p. 883-91.
8. Salaun, C., J. Greaves, and L.H. Chamberlain, *The intracellular dynamic of protein palmitoylation*. J Cell Biol, 2010. **191**(7): p. 1229-38.
9. Magee, A.L., et al., *Dynamic fatty acylation of p21N-ras*. EMBO J, 1987. **6**(11): p. 3353-7.
10. Chamberlain, L.H., et al., *Palmitoylation and the trafficking of peripheral membrane proteins*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(1): p. 62-6.
11. Martin, B.R., et al., *Global profiling of dynamic protein palmitoylation*. Nat Methods, 2012. **9**(1): p. 84-9.
12. Lin, D.-T. and E. Conibear, *ABHD17 proteins are novel protein depalmitoylases that regulate N-Ras palmitate turnover and subcellular localization*. Elife, 2015. **4**.
13. Dallavilla, T., et al., *Model-Driven Understanding of Palmitoylation Dynamics: Regulated Acylation of the Endoplasmic Reticulum Chaperone Calnexin*. PLoS Comput Biol, 2016. **12**(2): p. e1004774.
14. Chamberlain, L.H. and M.J. Shipston, *The physiology of protein S-acylation*. Physiol Rev, 2015. **95**(2): p. 341-76.
15. Muszbek, L., et al., *The pool of fatty acids covalently bound to platelet proteins by thioester linkages can be altered by exogenously supplied fatty acids*. Lipids, 1999. **34** Suppl: p. S331-7.

16. 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.
17. Martin, B.R. and B.F. Cravatt, *Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells*. Nat Methods, 2009. **6**(2): p. 135-8.
18. Blanc, M., et al., *SwissPalm: Protein Palmitoylation database*. F1000Res, 2015. **4**: p. 261.
19. Resh, M.D., *Fatty Acylation of Proteins: The Long and the Short of it*. Prog Lipid Res, 2016.
20. Ren, J., et al., *CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction*. Protein Eng Des Sel, 2008. **21**(11): p. 639-44.
21. Wang, X.B., et al., *Prediction of palmitoylation sites using the composition of k-spaced amino acid pairs*. Protein Eng Des Sel, 2009. **22**(11): p. 707-12.
22. Li, Y.X., Y.H. Shao, and N.Y. Deng, *Improved prediction of palmitoylation sites using PWMs and SVM*. Protein Pept Lett, 2011. **18**(2): p. 186-93.
23. Kumari, B., R. Kumar, and M. Kumar, *PalmPred: an SVM based palmitoylation prediction method using sequence profile information*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89246.
24. Blaskovic, S., M. Blanc, and F.G. van der Goot, *What does S-palmitoylation do to membrane proteins?* FEBS J, 2013. **280**(12): p. 2766-74.
25. Charollais, J. and F.G. Van Der Goot, *Palmitoylation of membrane proteins (Review)*. Mol Membr Biol, 2009. **26**(1): p. 55-66.
26. Mukherjee, A., et al., *Cysteine palmitoylation of the γ subunit has a dominant role in modulating activity of the epithelial sodium channel*. J Biol Chem, 2014. **289**(20): p. 14351-9.
27. Runkle, K.B., et al., *Inhibition of DHHC20-Mediated EGFR Palmitoylation Creates a Dependence on EGFR Signaling*. Mol Cell, 2016. **62**(3): p. 385-96.
28. Miggin, S.M., O.A. Lawler, and B.T. Kinsella, *Palmitoylation of the human prostacyclin receptor. Functional implications of palmitoylation and isoprenylation*. J Biol Chem, 2003. **278**(9): p. 6947-58.
29. Shahinian, S. and J.R. Silvius, *Doubly-lipid-modified protein sequence motifs exhibit long-lived anchorage to lipid bilayer membranes*. Biochemistry, 1995. **34**(11): p. 3813-22.
30. Greaves, J. and L.H. Chamberlain, *Palmitoylation-dependent protein sorting*. J Cell Biol, 2007. **176**(3): p. 249-54.

