

CONICET



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



Departamento de  
**QUÍMICA BIOLÓGICA**  
**Ranwel Caputto**

Facultad de Ciencias Químicas (UNC)

C I Q U I B I C

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

# **Desarrollo de métodos de búsqueda de inhibidores de Palmitoiltransferasas**

**Lic. Consuelo Coronel**

Director: Dr. Javier Valdez Taubas



Departamento de  
**QUÍMICA BIOLÓGICA**  
**Ranwel Caputto**  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Nacional de Córdoba

C I Q U I B I C

Tesis de doctorado en Ciencias Químicas

# Desarrollo de métodos de búsqueda de inhibidores de Palmitoiltransferasas

**Lic. Consuelo Coronel**

Director: Dr. Javier Valdez Taubas

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA (CIQUBIC-CONICET),  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA RANWEL CAPUTTO

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**-2021-**

## Director de Tesis

Dr. Javier Valdez Taubas

## Comisión de Tesis

Dr. José Luis Barra

Dra. Lilian Canavoso

Dr. Marcos Villarreal

## Evaluador Externo

Dr. Ricardo Miguel Biondi

Que nada nos defina. Que nada nos sujete.  
Que sea la libertad nuestra propia sustancia.

Simone de Beauvoir

# AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en primera instancia a la Universidad Nacional de Córdoba que me cobija desde los 10 años. A la Escuela Superior de Comercio Manuel Belgrano que despertó en mí el interés por la ciencia y por la política, que me enseñó a ser independiente y siempre mirar todo con ojo crítico. Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas, por mi formación de grado y posgrado, pero también por la formación en gestión, extensión y articulación. Agradezco al Estado y a todos los argentinos por su continua decisión de apostar por la educación pública, gratuita y de calidad.

Agradezco a mi director de tesis, Dr. Javier Valdez. Gracias Javier por brindarme el lugar y por siempre respetarme, aun en nuestras diferencias. Agradezco tu buen trato y que siempre tuvieras la puerta abierta para hablar. Hiciste del labo un lugar lindo para habitar. Sos un docente ejemplar y eso es una de las cosas que más admiro de vos, tu dedicación y empatía con los estudiantes.

A mi comisión de tesis que siempre me alentó, me escuchó con atención y me ayudó a crecer. Sus aportes fueron siempre interesantes y las reuniones muy amenas. Me queda un cariño grande por cada uno de ustedes.

A nuestros colaboradores de estos años. Las Dras. Andrea Rópolo y Carolina Touz, y a su grupo, que me hicieron sentir en casa mientras trabajé con las simpáticas Giardias. Al Dr. Gastón Soria y la Dra. Alejandra García, que nos prestaron su colección de drogas y su fuerza de trabajo. Gracias.

Al CIQUIBIC-Dpto. de Química Biológica Ranwel Caputto, una institución diversa pero donde siempre y por sobre todo prima el espíritu colaborativo. A cada persona que lo habita, gracias. Especialmente a mis compañeros becarios que siempre están para compartir un reactivo, una queja, un festejo o simplemente una sonrisa. No quiero dejar de mencionar a Cesar y a la Sole, cuando sea grande quiero ser como ustedes, son los mejores.

A mis amigos de todos los días. Al Gonza, no tengo palabras que alcancen para decirle lo mucho que lo quiero y lo agradecida que estoy. Amigo hace 10 años que estamos codo a codo y ojalá sean mil años más. Ni la distancia ni el tiempo podrán opacar estos años de risas, compañerismo y cariño infinito. A Luz, que alegra el labo desde el minuto que entra, tu risa y tu suave voz son de lo más lindo de los últimos años. Esta tesis tiene muchísimo de vos, gracias por tu ayuda y paciencia todos estos años. A la Ro, que llegó para hacernos un labo aun mejor del que ya éramos, gracias por tu buena onda constante, espero que siga creciendo nuestra amistad. A la Sabri, que la extraño cada día, pero que está cerca, aunque este lejos, que desde Alemania nos sigue haciendo llegar ese amor que nunca nos faltó cuando la teníamos acá. Me enseñaste todo lo que se y te pienso siempre, volvé prontito. Al Quiro, me hiciste llorar cuando te fuiste, pero hasta hoy me haces reír con tus ocurrencias. Te extraño, pero falta poco para que vuelvas y me hagas un guiso, eso me pone contenta. A la Aye, el faro del labo y nuestro modelo a seguir, gracias por mostrarnos la pasión por la ciencia y que la gente brillante también es buena y tierna.

A la May, la Coqui, el Javi y la Tati. Chiquis les quiero con el corazón, los días no hubieran sido iguales sin ustedes. Los días difíciles fueron más fáciles con su compañía y los días felices fueron más felices con sus abrazos. Que mis éxitos sean siempre de ustedes también, que nuestras vidas estén siempre enredadas, para que nunca nos falten los abrazos y el amor.

A "La 15 de Junio". Por ser el espacio político que siempre me representó, por ser una parte de mí, por haberme hecho quien soy, por la pasión, por el orgullo que me da lo que hicimos y lo que fuimos. A las personas hermosas que la conforman y la conformaron, que la mayoría son de mis amigos más queridos, esos que van a estar para siempre. Gracias a ellos por ser como son y por estar conmigo.

A la CIFEg, en realidad a las personas que la habitan y habitaron. Hoy son mis compañeras en el objetivo de hacer de esta facultad y de esta sociedad un lugar más justo. Amo este espacio de construcción. Las siento más que compañeras de militancia, amigas en la militancia. Las abrazo.

A Daf, Yeyi, Ale, Coti, Bere y Bel. Todas siempre por caminos cercanos pero distintos supimos hacernos compañía en las buenas y en las malas de la carrera. Gracias por las juntadas que siempre fueron de carcajadas y comida rica.

A la Hele y la Mau, que las quiero con el alma. Hele sos mi mejor amiga y la única poco cuerda que me pidió la tesis para leer desde el día uno. Perdón por no habértela mandado, quería que cuando la tengas dijera entre sus paginas que te quiero un montón. Mau también te quiero hasta el cielo, sos de las pocas que entendió siempre lo que era vivir en un eterno trabajo de taller, estoy terminando la tesis y soy tan feliz como cuando aprobamos en octavo. Que nunca me falten ustedes.

A mi familia, y a Los Casi Familia, que son todo lo que está bien. Abuelos, tíos, primos, y todes. Gracias porque sin cada persona que me alienta no estaría donde estoy. A la Guady, que terminó su tesis antes que yo, pero que festejará esta como festejó la propia. Prima, gracias por hacernos parte de la vida de los dos soles más brillantes de la familia, Alma y Luz, las amo a las tres.

Al Tete y la abuela Nilda. La vida fue más linda cuando estaban para malcriarme. Los extraño siempre.

A mamá, papá y el Naza. Gracias no alcanza. Los amo más que a todo. Soy, porque están conmigo. Que quede constancia que esta tesis es de ellos tanto como mía. Aunque no alcance, gracias infinitas por todo desde siempre. Al amor que no puedo expresar acá se los daré en forma de abrazos cada vez que pueda.

Al Leo, que es el compañero de vida que elijo cada día. Gracias por festejar mis pequeños logros y por secar mis lágrimas más de una vez en estos años. Tus abrazos me dieron la fuerza para seguir y llegar hasta acá. Soy más feliz cuando estamos juntos. Gracias, te amo mucho.

# ÍNDICE

LISTA DE PUBLICACIONES .....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN .....	iii
ABSTRACT .....	v
INTRODUCCIÓN .....	1
Modificaciones lipídicas de proteínas.....	2
S-acilación de proteínas.....	3
S-aciltransferasas .....	6
S-acilación y su rol en la salud humana.....	11
S-acilación y cáncer.....	11
S-acilación y trastornos del sistema nervioso .....	12
S-acilación y enfermedades infecciosas .....	13
Inhibidores de S-aciltransferasas .....	15
Importancia del modelo <i>S. cerevisiae</i> en el estudio de la S-acilación .....	19
OBJETIVOS .....	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
Fundamentos del método .....	23
CAPITULO I: Método de búsqueda de péptidos cíclicos inhibidores .....	25
Introducción .....	25
Creación de cepas para la búsqueda de inhibidores de Akr1 .....	25
Búsqueda de inhibidores de Akr1 .....	28
Método de búsqueda de inhibidores para PATs heterólogas .....	30
Discusión sobre el Capítulo I .....	36
CAPITULO II: Método de búsqueda de drogas inhibidoras .....	38
Introducción .....	38
Creación de cepas para la búsqueda de inhibidores de Akr1 .....	38
Adaptación al crecimiento en medio líquido.....	40
Búsqueda de inhibidores – Primera etapa .....	43
Búsqueda de inhibidores – Segunda etapa .....	46
Segunda validación de candidatos .....	48
Método de búsqueda de inhibidores para PATs heterólogas .....	49
Discusión sobre el Capítulo II y proyecciones .....	52

CONCLUSIÓN .....	55
MATERIALES Y MÉTODOS .....	58
BIBLIOGRAFÍA .....	66
ANEXOS .....	73
I. iAkr1-12.....	74
II. Estudio de la complementación de Akr1 por las PATs de <i>G. lamblia</i> .....	76



## LISTA DE PUBLICACIONES

Los resultados de este trabajo fueron publicados:

**“A novel yeast-based high-throughput method for the identification of protein palmitoylation inhibitors”**. Coronel Arrechea, C; Giolito, M. L.; García, I. A.; Soria, G.; Valdez Taubas, J. Publicado el día 4 de Agosto de 2021 en Open Biology. <https://doi.org/10.1098/rsob.200415>

El desarrollo tecnológico está protegido según el pedido de patente:

**“Método para la identificación de compuestos inhibidores de S-acilación.”**  
Solicitada por la Universidad Nacional de Córdoba (UNC) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Inventores: Valdez, Javier Esteban; Coronel, Consuelo; Giolito, María Luz

## LISTA DE ABREVIATURAS

GPI	Glicosilfosfatidilinositol
MPT	Modificación post traduccional
DTM	Dominio transmembrana
PAT	Palmitoilaciltransferasa o S-aciltransferasa
CoA	Coenzima A
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
HA	Hemaglutinina del virus de la influenza humana
2BP	2-Bromopalmitato
GFP	Proteína fluorescente verde
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
FT	Factor de transcripción. Constructo LexA-VP16-HA-FLAG
EV	Vector vacío
3AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
DO	Densidad óptica



La S-acilación es una modificación postraduccional de proteínas que se caracteriza por el agregado de un ácido graso de cadena larga a una cisteína. El ácido graso que más frecuentemente es añadido es el palmítico por lo cual esta modificación también se conoce como palmitoilación. Una de sus principales características es la reversibilidad, la cual le confiere capacidad regulatoria. La S-acilación ha sido relacionada a importantes procesos como la transducción de señales, la transmisión sináptica y el ciclo visual.

La S-acilación es catalizada por una familia de enzimas llamadas S-aciltransferasas o palmitoiltransferasas (PATs). Son proteínas politópicas de membrana con entre 4 y 6 pasos transmembrana y se caracterizan por tener un dominio conservado denominado DHHC (Asp, His, His, Cys), rico en cisteínas. Fueron descritas inicialmente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* donde se encontraron 7 miembros de la familia, pero están conservadas en todos los organismos eucariotas. A pesar de que existe un creciente interés en estas enzimas debido a que cada vez hay más evidencia de su rol en la salud humana, el campo aún carece de inhibidores específicos para las palmitoiltransferasas. Obtenerlos permitiría avanzar en el entendimiento de los mecanismos de acción y las funciones de estas enzimas, pero también podrían ser de importancia para el tratamiento de algunas enfermedades.

Durante el desarrollo de esta tesis se trabajó en el diseño, implementación y optimización de dos métodos biológicos “*in vivo*” para la búsqueda de inhibidores de estas enzimas. Utilizando como organismo modelo a la levadura *S. cerevisiae* se trabajó en generar nuevas cepas que tuvieran un crecimiento diferenciado en presencia o ausencia de una de las PATs endógenas, Akr1. Posteriormente se pusieron a punto dos ensayos diferentes para rastrear a gran escala posibles inhibidores de esta PAT. El primer ensayo tuvo como objetivo identificar péptidos inhibidores, mientras que el segundo estuvo dirigido a conseguir drogas inhibitorias. Además, confirmamos que estos sistemas biológicos también pueden ser utilizado para la búsqueda de inhibidores de PATs de otros organismos cuya inhibición pueda revestir mayor interés para la salud humana.

A lo largo de la tesis se realizó un desarrollo biotecnológico que sienta las bases para continuar la búsqueda de inhibidores, que aquí se inicia, pero que aún no ha finalizado. Nuestra meta es obtener un inhibidor plenamente funcional y una profunda caracterización del mismo.

ABSTRACT

S-acylation is a post translational modification of proteins characterized by the addition of a long-chain fatty acid to a cysteine residue. The most frequently added fatty acid is palmitic acid and that is why this modification is also known as palmitoylation. This is the only lipid modification that is reversible and therefore capable of regulatory activities. It is involved in important biological processes such as signal transduction, synaptic transmissions, and the visual cycle.

S-acylation is catalyzed by a family of enzymes called S-acyltransferases or palmitoyltransferases. They are polytopic membrane proteins containing 4 to 6 transmembrane domains and a conserved cysteine rich domain called DHHC (Asp, His, His, Cys). This family was initially described in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* which has 7 members, but they are conserved in all eukaryotic organisms. Despite the growing interest in these enzymes the field still lacks specific inhibitors for palmitoyltransferases. These inhibitors would be of great importance for the research field, helping to understand the mechanisms and functions of these enzymes and they could be of importance for the treatment of certain diseases.

In this work we designed and set up two high-throughput “*in vivo*” assays for the identification of palmitoyltransferases inhibitors. Using *S. cerevisiae* as model organism, we generated new strains with differential growth in the presence or absence of the endogenous PAT Akr1. The first assay was designed to find cyclic peptides that could be potential inhibitors and the second one to identify inhibitory drugs. Both assays were proven functional when tested with heterologous PATs that could have a more significant relevance in human health.

We made a technological development to search for PAT inhibitors, we initiated the screen, but it is not finalized yet. Our goal is to obtain a fully functional inhibitor and a deep characterization of it.



Las proteínas, durante y luego de su síntesis, pueden ser modificadas de diferentes maneras lo cual resulta en cambios en su localización subcelular, su conformación e incluso su función. Esos cambios que ocurren en las proteínas pueden ser transcientes o permanentes y traen como resultado un proteoma que puede ser dos o tres órdenes de magnitud más grande que el genoma (1). Existen muchísimas clases de modificaciones co y post traduccionales de proteínas, algunas de las más conocidas y estudiadas son la fosforilación, ubiquitinación, glicosilación, entre otras. En esta tesis nos centraremos principalmente en el estudio de las modificaciones postraduccionales lipídicas y particularmente en la S-acilación.

La modificación de proteínas por la adición de un lípido puede modular la función, localización, plegamiento e incluso la estabilidad de las mismas. Existe una gran variabilidad de lípidos y de formas de unión de esos lípidos a las proteínas por lo cual este campo de estudio es muy amplio y diverso.

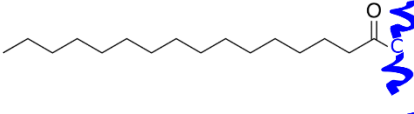
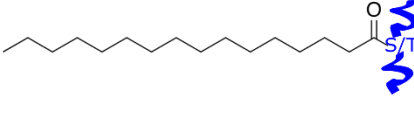
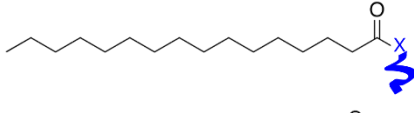
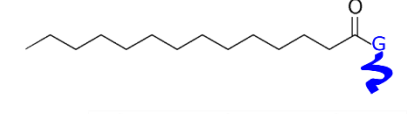
Podemos dividir a grandes rasgos las modificaciones lipídicas como: modificación por colesterol, por fosfolípidos, por glicosilfosfatidilinositol (GPI), por isoprenoides (conocida comúnmente como prenilación) o por ácidos grasos (Figura 1). Las dos primeras son poco comunes y solo se conocen como ejemplos la adición de colesterol a las proteínas Hedgehog y la adición de fosfolípidos a la proteína Atg8/LC3 (2). La modificación por unión de GPIs consiste en la unión de fosfatidilinositol al C-terminal de una proteína mediante un puente de glucosamina y manosa. Su función sería la unión de la proteína a la cara externa de la membrana plasmática. Las proteínas que contienen anclaje por GPI son funcionalmente diversas y tienen roles en la respuesta inmune, transducción de señales y en la patogénesis de enfermedades priónicas, entre otras (3).

La prenilación se da en proteínas que poseen una secuencia CAAX (donde A es cualquier aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido) en su C-terminal. La cisteína del motivo CAAX puede ser modificada con un farnesilo (de 15 carbonos de largo) o con un geranil geranilo (de 20 carbonos de largo) (2). Esta es una modificación irreversible cuya principal función es aumentar la afinidad de la proteína por las membranas debido a la hidrofobicidad que el lípido añade al C-terminal (2,4).

Por último, en las modificaciones por ácidos grasos el lípido añadido es una cadena hidrocarbonada larga y lineal, que puede ser saturada o insaturada, con un grupo carboxilo en el extremo. La N-miristoilación consiste en el agregado del ácido graso mirístico (de 14 carbonos) a una glicina en el N-terminal de la proteína en una secuencia consenso MGXXT/S (donde M es la metionina inicial y X es cualquier aminoácido). Al mismo tiempo en que se lleva a cabo esta modificación se remueve la metionina inicial. Es irreversible y su función es



reforzar la unión a membrana para una correcta localización y función de la proteína. Otras modificaciones son la O-palmitoilación que consiste en la unión de un ácido graso a una serina o treonina y la N-palmitoilación donde el lípido se une al N-terminal de la proteína. La S-acilación o palmitoilación también es una modificación lipídica por agregado de ácidos grasos y es el objeto de estudio de esta tesis.

Modificación	Esquema	Tipo de Enlace
S-Acilación		Tioester a cisteína
O-palmitoilación		Ester a serina o treonina
N-palmitoilación		Amida al aminoácido N-terminal
Miristoilación		Amida a Glicina N-terminal
Prenilación	Farnesilación	Tioeter a cisteína próxima al C-terminal
	Geranil-geranilación	

**Figura 1. Resumen de modificaciones lipídicas de proteínas.** En azul se esquematiza la proteína destacando el aminoácido que participa de la interacción.

#### S-ACILACIÓN DE PROTEÍNAS

Como fue mencionado anteriormente, la S-acilación es una modificación post traduccional (MPT) de proteínas que consiste en la adición de un ácido graso de cadena larga a un residuo cisteína de diferentes proteínas. En general el ácido graso añadido es palmítico (de 16 carbonos), por lo que también se conoce la modificación como palmitoilación de proteínas. Sin embargo, se ha descrito que otros ácidos grasos también pueden unirse, por ejemplo, oleico o esteárico (ambos de 18 carbonos, aunque el primero posee una insaturación) (5). Este proceso está altamente conservado y ocurre en todos los organismos eucariotas analizados hasta el momento e incluso muchas proteínas virales son palmitoiladas por la maquinaria del hospedador. A esta modificación se la ha relacionado a distintos procesos de importancia biológica como por ejemplo el ciclo visual, la transmisión sináptica y cadenas de transducción de señales (6–8).

La unión entre proteína y ácido graso ocurre a través de un enlace tioéster que es lábil, y por ende le confiere a esta MPT la capacidad de ser reversible (Figura 2A). El proceso de remoción del ácido graso se denomina de-acilación. La reversibilidad de esta modificación le confiere capacidades regulatorias, ya que genera dos estados alternativos de la proteína sustrato que pueden tener funcionalidades diferentes. Se cree que podría funcionar como un interruptor biológico que active o desactive diferentes procesos biológicos y que además podría tener un rol fundamental en la regulación dinámica de las proteínas afectando su localización subcelular y su función. Esta característica de ser reversible no es universal y varía de acuerdo con el organismo, la proteína o incluso la cisteína en estudio, es por esto que es aún un desafío del campo comprender en mayor profundidad como se modula esa dinámica en el ciclo de palmitoilación-depalmitoilación (9).

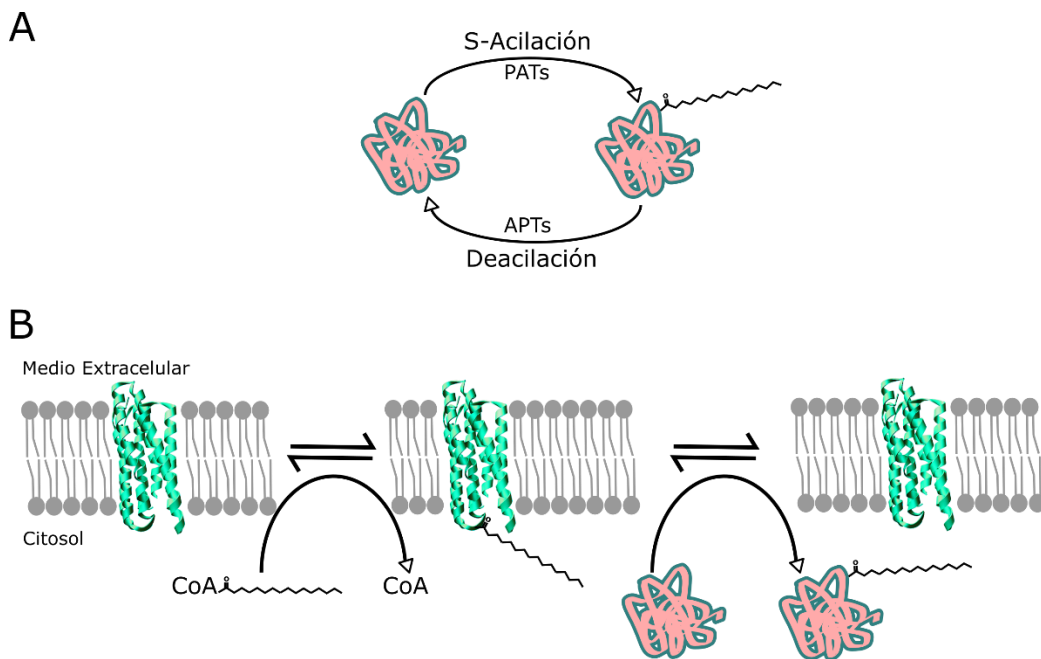
Hasta el momento no se ha descrito un motivo consenso que determine palmitoilación aunque si se han creado algoritmos predictivos que están disponibles en sitios web de acceso público, por ejemplo el CSS-palm (10). Existe además una base de datos donde se nuclean los sitios confirmados o predictivos de palmitoilación (Swiss palm) (11,12). Se ha demostrado que existe palmitoilación tanto en proteínas transmembranas como en proteínas periféricas de membrana (11,13–15). La gran variabilidad de sustratos susceptibles de ser palmitoilados es otra de las características que en los últimos años ha tornado muy interesante a la S-acilación. Se estima que más de un 10% del proteoma humano estaría palmitoilado (11,16).