31. Melkonian, K.A., et al., *Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3910-7.
32. Rocks, O., et al., *An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms.* Science, 2005. **307**(5716): p. 1746-52.
33. 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.
34. Linder, M.E. and R.J. Deschenes, *Palmitoylation: policing protein stability and traffic.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(1): p. 74-84.
35. 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.
36. Berthiaume, L. and M.D. Resh, *Biochemical characterization of a palmitoyl acyltransferase activity that palmitoylates myristoylated proteins.* J Biol Chem, 1995. **270**(38): p. 22399-405.
37. Mitchell, D.A., et al., *Protein palmitoylation by a family of DHHC protein S-acyltransferases.* J Lipid Res, 2006. **47**(6): p. 1118-27.
38. Tsutsumi, R., Y. Fukata, and M. Fukata, *Discovery of protein-palmitoylating enzymes.* Pflugers Arch, 2008. **456**(6): p. 1199-206.
39. Lobo, S., et al., *Identification of a Ras palmitoyltransferase in Saccharomyces cerevisiae.* J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 41268-73.
40. 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.
41. Conibear, E. and N.G. Davis, *Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance.* J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 23): p. 4007-10.
42. 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.
43. González Montoro, A., et al., *A novel motif at the C-terminus of palmitoyltransferases is essential for Suf1 and Pfa3 function in vivo.* Biochem J, 2009. **419**(2): p. 301-8.
44. 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. **285**(49): p. 38104-14.

45. Jennings, B.C. and M.E. Lindert, *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.
46. Roth, A.F., et al., *Global analysis of protein palmitoylation in yeast*. Cell, 2006. **125**(5): p. 1003-13.
47. Chavda, B., J.A. Arnott, and S.L. Plancy, *Targeting protein palmitoylation: selective inhibitors and implications in disease*. Expert Opin Drug Discov, 2014. **9**(9): p. 1005-19.
48. Zeidman, R., C.S. Jackson, and A.I. Magee, *Protein acyl thioesterases (Review)*. Mol Membr Biol, 2009. **26**(1): p. 32-41.
49. Lin, D.T. and E. Conibear, *Enzymatic protein depalmitoylation by acyl protein thioesterases*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(2): p. 193-8.
50. Camp, L.A. and S.L. Hofmann, *Purification and properties of a palmitoyl-protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras*. J Biol Chem, 1993. **268**(54): p. 22566-74.
51. Camp, L.A., et al., *Molecular cloning and expression of palmitoyl-protein thioesterase*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 23212-9.
52. Verkruyse, L.A. and S.L. Hofmann, *Lysosomal targeting of palmitoyl-protein thioesterase*. J Biol Chem, 1996. **271**(26): p. 15831-6.
53. Duncan, J.A. and A.G. Gilman, *A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein alpha subunits and p21(RAS)*. J Biol Chem, 1998. **273**(25): p. 15830-7.
54. Sugimoto, H., H. Iwayashi, and S. Yamashita, *Purification, cDNA cloning, and regulation of lysophospholipase from rat liver*. J Biol Chem, 1996. **271**(13): p. 7705-11.
55. Wang, A., R.A. Deems, and E.A. Dennis, *Cloning, expression, and catalytic mechanism of murine lysophospholipase I*. J Biol Chem, 1997. **272**(19): p. 12723-9.
56. Hirano, T., et al., *Thioesterase activity and subcellular localization of acylprotein thioesterase 1/lysophospholipase I*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1791**(8): p. 797-805.
57. Wang, A., et al., *Regiospecificity and catalytic triad of lysophospholipase I*. J Biol Chem, 1997. **272**(35): p. 22030-6.
58. Devedjiev, Y., et al., *Crystal structure of the human acyl protein thioesterase I from a single X-ray data set to 1.5 Å*. Structure, 2000. **8**(11): p. 1137-46.
59. Yeh, D.C., et al., *Depalmitoylation of endothelial nitric-oxide synthase by acyl-protein thioesterase 1 is potentiated by Ca(2+)-calmodulin*. J Biol Chem, 1999. **274**(46): p. 33148-54.