Si bien el campo de estudio de la S-acilación ha crecido considerablemente en el último tiempo aún queda mucho por explorar a la hora de pensar en las funciones de esta modificación. Su rol principal está altamente asociado al anclaje de proteínas periféricas a membranas, para lo cual se requiere de una doble lipidación, ya sea con dos palmitatos o combinando la palmitoilación con farnesilación o N-miristoilación. Una única modificación lipídica logra asociaciones transcientes con la membrana y al añadirse la segunda el anclaje se vuelve estable. La proteína que sirve como ejemplo de este comportamiento es H-Ras, que se encuentra farnesilada y palmitoilada, y se ha visto que al bloquear el sitio de palmitoilación la asociación a membrana se vuelve débil (17,18). En algunas proteínas la doble lipidación podría ser reemplazada por un palmitato acompañado de una región con aminoácidos cargados positivamente o hidrofóbicos con intrínseca afinidad por membranas, un ejemplo de esto es la proteína SNAP25 (19).

En proteínas transmembrana se ha observado que el palmitato puede servir para acercar a la membrana ciertas regiones citosólicas alejadas, por lo cual tendría un rol estructural al cambiar la conformación de la proteína. Por ejemplo, la palmitoilación de cisteínas en los dominios citosólicos de las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  del canal de sodio epitelial estabilizarían la forma abierta del mismo (20,21).

Otra función estudiada de la S-acilación es la de dirigir las proteínas blanco a subdominios de la membrana plasmática más ricas en colesterol y fosfolípidos saturados, que son más ordenadas y no se disuelven en detergentes (5,18). Es en este contexto que se cree que la palmitoilación tendría un efecto sobre el tráfico intracelular de las proteínas. Ese efecto puede ser directo o indirecto y es difícil discernir de qué forma está actuando, pero se ha visto en algunas proteínas como H-Ras, que alteraciones en las diferentes cisteínas aciladas da como resultado distintas localizaciones subcelulares (17). Otro efecto de la S-acilación en el transporte se observa en proteínas transmembrana con cisteínas modificadas en el borde del dominio transmembrana (DTM). Esta modificación podría cambiar levemente la posición del transmembrana de manera que se solucionen posibles diferencias de hidrofobicidad que ocurren cuando el largo del DTM no coincide con el espesor de la membrana. Esas variaciones de tamaño aparente pueden frenar o activar el tráfico de ciertas proteínas, este es el caso por ejemplo de LRP6 (5).

La estabilidad en la expresión de las proteínas palmitoiladas también podría asociarse a esta modificación. Se ha descrito una relación entre la palmitoilación y la ubiquitinación, en la cual proteínas palmitoiladas que pierden el palmitato se tornan más susceptibles a ser ubiquitinadas y degradadas. En levaduras se describió esta relación para la proteína SNARE Tlg1, que al no poder acilarse es más eficientemente ubiquitinada y termina degradándose en la vacuola (organela degradativa del organismo) (22).



**Figura 2. Características de la S-acilación.** A. La S-Acilación es una modificación reversible. B. Esquema del modelo de S-acilación en dos pasos, donde en verde vemos la PAT y en rosa la proteína sustrato de la modificación.

Respecto del mecanismo por el cual se lleva a cabo la S-acilación se ha llegado al consenso de que puede suceder por dos vías: una vía enzimática y una no enzimática. La vía no enzimática es poco común, algunos ejemplos de proteínas que se modificarían de esta manera son las proteínas TEAD, Bet3 y la glicoproteína P0 de la mielina (2). Se sabe que la autopalmitoilación puede ocurrir en condiciones fisiológicas de la célula en residuos cisteína específicos que en general se encuentran cerca del bolsillo donde se acomoda el palmitato en la proteína. Aún no se sabe con certeza como se regula la autopalmitoilación de proteínas, pero se estima que para ocurrir debería haber formación de un tioato o que puede depender de la disponibilidad de Acil-CoA en la célula (2,23).

La forma más común y descrita de palmitoilación es la enzimática, en la cual una familia de enzimas llamadas S-aciltransferasas catalizan la reacción. El mecanismo tiene dos pasos, el primero consiste en la autopalmitoilación de la enzima y el segundo en la transferencia del palmitato a la proteína sustrato (Figura 2B).

#### S-ACILTRANSFERASAS

La familia de S-aciltransferasas, también conocidas como proteínas DHHC o palmitoiltransferasas (PATs), son las enzimas encargadas de catalizar la S-acilación. Inicialmente fueron descritas en *S. cerevisiae* donde se encontraron 7 miembros de esta familia, pero están conservadas en todos los organismos eucariotas. En humanos se conocen 23 proteínas DHHC.

Se caracterizan por ser proteínas politópicas de membrana con entre 4 y 6 pasos transmembrana, que poseen un dominio característico denominado DHHC que es rico en cisteínas y tiene un motivo Asp-His-His-Cys (DHHC) que le da su nombre. Ese dominio DHHC, de 50 aminoácidos aproximadamente, es el sitio catalítico de la enzima y es la región más conservada en la familia, por eso se ha constituido en una de las formas más comunes de nombrarlas. Otras regiones conservadas son los motivos DPG (Asp-Pro-Gly), que se encuentra cercano al transmembrana 2, el TTxE (Thr-Thr-X es cualquier aminoácido-Glu) cercano al transmembrana 4, y el PaCCT (por sus siglas en inglés Palmitoyltransferases Conserved C-Terminal), este último fue descrito en nuestro laboratorio por la Dra. Ayelén González Montoro y el Dr. Rodrigo Quiroga (Figura 3A) (24). El PaCCT está compuesto por 16 aminoácidos conservados y se ha visto que es esencial para la función de al menos dos PATs de levaduras, Swf1 y Pfa3.

En el año 2013, también en nuestro laboratorio, la Dra. Ayelén González Montoro, propuso para el dominio DHHC de la PAT Swf1 de levadura una estructura de tipo dedos de zinc, consistente de dos bolsillos adyacentes de unión al metal. Cada bolsillo tiene 4 aminoácidos, 3 cisteínas y una histidina, que coordinan un átomo de zinc. En ese trabajo se demuestra por primera vez que

por cada mol de proteína se detectan 2 moles de átomos de zinc y se realizaron una serie de mutaciones puntuales diseñadas para desarmar la estructura propuesta y observar así la pérdida de función de la PAT en estudio (25). Este fue el primer indicio de cómo podría ser la estructura del dominio DHHC. Posteriormente en el año 2018 estas observaciones fueron confirmadas por la cristalización de las primeras PATs, la DHHC20 humana y la DHHC15 del pez cebra (Figura 3B) (16). Lo que se observó en los cristales es que los cuatro pasos transmembrana de las proteínas se juntan hacia el lado luminal y se separan en el lado citoplásmico de la membrana para adoptar una conformación de estilo *tipi*, formando un bolsillo donde se insertaría el acilo. La composición aminoacídica de ese bolsillo determinaría la flexibilidad del mismo y por lo tanto podría ser un determinante del largo del acilo que ingresaría (13). El dominio catalítico DHHC se encuentra entre los transmembranas 2 y 3 en el lado citosólico, y está compuesto por 3  $\alpha$ -hélices seguidas de varias hojas beta paralelas a la membrana. Esas hojas beta forman las horquillas de coordinación de los átomos de zinc. En el C-terminal de la proteína, luego del transmembrana 4, la proteína es citosólica, excepto por una pequeña hélice que se inserta en la membrana plasmática. El dominio PaCCT descrito en nuestro laboratorio se observó en interacción con los transmembranas 3 y 4, y se cree que tendría un rol estructural (13).

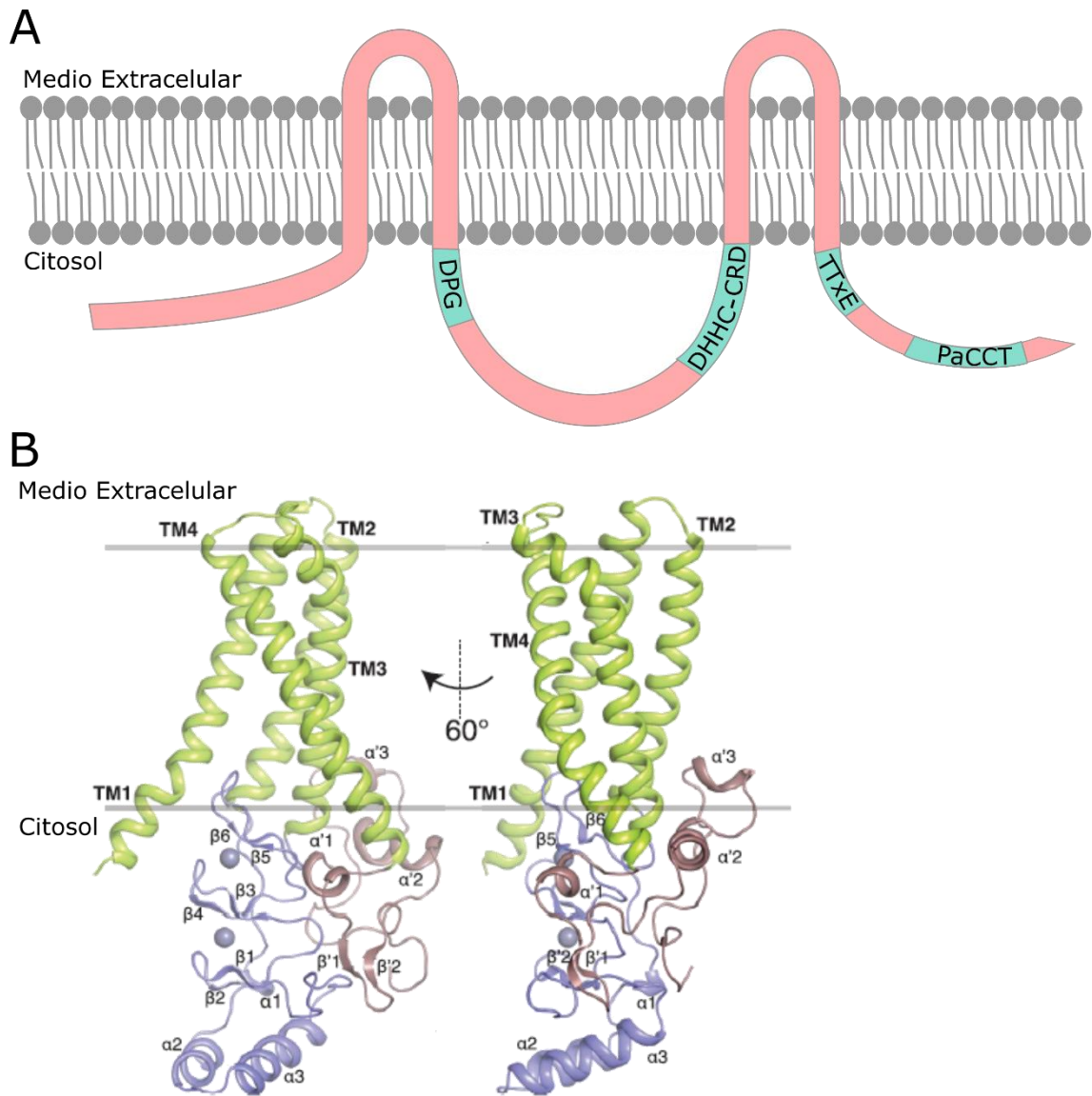
Si bien en los últimos tiempos ha habido avances respecto a la estructura de las PATs quedan muchos temas por profundizar. Uno de los principales tiene que ver con la especificidad de las PATs por sus sustratos. Como se mencionó, hay varias S-aciltransferasas en cada organismo y se ha observado que algunas poseen superposición de sustratos mientras que otras parecen bastante específicas (26). En principio al haber muchos más sustratos de palmitoilación que PATs en todos los organismos se sabe que cada una tendrá varios sustratos, pero cómo se reconocen los pares PAT-sustrato es aún poco claro. Se han descrito para algunas proteínas sustrato, sitios necesarios para la interacción con la PAT. Por ejemplo, en levaduras se observó que la caseína quinasa Yck2, sustrato de la PAT Akr1, posee una señal tripartita de palmitoilación. La misma incluye el dominio quinasa de esta proteína, una secuencia de 10 aminoácidos en donde se encuentran las dos cisteínas modificadas por Akr1 y un dominio intrínsecamente desordenado que podría intervenir acomodando las proteínas para la interacción. Anular cualquiera de estas señales anula la palmitoilación de Yck2 (27).

Aun no se conoce con exactitud como las PATs reconocen a sus sustratos, se postula que habría dos tipos de palmitoiltransferasas, una de baja capacidad y alta especificidad y otras de alta capacidad y baja especificidad. El dominio DHHC no sería el responsable de la especificidad y el reconocimiento de las enzimas, ya que se ha demostrado que intercambiar los DHHC de las PATs no intercambia la especificidad por los sustratos (24). Es por ello que una hipótesis

plantea que el reconocimiento de sustratos estaría en alguna de las otras regiones citosólicas y de hecho, para algunas PATs se conocen los motivos que ayudarían en el reconocimiento de sustrato, por ejemplo, para DHHC17 (ortóloga de la PAT de levadura Akr1). Esta PAT posee un dominio de repetición de ankirinas y es en esa región que distintas proteínas sustrato interactúan, por ejemplo, la proteína Huntingtina, CSP (de las siglas en inglés cysteine-string protein) o la proteína asociada a sinaptosomas, 25 kDa (SNAP25). Incluso se demostró que transferir ese dominio de ankirinas a otra PAT permitió que la nueva PAT palmitoile a Huntingtina (29). Existen distintos tipos de dominios que podrían ser de interacción en las diferentes PATs además de las repeticiones de ankirina, los que se encuentran en PATs de humano pueden verse en la Tabla 1.

Otra hipótesis es que no exista en las PATs una región de reconocimiento, sino que palmitoilen proteínas que se encuentran en la misma localización subcelular que ellas. La mayoría de las PATs se encuentran en el retículo endoplásmico o el aparato de Golgi, aunque algunas se pueden encontrar en la membrana plasmática (30). Se ha observado que esas localizaciones varían de acuerdo con el modelo de estudio y el nivel de expresión de las enzimas, lo ideal sería ver las localizaciones endógenas mediante anticuerpos específicos, pero eso no ha sido sencillo de realizar para la gran mayoría de las S-aciltransferasas. Estas PATs que tienen menor especificidad por sus sustratos tendrían una actividad S-aciltransferasa más robusta, ejemplos de esto serían DHHC3 y DHHC7, que se ubican en el aparato de Golgi (Tabla 1).

En el año 2017, desde el laboratorio de la Dra. Gisou Van der Goot publicaron la primera evidencia de que las PATs podrían actuar en cascadas, de manera similar a como lo hacen las quinasas (31). La enzima que estudiaron es DHHC6 de humanos, la cual está palmitoilada en 3 cisteínas que se encuentran en el C-terminal, en un dominio de tipo SH3\_2. La palmitoilación de esas cisteínas es llevada a cabo por la PAT DHHC16 y es necesaria para el correcto funcionamiento de DHHC6. En ese mismo trabajo también describen que cada sitio de palmitoilación le confiere distintas características a la enzima, con lo cual, dependiendo de qué cisteína esté palmitoilada la proteína puede ser muy activa, pero inestable, o menos activa, pero con una vida media más larga. Este trabajo abre las puertas a profundizar el estudio tanto de la relación entre las enzimas como del rol de la palmitoilación de las PATs en sitios distintos al dominio DHHC (31). DHHC6 no sólo requiere de la palmitoilación de sus cisteínas C-terminales para su correcto funcionamiento, sino también de la Selonoproteína K, que actúa estabilizando el intermediario de autopalmitoilación (32). Otros ejemplos de PATs que también requieren subunidades que las complementen pueden ser, en levaduras, Erf2 con su par Erf4 y en mamíferos DHHC9 con GCP16 (33,34).



**Figura 3. Estructura de las PATs.** A. Esquema de la estructura general de las PATs que muestra sus regiones conservadas y dónde se encuentran. B. Imagen modificada de Rana et al 2018 que muestra la representación de la estructura que se obtuvo de la cristalización de hDHHC20 (16). Las cuatro hélices transmembrana se muestran en verde, el dominio DHHC en lila y el dominio C-terminal en marrón. Las dos esferas representan los átomos de zinc.

**Tabla1. Información general de PATs humanas (2,30,35,36).**

PAT	Localización	Dominio de interacción	Enfermedad
DHHC1	RE		mRNA alto es señal de buena prognosis en cáncer de endometrio, páncreas y renal.
DHHC2	RE, Golgi		mRNA alto es señal de buena prognosis en cáncer renal y de hígado. Es parte de una región delecionada en hepatocarcinoma. Podría tener relación con la Esquizofrenia.
DHHC3	Golgi		mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer de mama e hígado, pero de buena prognosis en cáncer renal y de colon. Está en una región delecionada en cáncer cervical.
DHHC4	RE		mRNA alto es señal de buena prognosis en cáncer renal, pero de mala prognosis en cáncer de cuello, cabeza y cervical.
DHHC5	MP	PDZ	Relacionada a deficiencia de memoria y aprendizaje. Alta expresión, en conjunto con mutaciones en p53 se asocian con baja sobrevida en glioma. mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer de páncreas.
DHHC6	RE	SH3	-
DHHC7	Golgi		Relacionada con la enfermedad de Alzheimer. Se encuentra en una región delecionada en cáncer de mama. Está delecionado en cáncer de ovario y próstata. mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer renal y de hígado.
DHHC8	Golgi	PDZ	Está relacionado a la Esquizofrenia. mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer renal y cervical.
DHHC9	RE, Golgi		Ligada a la deficiencia intelectual ligada al cromosoma X. Necesaria para la palmitoilación de Ras y leucemias relacionadas a N-Ras. Sobre expresado en numerosos cánceres como mama, colon y mieloma múltiple. mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer cervical, de mama, cabeza y cuello.
DHHC11	RE		Su expresión alta en linfoma de Burkitt promueve la proliferación celular. Frecuentemente delecionado en hepatoblastoma. En una región de amplificación en carcinoma de pulmón y vejiga. mRNA alto es señal de buena prognosis en cáncer de páncreas.
DHHC12	RE, Golgi		-
DHHC13	RE, Golgi	Ankirinas	Relacionada con la enfermedad de Huntington. Requerido para la función protectora de MCR1 contra el melanoma y para inhibir el papiloma inducido químicamente.
DHHC14	RE		Deleciones, mutaciones y expresión reducida en cáncer de testículo y próstata. Mutación activadora en leucemia aguda bifenotípica. mRNA alto es señal de buena prognosis en cáncer de páncreas.
DHHC15	Golgi		-
DHHC16	RE		-
DHHC17	Golgi	Ankirinas	Relacionada con la enfermedad de Huntington. mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer renal.
DHHC18	Golgi		mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer renal, de hígado y glioma.
DHHC19	RE		-
DHHC20	MP, Golgi		Se observan altos niveles de mARN en cáncer de ovario, mama, riñón, colon y próstata. mRNA alto es señal de mala prognosis en cáncer renal y de páncreas
DHHC21	MP, Golgi		Relacionada con la enfermedad de Alzheimer. mRNA alto es señal de buena prognosis en cáncer renal y de vejiga.
DHHC22	RE, Golgi		-
DHHC23	RE		Altos niveles de mARN en leucemia linfoblástica aguda de precursores B. mRNA alto es señal de buena prognosis en cáncer renal, pero de mala prognosis en cáncer de endometrio y tiroides.
DHHC24	RE		mRNA alto es señal de mala prognosis en glioblastoma.



## S-ACILACIÓN Y CÁNCER

Existen muchas evidencias de que la desregulación en la S-acilación podría tener relación con el desarrollo y la progresión de distintos tipos de cáncer. De las 23 PATs humanas, la mayoría reportan actividades descritas como oncogénicas o supresoras de tumores, algunas incluso poseen ambas características dependiendo del tejido o tipo de cáncer (Tabla 1) (35). Además, cada vez se torna más interesante el estudio del rol que tendría esta MPT en proteínas que han sido descritas como oncogénicas, por ejemplo, las proteínas de sarcoma de rata (Ras) o el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), o supresoras de tumores como SCRIB. A los fines de ponderar su importancia, podemos decir que de 299 genes reportados como oncogénicos 78 se predicen como palmitoilados por la base de datos SwissPalm, lo que representa más de un cuarto de estas proteínas (35).

Si bien aún falta mucho por estudiar respecto a los pares enzima-sustrato que podrían tener una influencia en el desarrollo de distintos tipos de cáncer, algunos se han investigado con mayor detenimiento. Por ejemplo, se sabe que N-Ras y H-Ras contienen sitios de farnesilación y S-acilación, DHHC9 sería la enzima encargada de la palmitoilación de estas proteínas. Esta modificación se ha descrito como esencial para la correcta localización en membrana plasmática de las proteínas RAS (17,18). El estudio de ratones carentes de DHHC9 mostró una actividad oncogénica reducida de N-Ras y puede disminuir significativamente el desarrollo de leucemia en ratones (35,37,38). Este rol fundamental de la palmitoilación en proteínas de la familia Ras, hace que DHHC9 sea un potencial blanco de interés a la hora de pensar en el desarrollo de nuevas terapias anticancerígenas.

Otra PAT que en los últimos tiempos despertó el interés en relación con su rol en el desarrollo de distintos tipos de cáncer fue DHHC20. El sustrato más interesante de la PAT es posiblemente el EGFR, una quinasa cuyas mutaciones y sobreexpresión están relacionadas al cáncer de mama y pulmón, entre otros. Esta proteína posee dos cisteínas palmitoiladas de las cuales C<sup>1025</sup> es palmitoilada por DHHC20. En la actualidad se utiliza como terapia en pacientes el inhibidor de su actividad quinasa, Gefitinib. El principal problema con esta terapia es que las células cancerígenas se vuelven resistentes luego de un tiempo de tratamiento. Recientemente se ha visto que bloquear la palmitoilación, vuelve a las células dependientes de la actividad quinasa del receptor y las resensibiliza contra el Gefitinib. Es por esto que se ha pensado que un inhibidor de DHHC20 podría utilizarse en conjunto con Gefitinib para una terapia más eficaz (39,40).

El rol de la S-acilación no es sólo importante en procesos oncogénicos, sino que también lo es en la supresión de tumores. SCRIB es una proteína que se ubica en las uniones celulares y tiene un rol fundamental en sostener la polaridad de las células epiteliales. La polaridad celular es importante para evitar la formación de tumores. Se ha observado en los últimos años que la S-acilación de las cisteínas C<sup>4</sup> y C<sup>10</sup> de SCRIB por la PAT DHHC7 es importante para su correcta localización subcelular en membrana plasmática y para su actividad como supresora de tumores (41). En diferentes tipos de cáncer se ha observado que SCRIB está sobre expresada, pero con una incorrecta localización, lo cual estaría relacionado con una disrupción de los ciclos de palmitoilación de la proteína (41,42). En células de cáncer de ovario, por ejemplo, esto puede revertirse sobre expresando la PAT DHHC7. Esta sobre expresión no solo corrige la localización de SCRIB sino que también inhibe la proliferación celular (41).

DHHC7, en conjunto con DHHC21, también se ha visto relacionada al cáncer de mama, ya que estas PATs palmitoilan los receptores esteroideos. Normalmente estos receptores desarrollan la mayoría de sus funciones en núcleo, pero también tienen actividades fuera del mismo. En cáncer de mama resistente a terapias endócrinas se ha observado un aumento de la localización del receptor de estrógeno en la membrana plasmática. La acilación es clave para el tráfico del receptor hacia la membrana plasmática, por lo que estas dos PATs podrían ser interesantes blancos terapéuticos para el tratamiento de este tipo de cáncer (43).