60. 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. 31740-52.
61. Toyoda, T., H. Sugimoto, and S. Yamashita, *Sequence, expression in Escherichia coli, and characterization of lysophospholipase II*. Biochim Biophys Acta, 1999. **1437**(2): p. 182-93.
62. Rusch, M., et al., *Identification of acyl protein thioesterases 1 and 2 as the cellular targets of the Ras-signaling modulators palmostatin B and M*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(42): p. 9838-42.
63. Görmer, K., et al., *Chemical-biological exploration of the limits of the Ras de- and repalmitoylating machinery*. Chembiochem, 2012. **13**(7): p. 1017-23.
64. Tian, L., et al., *Distinct acyl protein transferases and thioesterases control surface expression of calcium-activated potassium channels*. J Biol Chem, 2012. **287**(18): p. 14718-25.
65. Wang, A., et al., *Subcellular localization and PKC-dependent regulation of the human lysophospholipase A/acyl-protein thioesterase in WTSH cells*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1484**(2-3): p. 207-14.
66. Kong, E., et al., *Dynamic palmitoylation links cytosol-membrane shuttling of acyl-protein thioesterase-1 and acyl-protein thioesterase-2 with that of proto-oncogene H-ras product and growth-associated protein-43*. J Biol Chem, 2013. **288**(13): p. 9112-25.
67. Vartak, N., et al., *The autodepalmitoylating activity of APT maintains the spatial organization of palmitoylated membrane proteins*. Biophys J, 2014. **106**(1): p. 93-105.
68. 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.
69. Davda, D. and B.R. Martin, *Acyl protein thioesterase inhibitors as probes of dynamic S-palmitoylation*. Medchemcomm, 2014. **5**(3): p. 268-276.
70. Trenchi, A., G.A. Gomez, and J.L. Daniotti, *Dual acylation is required for trafficking of growth-associated protein-43 (GAP-43) to endosomal recycling compartment via an Arf6-associated endocytic vesicular pathway*. Biochem J, 2009. **421**(3): p. 357-69.
71. Bürger, M., et al., *Crystal structure of the predicted phospholipase LYPLAL1 reveals unexpected functional plasticity despite close relationship to acyl protein thioesterases*. J Lipid Res, 2012. **53**(1): p. 43-50.
72. Jia, L., et al., *A mechanism regulating G protein-coupled receptor signaling that requires cycles of protein palmitoylation and depalmitoylation*. J Biol Chem, 2014. **289**(9): p. 6249-57.

73. Zimmermann, T.J., et al., *Boron-based inhibitors of acyl protein thioesterases 1 and 2*. *Chembiochem*, 2013. **14**(1): p. 115-22.
74. Vujic, I., et al., *Acyl protein thioesterase 1 and 2 (APT-1, APT-2) inhibitors palmostatin B, ML348 and ML349 have different effects on NRAS mutant melanoma cells*. *Oncotarget*, 2016.
75. Yokoi, N., et al., *Identification of PSD-95 Depalmitoylating Enzymes*. *J Neurosci*, 2016. **36**(24): p. 6431-44.
76. Resh, M.D., *Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation*. *Methods*, 2006. **40**(2): p. 191-7.
77. 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.
78. Draper, J.M. and C.D. Smith, *Palmitoyl acyltransferase assays and inhibitors (Review)*. *Mol Membr Biol*, 2009. **26**(1): p. 5-13.
79. Hang, H.C., J.P. Wilson, and G. Charron, *Bioorthogonal chemical reporters for analyzing protein lipidation and lipid trafficking*. *Acc Chem Res*, 2011. **44**(9): p. 699-708.
80. Martin, B.R., *Non-radioactive analysis of dynamic protein palmitoylation*. *Curr Protoc Protein Sci*, 2013. **73**(Unit 14 5).
81. Wan, J., et al., *Palmitoylated proteins: purification and identification*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(7): p. 1573-84.
82. Coleman, R.A., et al., *2-Bromopalmitoyl-CoA and 2-bromopalmitate: promiscuous inhibitors of membrane-bound enzymes*. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1125**(2): p. 203-9.
83. Webb, V.J., Hermida-Matsumoto, and M.D. Resh, *Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(1): p. 261-70.
84. Davda, D., et al., *Profiling targets of the irreversible palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate*. *ACS Chem Biol*, 2013. **8**(9): p. 1912-7.
85. Zheng, B., et al., *2-Bromopalmitate analogues as activity-based probes to explore palmitoyl acyltransferases*. *J Am Chem Soc*, 2013. **135**(19): p. 7082-5.
86. Jennings, B.C., et al., *2-Bromopalmitate and 2-(2-hydroxy-5-nitro-benzylidene)-benzo(b)thiophen-3-one inhibit DHHC-mediated palmitoylation in vitro*. *J Lipid Res*, 2009. **50**(2): p. 233-42.