---

#### S-ACILACIÓN Y TRASTORNOS DEL SISTEMA NERVIOSO

Desde que se describió la S-acilación de la proteína SNARE SNAP25, los roles de la palmitoilación en la función neuronal se tornaron de mayor interés (44,45). Al comenzar a estudiar la modificación con más detenimiento en el contexto neuronal se observó que su disrupción está asociada a diversas enfermedades neurodegenerativas.

La enfermedad de Alzheimer es una forma de demencia que afecta principalmente la memoria y el comportamiento de los pacientes. Una de sus características principales es la acumulación de placas amiloides formadas por agregados del péptido  $\beta$ -amiloide. La proteína precursora de amiloide (APP) puede procesarse de manera no amiloidogénica o amiloidogénica, siendo esta última la que da como resultado el  $\beta$ -amiloide. APP está palmitoilada en dos cisteínas por DHHC7 y DHHC21, la sobre expresión de las PATs trae como consecuencia el aumento de APP palmitoilada y de  $\beta$ -amiloide (46).

Huntington es una enfermedad que ocurre cuando la proteína Huntingtina (Htt) se encuentra mutada generando una expansión de las repeticiones de CAG que

la misma posee normalmente, lo que trae como consecuencia la agregación de la proteína. Generalmente se presenta a edades avanzadas y se caracteriza por la degeneración cognitiva y motora de los pacientes. Htt está palmitoilada principalmente por dos PATs, DHHC17 y DHHC13, que serían redundantes en su función respecto a esta proteína. La interacción está bien estudiada y se da a través de las repeticiones de ankirina presentes en las dos PATs. Las evidencias más fuertes de la importancia de la palmitoilación tienen que ver con los modelos de ratones que poseen las PATs deletionadas ya que ambos presentan fenotipos similares al ratón modelo de la enfermedad (con la proteína Htt mutada). En ensayos bioquímicos se ha visto que Htt mutada tiene menos afinidad por las PATs, correlacionando inversamente con el largo de la extensión de CAG. Además en ratones enfermos su palmitoilación es deficiente. La sobreexpresión de DHHC17 en neuronas que expresan Htt mutada es capaz de disminuir la cantidad de agregados que se forman (47).

Por último, experimentos *in vivo* han demostrado que el ratón deficiente en la enzima DHHC5 muestra condicionamiento por miedo alterado, lo cual está asociado a una deficiencia en la memoria y el aprendizaje (5). Además, se han descrito 2 mutaciones puntuales en el gen de DHHC9 que conllevan a deficiencia intelectual ligada al cromosoma X en modelos de ratón. Estas mutaciones causan cambios puntuales en aminoácidos del dominio DHHC y se cree que afectarían principalmente la autoacilación de la enzima (5,38).

---

#### S-ACILACIÓN Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS

Diferentes estudios han mostrado que la S-acilación tiene roles en el desarrollo de enfermedades infecciosas, particularmente de las causadas por virus y parásitos.

En las enfermedades virales se ha visto que algunas de las proteínas codificadas en el ADN o ARN viral deben ser palmitoiladas para su correcta localización y función, siendo la maquinaria del hospedador la que aporta las enzimas y el acil-CoA. Las proteínas espigas de la cubierta de algunos virus son las que principalmente requieren de la acilación para llegar a la membrana plasmática donde se ensamblará el virus. En el caso de la proteína HA del virus de la Influenza A, la modificación es llevada a cabo por DHHC3 y DHHC7 principalmente, y tendría un rol en la cinética de llegada de la proteína a la membrana. Otros ejemplos de la importancia de la S-acilación son dos proteínas (S y E) de virus del tipo coronavirus (SARS, MERS, coronaviridae) donde es crucial para el ensamblado y la producción intracelular. Además, en el virus de la Hepatitis C (flaviviridae, hepacivirus) la palmitoilación de una de las proteínas centrales en una cisteína C-terminal es fundamental para el ensamblaje de la partícula viral (48).

El conocimiento de la importancia de la S-acilación de algunas proteínas para el desarrollo del ciclo viral de algunos virus pone a las PATs como posibles blancos de drogas o terapias antivirales. Sin embargo, hay que tener en consideración que existen también proteínas del sistema inmune que requieren de palmitoilación para funcionar correctamente y que deben ser evaluadas a la hora de pensar en las PATs como blanco de tratamientos antivirales, en particular la proteína estimuladora de genes de interferón (STING) y la proteína transmembrana 3 inducida por interferón (IFITM3). La primera es palmitoilada por DHHC3, DHHC7 y DHHC15, mientras que la segunda esta principalmente palmitoilada por DHHC20, por lo que sería importante que las drogas o tratamientos usados como antivirales no afecten esas PATs. El objetivo para su utilización como blanco terapéutico sería encontrar DHHCs con el mayor efecto en las proteínas virales de interés y el menor efecto en las proteínas celulares (48).

Sumada a la importancia de la S-acilación para las proteínas virales se ha visto que la palmitoilación de algunos receptores humanos es fundamental para el ingreso y multiplicación de los virus, por lo que algunos de esos receptores podrían también ser un blanco terapéutico. La acilación es necesaria para la correcta localización en membrana plasmática de algunos de esos receptores, lo que permite su interacción con el virus. Por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) infecta principalmente los linfocitos T CD4+, la primera interacción entre ellos se da entre las glicoproteínas de la cubierta viral y dos receptores de la célula hospedadora, CD4 y un correceptor, que principalmente es CCR5 (49). Este último tiene un rol clave en el desarrollo del VIH ya que se ha visto que personas con una versión truncada del mismo son inmunes a este virus (50). Este correceptor precisa de la palmitoilación de sus cisteínas C-terminales (C<sup>321</sup>, C<sup>323</sup> y C<sup>324</sup>) para su correcta localización, la falta de la modificación genera una disminución en la cantidad de CCR5 presente en la membrana plasmática, lugar donde lleva a cabo su función (49).

A diferencia de lo que sucede en las enfermedades virales, los parásitos tienen su propio set de palmitoiltransferasas, por ejemplo, *Giardia lamblia* posee 9 DHHCs, *Toxoplasma gondii* 18 DHHCs, y *Trypanosoma cruzi* 15 DHHCs. Aún faltan realizar estudios que terminen de confirmar la actividad PAT de esas DHHC y logren identificar pares PAT-sustrato. Por medio de estudios de palmitoilproteomas se ha visto que un gran número de proteínas se encuentran palmitoiladas en estos organismos y la modificación podría tener un gran impacto en el ciclo de vida de los parásitos y en el desarrollo de las enfermedades que generan (51).

El parásito *G. lamblia* tiene como una de sus características el minimalismo genético, sin embargo, posee 9 PATs que se expresan tanto en la forma invasiva como no invasiva. Se cree que la palmitoilación tiene un rol en la formación de los quistes invasivos, ya que se ha observado que no pueden formarse en

presencia del inhibidor general 2-Bromopalmitato (2-BP). Además, la palmitoilación tiene un rol importante en la variación de los antígenos que presenta el parásito (52,53).

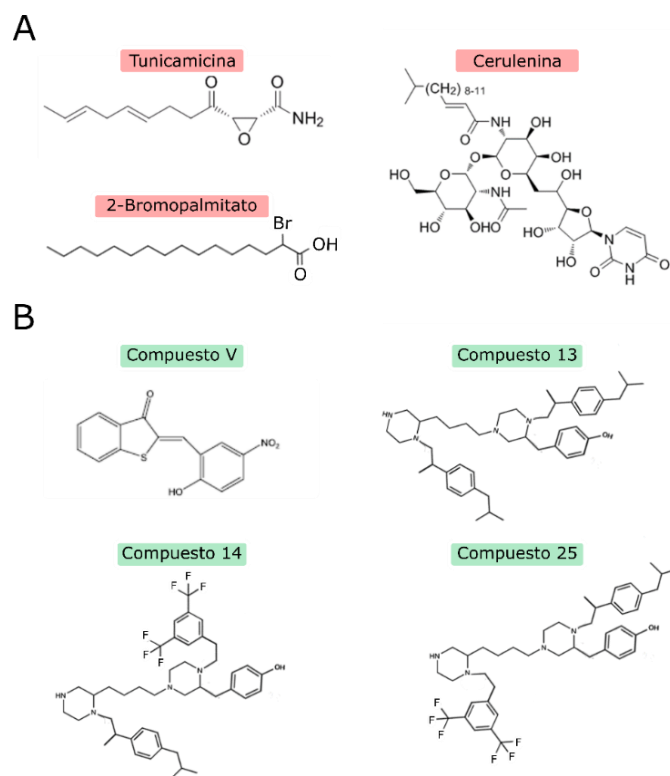
En el caso de parásitos de tipo apicomplexa, como *T. gondii*, se ha visto que hay proteínas palmitoiladas que son importantes para el ciclo de vida, la viabilidad celular, tráfico, movilidad, invasión y salida de células del hospedador. Particularmente para *T. gondii* se ha visto que de sus 18 PATs, 11 serían redundantes y pueden ser eliminadas del genoma, por el contrario 5 no pueden eliminarse, lo que podría indicar que tienen un rol importante para el parásito (51).

Por último, en los parásitos de la familia Trypanosomatidae como *T. cruzi*, la palmitoilación tiene un rol importante en el transporte de las proteínas sustrato hacia las organelas blanco. Varios de esos sustratos son importantes para la virulencia del parásito (51). Particularmente en *T. cruzi* se ha visto que el uso de 2-BP causa efectos en la morfología del parásito, en el transporte intracelular (particularmente en la endocitosis) y en la infectividad (54). Es interesante que en tripanosomátidos ya se ha validado a la miristoilación como un blanco para drogas, y se cree que la inhibición de la palmitoilación podría ser una nueva alternativa (51).

#### INHIBIDORES DE S-ACILTRANSFERASAS

Hasta el momento no existen inhibidores específicos de palmitoiltransferasas que se hayan probado efectivos. Esta deficiencia en el campo dificulta poder avanzar en el entendimiento de esta modificación post traduccional. En los últimos años se ha tornado cotidiano ver en trabajos de investigación y de revisión que se destaca la fuerte necesidad de conseguir estos inhibidores específicos, tanto para desarrollos clínicos como para continuar con las investigaciones básicas en los laboratorios (5,16,35,40).

En la actualidad lo que más comúnmente se utiliza son inhibidores no específicos, los más comunes son 2-Bromopalmitato (2-BP), cerulenina y tunicamicina (Figura 4A). Si bien todas han demostrado tener efecto sobre la palmitoilación de distintas proteínas estas drogas no han sido diseñadas para inhibir la palmitoilación, sino que tienen efectos generales en la síntesis de lípidos. La cerulenina particularmente inhibe la síntesis de ácidos grasos y también genera una reducción del colesterol y otros esteroides. Por su parte la tunicamicina es un conocido inhibidor de N-glicosilación, por lo tanto, su uso no sólo afecta la palmitoilación sino que debe utilizarse con muchísimos cuidados para no afectar la correcta síntesis de un gran número de proteínas (55).



**Figura 4. Inhibidores de PATs.** A. Inhibidores generales de palmitoilación. Se caracterizan por ser poco específicos. B. Posibles inhibidores encontrados en trabajos de búsqueda a gran escala. Las representaciones son esquemáticas.

El inhibidor 2-BP es el más ampliamente utilizado en la literatura. Se ha informado que no solo tiene efecto sobre las palmitoiltransferasas sino que también inhibe la actividad de la enzima palmitoiltransferasa de carnitina-1 (CPT1), lo cual impide la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos y por otro lado muestra efectos sobre el NADH, la citocromo C reductasa y la glucosa-6-fosfato (55,56). Además, existe la complejidad de que el uso de 2-BP no solo inhibe la palmitoilación sino también la de-acilación. El rango de la concentración inhibitoria 50 (IC50) para la palmitoilación es entre 10 y 15  $\mu$ M en células de mamífero, pero a concentraciones más altas el 2-BP comienza a tener efecto sobre las enzimas que catalizan la de-acilación, lo cual modificaría la cinética de los ciclos de palmitoilación-depalmitoilación de algunas proteínas (57). Otra característica significativa del 2-BP es que se une de manera irreversible a las proteínas, en el caso de la PATs se une al sitio activo covalentemente bloqueándolo de manera estable (16). Además, si bien inhibe la S-acilación lo hace de una manera inespecífica, afectando a todas o varias PATs de manera simultánea (5).

Debido a los problemas observados con los inhibidores utilizados hasta el momento se han hecho intentos de encontrar inhibidores específicos. En el año

2006, *Ducker et al* publicaron uno de los primeros trabajos en el cual se desarrollaba una búsqueda de inhibidores a gran escala *in vivo*, los autores desarrollaron 3 sistemas, dos de ellos en células de mamíferos y uno en levaduras (58). Los 3 se rigen por principios distintos, dos buscan ver disminución de crecimiento de células (mamíferos y levaduras) y el último evalúa péptidos fluorescentes. Un problema de estos ensayos es que al medir disminución del crecimiento se pueden confundir compuestos tóxicos con inhibidores, además otra complicación es que se desconoce la PAT que modifica estos péptidos, ni siquiera se sabe si efectivamente es una PAT la que actúa sobre ellos (59). En el primer sistema de búsqueda de inhibidores que plantean utilizan células NIH/3T3 y observan que la sobreexpresión de la PAT DHHC17 exacerba el crecimiento de estas células tumorales, mientras que la expresión de un ARN de interferencia (iARN) contra la enzima normaliza ese crecimiento. Los autores plantean la hipótesis que de encontrar un inhibidor de DHHC17, el crecimiento sería similar al de las células con el iARN. Utilizaron 6000 compuestos en el primer testeo con un *hit rate* de 0,9%, lo cual significa que el 0,9% de los compuestos testeados fueron considerados positivos en el ensayo. Para el segundo, en levaduras, también se valen de una diferencia de crecimiento entre cepas a las cuales volvieron dependientes de la palmitoilación. Levaduras que tengan inhibida la palmitoilación no podrán crecer, mientras que aquellas con enzimas funcionales crecen con normalidad. En este testeo utilizaron 8000 compuestos con un *hit rate* de 0,4%. El último ensayo fue en células Jurkat incubadas con un péptido fluorescente que posee una miristoilación, sólo cuando el péptido se palmitoila y se acerca a membranas emite fluorescencia. Con un lector automatizado cuantificaron la fluorescencia y clasificaron como posibles inhibidores aquellos que disminuyeran la fluorescencia a menos del 50%. Este fue el ensayo más grande testeando 16,600 compuestos con un *hit rate* de 0,2%. En total, encontraron 5 grupos de compuestos que mostraban actividad inhibitoria. Cada posible inhibidor de los 5 grupos fue re-testeado *in vitro* y finalmente seleccionaron un compuesto de cada grupo con la mayor actividad inhibitoria *in vitro*. También realizaron pruebas en cultivos celulares de varias líneas donde el compuesto que mejor parecía funcionar fue el que denominaron Compuesto V. Al medir la toxicidad en ratones el compuesto V fue también el más dañino sobre el animal. Los compuestos que se describieron en ese trabajo nunca fueron utilizados en estudios posteriores y en 2009, el grupo de la Dra. Linder puso a prueba 4 de los 5 compuestos encontrados y llegó a la conclusión de que solo el Compuesto V (Figura 4B) presentaba un efecto real inhibitorio *in vivo*. En este mismo estudio describen que la actividad está relacionada con el impedimento de la autopalmitoilación de la enzima, similar a lo que hace el 2-BP, pero con la importante diferencia de que sería reversible (59).

Otro trabajo que se realizó varios años después, en 2016, por el grupo del Dr. Deschenes fue el segundo intento de encontrar inhibidores. En el trabajo

desarrollan un método de búsqueda de inhibidores *in vitro* a partir de una librería de compuestos creados en base a compuestos farmacológicamente muy activos (60). El diseño del método consistía en inhibir la autopalmitoilación de la PAT de levadura Erf2 *in vitro*, la cual es cuantificada midiendo la fluorescencia generada por NADH (la cantidad de NADH formado es igual a la de CoA reducido libre luego de un evento de autopalmitoilación). En el ensayo utilizaron mezclas de muchos compuestos y en distintas rondas de testeo determinaron primero un centro molecular que mostrara actividad inhibitoria, y luego ensayaban grupos de compuestos con distintos sustituyentes en ese núcleo. Obtuvieron 48 compuestos con actividad inhibitoria para la autopalmitoilación, pero sólo profundizaron el análisis de los mejores 10. Finalmente, realizaron ensayos *in vivo*, en levaduras diseñadas para que tengan un crecimiento dependiente de la palmitoilación mediada por Erf2. Determinaron el EC50 y el efecto inhibitorio sólo se observó en 3 de los 10 compuestos (Figura 4B), los otros 7 afectaban de forma similar células control y células dependientes de palmitoilación. Aún en los 3 compuestos que tenían un efecto, el mismo era menor que el del inhibidor general 2-BP. Los compuestos descritos en este trabajo no fueron utilizados en trabajos subsiguientes por el grupo que los describió y tampoco por otros investigadores.

La búsqueda continúa y lo que se ha intentado es tratar de encontrar inhibidores de palmitoilación de proteínas específicas. En 2019 se publicó en la revista Nature Reports un artículo en el cual encuentran un inhibidor para la palmitoilación de la proteína DLK (61). El ensayo se basó en ver cambios en la localización subcelular de la proteína, ya que se vio que la misma está relacionada a su estado de palmitoilación. En el mismo identifican al compuesto Ketoconazol como inhibidor de la palmitoilación de DLK en células HEK293T. Además, prueban el inhibidor en otras proteínas palmitoiladas y si bien ven que no es específico para DLK, ya que afecta la acilación de otras proteínas, tampoco es general como el 2-BP (61). El problema con estos ensayos es que no se sabe con exactitud por qué se inhibe la palmitoilación, cuál es el mecanismo o si está afectando a una o más DHHCs (62). De hecho, en trabajos anteriores del grupo intentan identificar la PAT responsable de la modificación de DLK, pero no lo consiguen por lo cual este inhibidor solo es útil en un contexto específico para esta proteína. Otro ensayo en este sentido buscó inhibidores del transporte del receptor CCR5 que como ya se mencionó, está involucrado en la infección por el VIH (63). El objetivo de este trabajo fue evitar que CCR5 llegue a la membrana plasmática ya que de este modo podría evitarse la infección con el VIH. Colocaron células con el receptor fusionado a GFP con dos colecciones de drogas diferentes y cuantificaron la cantidad de fluorescencia en células fijadas, pero no permeabilizadas. Finalmente detectan 3 compuestos que logran inhibir el transporte de CCR5, de las cuales 2 afectan directamente la palmitoilación del receptor. Los compuestos seleccionados que afectan la acilación son cloruro de



cadmio ( $\text{CdCl}_2$ ) y piritionato de zinc ( $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_2\text{S}_2\text{Zn}$ ), ambas drogas tienen alta toxicidad y no serían alternativas terapéuticas de utilidad.

#### IMPORTANCIA DEL MODELO *S. CEREVISIAE* EN EL ESTUDIO DE LA S-ACILACIÓN

*Saccharomyces cerevisiae* es un organismo modelo ampliamente utilizado en investigación básica debido a sus múltiples ventajas. Al ser unicelular eucariota no patógeno, es de fácil manejo y de relativo bajo costo de mantención. Es particularmente sencillo el trabajo genético en esta levadura ya que es fácil insertar o quitar genes de interés debido a su gran eficiencia para llevar a cabo recombinaciones homólogas. Además, se pueden insertar plásmidos de expresión sin ninguna dificultad. El genoma de *S. cerevisiae* se encuentra secuenciado en su totalidad, lo cual ha permitido crear herramientas de gran importancia como colecciones de deleción, que son grandes librerías de cepas en las cuales cada una contiene un gen no esencial eliminado de su genoma, o librerías de fusión a la proteína fluorescente verde (GFP), donde cada gen está fusionado a GFP en una cepa diferente.

Se ha demostrado que muchos procesos descritos en levaduras están ampliamente conservados en organismos eucariotas superiores, de hecho, en 2016, 2013, 2009 y 2001 se otorgaron premios Nobel a grupos que utilizan este organismo modelo. Esta conservación es importante porque permite que se puedan estudiar en este organismo muchos procesos de eucariotas superiores.

Particularmente en nuestro campo de estudio, la levadura fue el organismo en el que primero se describieron las S-aciltransferasas. En el año 2002, dos laboratorios diferentes llegan a describir las primeras PATs de levaduras Akr1 y el complejo Erf2-Erf4 (64,65).

Como ya se mencionó, los primeros intentos de conseguir inhibidores para las PATs fueron realizados en levaduras (58,60). La facilidad en el manejo de las levaduras y la gran batería de herramientas tanto teóricas como prácticas que existen las convierten en un buen modelo para realizar rastreos de compuestos a gran escala (66).

OBJETIVOS

Desde que se describieron las primeras PATs en 2002 hasta el momento se ha avanzado en su caracterización tanto estructural como funcional. Nuestro laboratorio ha tenido un rol activo en esa caracterización, identificando el motivo conservado denominado PaCCT, caracterizando las diferentes especificidades de las PATs de levadura y aportando en profundizar el conocimiento del motivo DHHC, siendo los primeros en proponer una posible estructura. A pesar del crecimiento del campo hasta el momento no existen inhibidores específicos de las S-aciltransferasas.

En este contexto, el principal objetivo de esta tesis ha sido el desarrollo de métodos de búsqueda de inhibidores de palmitoiltransferasas. Una vez desarrollados los métodos el siguiente objetivo fue poner a punto las condiciones de trabajo óptimas para iniciar la búsqueda de inhibidores.

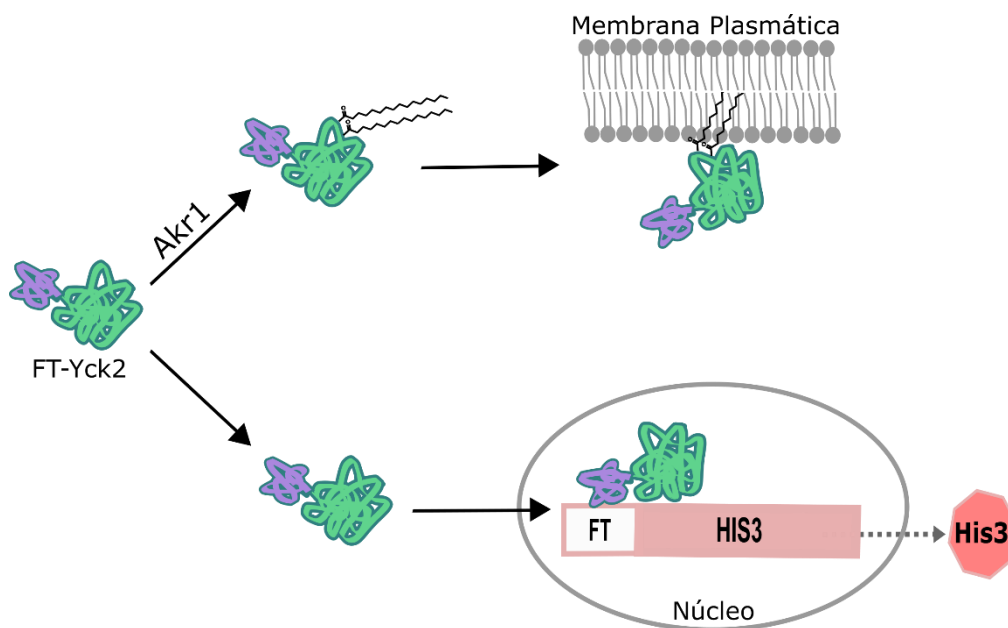
Los objetivos específicos de este trabajo de tesis fueron:

- Diseñar dos métodos de búsqueda de inhibidores de palmitoiltransferasas. Uno para buscar péptidos inhibidores y otro para buscar drogas inhibitorias. La principal estrategia utilizada consistió en modificar genéticamente las levaduras para que su crecimiento este supeditado a la falta de función de una PAT de interés, y de este modo tener un método de selección positiva de las levaduras con la PAT inhibida.
- Poner a punto los métodos para buscar inhibidores de la PAT Akr1. Esta PAT endógena naturalmente modifica al constructo FT-Yck2 cuya falta de palmitoilación permite el crecimiento de la cepa.
- Adaptar los métodos para ser utilizados en PATs de mayor interés biológico, como DHHC20, DHHC21 o gl\_6733 del parásito *G. lamblia*.
- Utilizar los métodos elaborados para realizar los ensayos de búsqueda e identificar candidatos con posible actividad inhibitoria.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El primer objetivo a la hora de diseñar una estrategia para la búsqueda de inhibidores era poder distinguir entre aquellas levaduras que tuvieran un sistema de palmitoilación funcional de aquellas que lo tuvieran deficiente. Para esto se diseñó una cepa que puede vivir cuando la palmitoilación llevada a cabo por una de sus PATs está inhibida, pero que muere si el sistema de S-acilación funciona con normalidad. Esto permite tener un método de selección positiva, donde las levaduras que viven tendrían la actividad de esa PAT deficiente o nula, este tipo de ensayos tiene la ventaja añadida de que elimina todo potencial inhibidor con un efecto tóxico o letal disminuyendo los posibles falsos positivos (66).

Para lograr este objetivo se diseñó un método en el cual se fusiona un sustrato de una PAT a un factor de transcripción, el cual al ingresar al núcleo permite la expresión del gen HIS3, lo cual confiere a la levadura la capacidad de crecer en medio sin histidina. Si la quimera del sustrato con el factor de transcripción se encuentra palmitoilado se anclará a la membrana plasmática impidiendo su ingreso al núcleo y la posterior expresión del gen HIS3 (Figura 5). Es decir, si el sustrato no se encuentra palmitoilado la levadura podrá crecer en medio sin histidina, pero si la palmitoilación ocurre ya no habrá crecimiento en este medio.



**Figura 5. Diagrama del método de selección positiva.** Esquema de cambio de localización de Yck2 de acuerdo con su estado de palmitoilación y como eso se relaciona a la expresión de His3. En medio sin histidina sólo crecerá la levadura si expresa HIS3.

Para poder elaborar el método descrito se comenzó a trabajar a partir de dos cepas de levaduras que poseen el gen HIS3 bajo el control del operador LexA.

Las dos cepas son genéticamente iguales entre si con la única diferencia de que en una fue deletado el gen que codifica para la PAT Akr1 (NDY1953) mientras que en la otra no (NDY1949) (gentileza del Dr. Nicholas G. Davis). Esta PAT fue una de las primeras en ser identificada y es una de las 7 enzimas de la familia que se encuentran en la levadura *S. cerevisiae* (64). Esta PAT se ha visto relacionada con la morfología de las levaduras, el proceso de gemación y en el proceso de endocitosis y se cree que esto está relacionado con su actividad sobre el sustrato caseína quinasa tipo I (Yck2) (67–69).

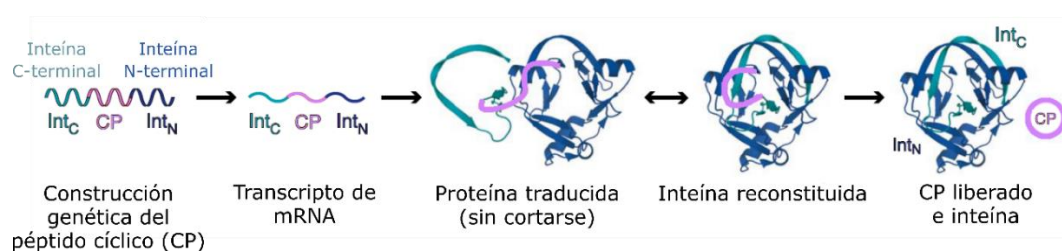
Se ha comprobado que Yck2 depende de la palmitoilación de Akr1 para su correcta localización en la membrana plasmática (64,68), por lo cual es un buen sustrato para iniciar la puesta a punto del método. La fusión de Yck2 al factor de transcripción LexA-VP16 (FT), permitiría que el gen HIS3 solo se exprese cuando Yck2 no se encuentre palmitoilada y por ende pueda ingresar al núcleo (Figura 5).

Estas herramientas constituyen la base del trabajo para la generación de nuestro método de búsqueda de inhibidores. En el desarrollo de esta tesis se trabajó con el par PAT-Sustrato Akr1-Yck2, pero también con distintas PATs heterólogas de diferentes organismos. Además, este método cuenta con la particularidad de que eventualmente podría ser adaptado a otros pares PAT-Sustrato, de organismos más complejos, pero trabajando con las ventajas del modelo de levaduras.

## INTRODUCCIÓN

El primer tipo de inhibidores que fue de interés para la realización de este trabajo fueron los péptidos cíclicos. Los péptidos en general se cree que pueden ser buenos inhibidores ya que podrían generarse asociaciones entre los aminoácidos de las proteínas y los péptidos que disrumpan la actividad de la enzima. Los péptidos cíclicos tienen la ventaja de haber mostrado mayor afinidad por sus blancos que sus contrapartes lineales, de ser menos propensos a la degradación por exoproteasas y además, son atractivos como base para desarrollos farmacológicos posteriores (70).

Para llevar adelante la búsqueda a gran escala de péptidos cíclicos inhibitorios se utilizó una colección de plásmidos que codifican para péptidos cíclicos elaborada por el laboratorio de la Dra. Susan Lindquist (71). Los péptidos que pueden sintetizarse a partir de la misma son de 8 aminoácidos compuestos por una cisteína seguida por 7 residuos aleatorios. La estrategia utilizada en la elaboración de la colección se denomina SICLOPPS (del inglés split-intein-mediated circular ligation of proteins and peptides) y consiste en un péptido flanqueado por una C-inteína y una N-inteína que al reconstituirse liberan el péptido ciclado (Figura 6) (70,72). Particularmente la colección cedida por la Dra. Lindquist posee una variabilidad total de 32 millones de péptidos independientes que se expresan y procesan correctamente (71). La principal ventaja de trabajar con estos péptidos cíclicos es la variabilidad de péptidos que se pueden testear de manera rápida y que son sintetizados dentro de la célula.

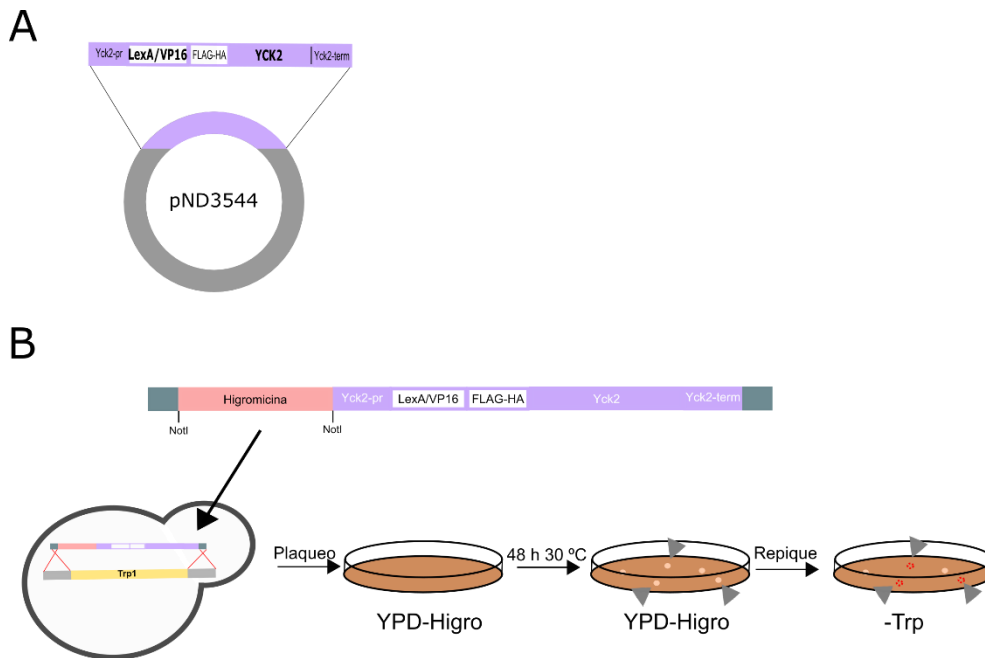


**Figura 6. Diagrama del sistema SICLOPPS.** Esquema de funcionamiento del sistema SICLOPPS de formación de péptidos cíclicos. Imagen modificada de Kritzer et al 2009.

## CREACIÓN DE CEPAS PARA LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES DE AKR1

El primer objetivo al empezar a trabajar con las cepas de origen NDY1949 y NDY1953 para adaptarlas al método fue insertar al genoma de las mismas el FT fusionado a Yck2. Esto fue necesario ya que el marcador de selección del

plásmido que contiene la quimera FT-Yck2, pND3544, y el de los plásmidos con los péptidos cíclicos era el mismo, el gen URA3 que complementa la auxotrofia de uracilo. Además, la inserción al genoma hace que la expresión sea constante y evita cambios en los niveles de expresión por pérdida de los plásmidos (73,74).

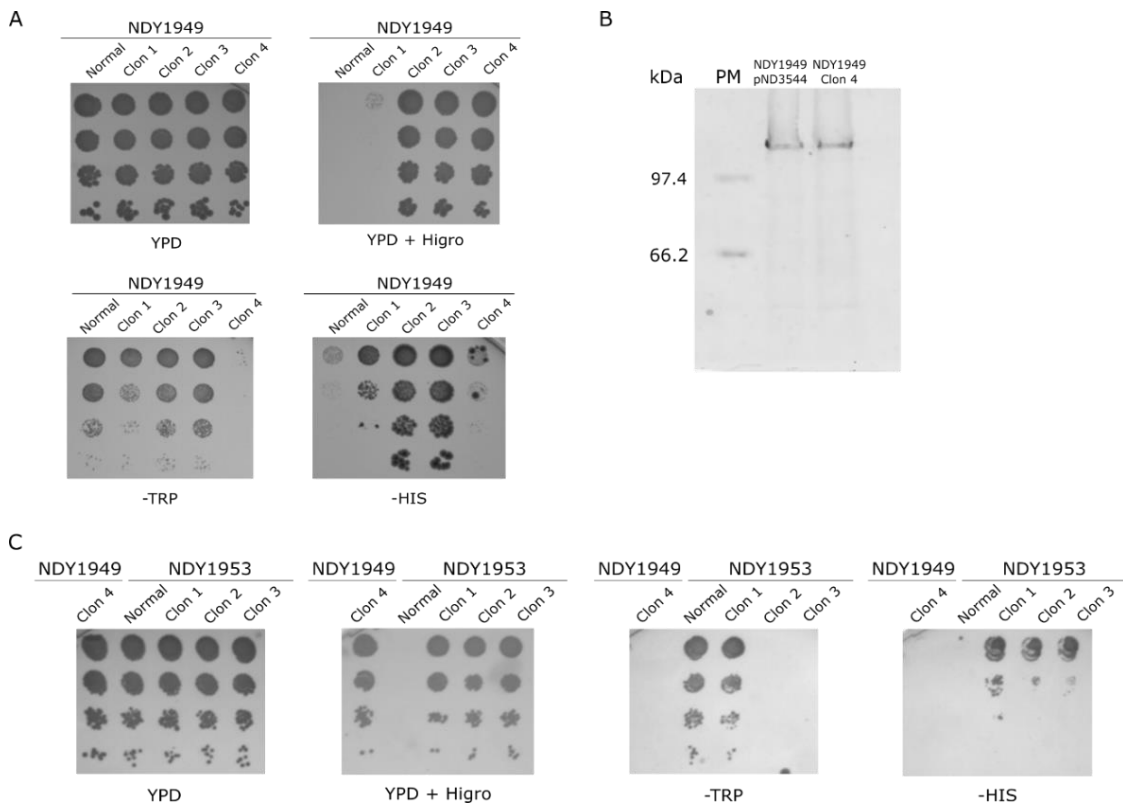


**Figura 7. Esquema del proceso de elaboración de la cepa.** A. Esquema del plásmido pND3544. B. Esquema de la inserción al genoma y del proceso de selección de clones positivos. Las colonias positivas para la inserción se señalan con flechas grises.