87. Zheng, B., S. Zhu, and X. Wu, *Clickable analogue of cerulenin as chemical probe to explore protein palmitoylation*. ACS Chem Biol, 2015. **10**(1): p. 115-21.
88. Hamel, L.D., et al., *Identification of Protein Palmitoylation Inhibitors from a Scaffold Ranking Library*. Comb Chem High Throughput Screen, 2016.
89. Deck, P., et al., *Development and biological evaluation of acyl protein thioesterase 1 (APT1) inhibitors*. Angew Chem Int Ed Engl, 2005. **44**(31): p. 4975-80.
90. Dekker, F.J., et al., *Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling*. Nat Chem Biol, 2010. **6**(6): p. 449-56.
91. Xu, J., et al., *Inhibiting the palmitoylation/depalmitoylation cycle selectively reduces the growth of hematopoietic cells expressing oncogenic Nras*. Blood, 2012. **119**(4): p. 1032-5.
92. Hedberg, C., et al., *Development of highly potent inhibitors of the Ras-targeting human acyl protein thioesterases based on substrate similarity design*. Angew Chem Int Ed Engl, 2011. **50**(42): p. 9832-7.
93. Adibekian, A., et al., *Confirming target engagement for reversible inhibitors in vivo by kinetically tuned activity-based probes*. J Am Chem Soc, 2012. **134**(25): p. 10345-8.
94. Adibekian, A., et al., *Click-generated triazole ureas as ultrapotent in vivo-active serine hydrolase inhibitors*. Nat Chem Biol, 2011. **7**(7): p. 469-78.
95. Child, M.A., et al., *Small-molecule inhibition of a depalmitoylase enhances Toxoplasma host-cell invasion*. Nat Chem Biol, 2013. **9**(10): p. 651-6.
96. Agudo-Ibañez, L., et al., *H-ras distribution and signaling in plasma membrane microdomains are regulated by acylation and deacylation events*. Mol Cell Biol, 2015. **35**(11): p. 1898-914.
97. Gomez, G.A. and J.L. Daniotti, *H-Ras dynamically interacts with recycling endosomes in CHO-K1 cells: involvement of Rab5 and Rab11 in the trafficking of H-Ras to this pericentriolar endocytic compartment*. J Biol Chem, 2005. **280**(41): p. 34997-5010.
98. Roy, S., et al., *Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(15): p. 6722-33.
99. Rocks, O., et al., *The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins*. Cell, 2010. **141**(3): p. 458-71.
100. Cox, A.D., et al., *Drugging the undruggable RAS: Mission possible?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(11): p. 828-51.

101. Zuber, M.X., S.M. Strittmatter, and M.C. Fishman, *A membrane-targeting signal in the amino terminus of the neuronal protein GAP-43*. Nature, 1989. **341**(6240): p. 345-8.
102. Skene, J.H. and I. Virág, *Posttranslational membrane attachment and dynamic fatty acylation of a neuronal growth cone protein, GAP-43*. J Cell Biol, 1989. **108**(2): p. 613-24.
103. Gauthier-Kemper, A., et al., *Interplay between phosphorylation and palmitoylation mediates plasma membrane targeting and sorting of GAP43*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(21): p. 3284-99.
104. Prior, I.A. and J.F. Hancock, *Ras trafficking, localization and compartmentalized signalling*. Semin Cell Dev Biol, 2012. **23**(2): p. 145-53.
105. Ahearn, I.M., et al., *Regulating the regulator: post-translational modification of RAS*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2012. **13**(1): p. 39-51.
106. Eisenberg, S., et al., *The role of palmitoylation in regulating Ras localization and function*. Biochem Soc Trans, 2013. **41**(1): p. 79-83.
107. Rocks, O., A. Peyker, and P.I. Bastiaens, *Spatio-temporal segregation of Ras signals: one ship, three anchors, many harbors*. Curr Opin Cell Biol, 2006. **18**(4): p. 351-7.
108. Hancock, J.F., H. Paterson, and C.J. Marshall, *A Polybasic Domain or Palmitoylation Is Required in Addition to the CAAX Motif to Localize p21ras to the Plasma Membrane*. Cell, 1990. **63**: p. 133-139.
109. Swarthout, J.T., et al., *DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras*. J Biol Chem, 2005. **280**(35): p. 31141-8.
110. Choy, E., et al., *Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi*. Cell, 1999. **98**(1): p. 69-80.
111. Apolloni, V., et al., *H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(7): p. 2475-87.
112. Maggio, B., et al., *Regulation by gangliosides and sulfatides of phospholipase A2 activity against dipalmitoyl- and dilauroylphosphatidylcholine in small unilamellar bilayer vesicles and mixed monolayers*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1190**(1): p. 137-48.
113. Ransac, S., et al., *Monolayer techniques for studying phospholipase kinetics*. Methods Enzymol, 1991. **197**: p. 49-65.
114. Baker, T.L., et al., *Distinct rates of palmitate turnover on membrane-bound cellular and oncogenic H-ras*. J Biol Chem, 2003. **278**(21): p. 19292-300.

115. De Moliner, K.L., et al., *Growth-associated protein-43 is degraded via the ubiquitin-proteasome system*. J Neurosci Res, 2005. **79**(5): p. 652-60.
116. Denny, J.B., *Growth-associated protein of 43 kDa (GAP-43) is cleaved nonprocessively by the 20S proteasome*. Eur J Biochem, 2004. **271**(12): p. 2480-93.
117. Spiegel, J., et al., *Small-molecule modulation of Ras signaling*. Nat Chem Biol, 2014. **10**(8): p. 613-22.
118. Cox, A.D., C.J. Der, and M.R. Philips, *Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery?* Clin Cancer Res, 2015. **21**(8): p. 1819-27.
119. Beronja, S., et al., *RNAi screens in mice identify physiological regulators of oncogenic growth*. Nature, 2013. **501**(7466): p. 185-90.
120. Berg, V., et al., *miR-138 and -424 control palmitoylation-dependent CD95-mediated cell death by targeting acyl protein thioesterases 1 and 2 in CLL*. Blood, 2015. **125**(19): p. 2948-57.
121. Chiu, V.K., et al., *Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(5): p. 343-50.
122. Misaki, R., et al., *Palmitoylated Ras proteins traffic through recycling endosomes to the plasma membrane during exocytosis*. J Cell Biol, 2010. **191**(1): p. 23-9.
123. Lu, J.Y. and S.L. Hofmann, *Depalmitoylation of CAAX motif proteins. Protein structural determinants of palmitate turnover rate*. J Biol Chem, 1995. **270**(13): p. 7251-6.
124. Arozarena, I., F. Calvo, and P. Crespo, *Ras, an actor on many stages: posttranslational modifications, localization, and site-specified events*. Genes Cancer, 2011. **2**(3): p. 182-94.
125. Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy, *Studying protein dynamics in living cells*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(6): p. 444-56.
126. Patterson, G.H. and J. Lippincott-Schwartz, *A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells*. Science, 2002. **297**(5588): p. 1873-7.
127. 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, 2015. **469**(1): p. 83-95.
128. Gorfe, A.A. and J.A. McCammon, *Similar membrane affinity of mono- and Di-S-acylated ras membrane anchors: a new twist in the role of protein lipidation*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(38): p. 12624-5.

129. Fukata, Y., et al., *Local palmitoylation cycles define activity-regulated postsynaptic subdomains*. J Cell Biol, 2013. **202**(1): p. 145-61.
130. 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.
131. Giraudo, 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.
132. Uliana, A.S., et al., *Modulation of GalT1 and SiaT1 sub-Golgi localization by SiaT2 expression reveals an organellar level of glycolipid synthesis control*. J Biol Chem, 2006. **281**(43): p. 32852-60.

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC

Biblioteca de Ciencias Químicas UNC