El vector de origen pND3544 (gentileza del Dr. Nicholas G. Davis) posee el promotor endógeno de Yck2, el factor de transcripción LexA/VP16, dos etiquetas de marcación, HA y FLAG y finalmente el gen de Yck2 con su terminador endógeno (Figura 7A). Para poder insertarlo al genoma se necesitó asociar el casete de interés a algún marcador de selección. Se eligió trabajar con el gen de resistencia a higromicina, el cual se obtuvo del plásmido pFA6-hphNT1 (75). Por clonado con enzimas de restricción se colocó el gen antes del promotor endógeno de Yck2 utilizando un sitio *NotI*, a este vector lo llamamos Higro-pND3544. Luego, mediante PCR se amplificó en un mismo fragmento de ADN el gen de higromicina fusionado al casete del FT-Yck2. En los oligonucleótidos utilizados para realizar la PCR (*Trp1-S1Knop\_Fw* y *oRv Yck2term-Trp1*) se añadieron secuencias de ADN idénticas a las que flanquean el gen TRP1. De este modo, al transformar el fragmento lineal de PCR en las levaduras, las mismas por recombinación homóloga intercambiarán el gen TRP1 por nuestro casete Higromicina-FT-Yck2. Las levaduras que hayan insertado el casete correctamente deberán ser resistentes a higromicina y no podrán crecer en medio sin triptófano (Figura 7B).



El proceso de inserción se realizó en las dos cepas de interés, con y sin la PAT Akr1. Se inició realizando la transformación en la cepa NDY1949 y se seleccionó por medio de ensayos de crecimiento aquellas levaduras que mostraban resistencia a higromicina, pero que no podían crecer en medio sin triptófano. Además, como esta cepa posee la PAT Akr1 era esperable que no creciera en medio sin histidina, ya que el casete FT-Yck2 debería estar palmitoilado. El clon 4 fue el que mostró los fenotipos deseados y se seleccionó para futuros ensayos (Figura 8A). Para evaluar que el nivel de expresión del casete en el genoma comparado con la expresión que se obtiene desde el plásmido, se realizó un ensayo de Western blot que revelamos con anticuerpos contra la etiqueta de la hemaglutinina del virus de la influenza humana (HA). Los niveles de expresión fueron similares (Figura 8B).



**Figura 8. Selección de las cepas dependientes de palmitoilación para el ensayo de búsqueda de inhibidores.** A. Test de crecimiento de la cepa NDY1949 sin transformar (Normal) y de la cepa luego de insertar el casete de expresión FT-Yck2 (clon1-4) en distintos medios de cultivo para seleccionar las que cumplen con el fenotipo deseado. YPD: Medio completo, YPD+Higro: Medio completo con higromicina 200µg/ml, -TRP: Medio mínimo sin triptófano, -HIS: Medio mínimo sin histidina. B. Western blot de la cepa original NDY1949 transformada con el plásmido pND3544 (segundo carril) y de la cepa seleccionada en A, NDY1949-Clon4. Se reveló utilizando un anticuerpo contra HA. C. Test de crecimiento de la cepa NDY1953 sin transformar (Normal) y de la cepa luego de insertar el casete de expresión FT-Yck2 (clon1-3) en distintos medios de cultivo para seleccionar las que cumplen con el fenotipo deseado. Se incluye como control la cepa seleccionada en A.

En la siguiente etapa se realizó la transformación y selección de la cepa que no posee Akr1, NDY1953, de la misma forma que para la cepa NDY1949, pero con la diferencia de que al no tener la PAT estas levaduras deberían poder crecer en medio sin histidina. Seleccionamos los clones 2 y 3 para futuros ensayos (Figura 8C). Las cepas modificadas seleccionadas en estos ensayos serán denominadas JVY99 (NDY1949 clon4) y JVY100 (NDY1953 clon3) para mayor comodidad y para diferenciarlas de forma efectiva de las cepas originales.

Con estas cepas se constituye un método útil para buscar inhibidores de Akr1. Transformando la cepa JVY99 con la colección de péptidos cíclicos y colocando las transformantes en medio sin histidina se esperaría que aquellas colonias con Akr1 inhibida sean las únicas que puedan crecer. De esta forma, la selección positiva de colonias sin actividad de Akr1 disminuirá los falsos positivos. La cepa JVY100 podrá servir como control de crecimiento y además es la base para poder adaptar el método a PATs heterólogas con mayor interés para la salud humana.

---

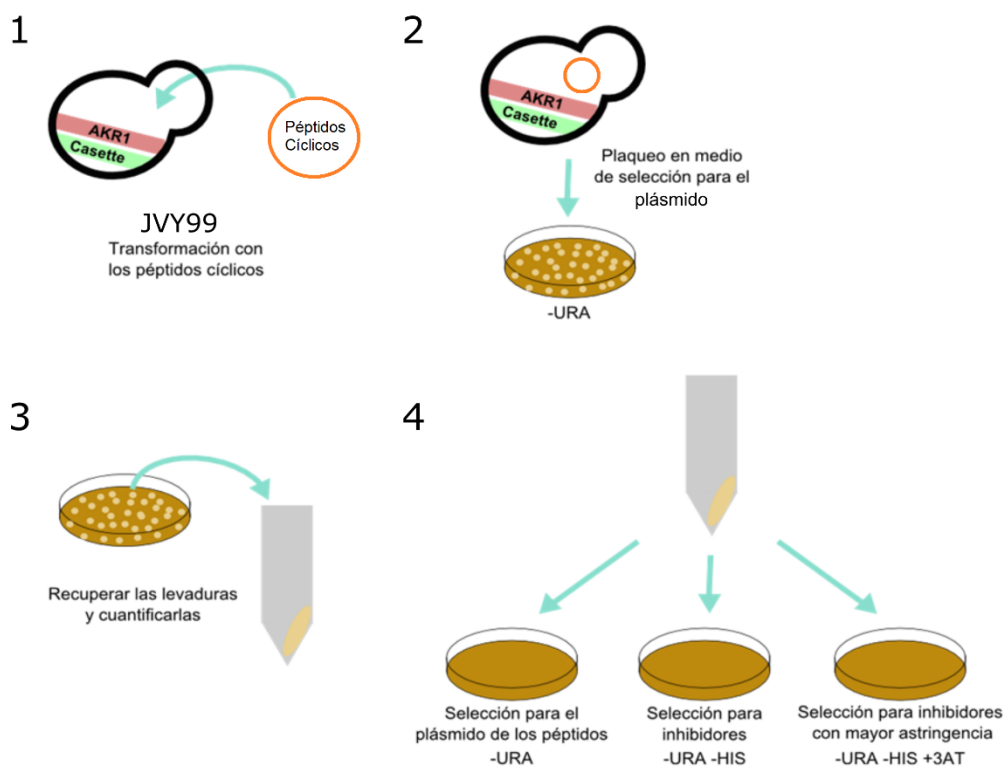
#### BÚSQUEDA DE INHIBIDORES DE AKR1

Para comenzar con la búsqueda de los inhibidores de la PAT endógena Akr1 se transformaron las levaduras de la cepa JVY99 con los plásmidos de la librería que codifican para los péptidos y se evaluó si podían crecer en el medio de selección sin histidina.

Se diseñó un protocolo en dos pasos, el primero consistió en transformar la cepa JVY99 con los plásmidos de los péptidos cíclicos y seleccionar las colonias de levaduras transformadas utilizando el marcador de selección de los plásmidos. Esto permite que todas las levaduras que tienen un plásmido puedan seleccionarse y además les permite expresar y procesar el péptido sin la presión de selección. Se recolectaron las colonias que en efecto contenían plásmido y posteriormente se llevaron a los medios de selección de los inhibidores, es decir medio sin histidina y medio sin histidina suplementado con 3-amino-1,2,4-triazol (3AT) (Figura 9). El 3AT es un inhibidor competitivo del producto del gen HIS3. Mientras más 3AT ingrese a la levadura se necesitará mayor expresión de HIS3 para que la cepa pueda crecer en medio sin histidina (76). El objetivo de agregar 3AT en diferentes concentraciones es disminuir el crecimiento inespecífico en caso de que exista.

Por este método se evaluaron 4,25 millones de transformantes que luego fueron colocadas en placas sin histidina ni uracilo y con 5, 10 y 30 mM 3AT o sin 3AT. Para realizar este traspaso de medio se recuperaron las colonias desde las placas y se colocaron en una solución de glicerol 20% donde se pueden conservar las levaduras vivas a -80 °C. Se cuantificaron las levaduras obtenidas y se plaquearon 20 millones en cada placa de selección, esperando que sólo

aquellas que tengan la actividad PAT inhibida puedan crecer en el medio sin histidina (con o sin 3AT). Las colonias obtenidas en las placas de selección se repicaron nuevamente en placas del mismo medio para asegurar que efectivamente poseen la capacidad de crecer en el medio. Una vez que se comprobó que las colonias poseen la capacidad de crecimiento en el medio de selección, el siguiente paso para descartar falsos positivos es chequear que el efecto observado se debe al plásmido y no a algún cambio en el genoma de la levadura.

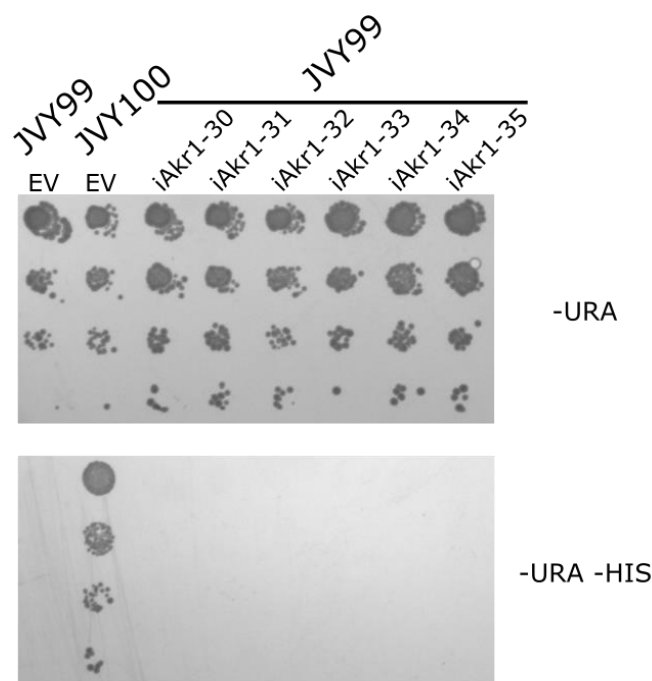


**Figura 9. Selección de péptidos cíclicos inhibidores de Ak1.**

Se purificaron los plásmidos que poseían las cepas que crecieron en el medio de selección. Si la capacidad de crecimiento en el medio de selección se debe al efecto del plásmido y no a una modificación genética en la levadura, al retransformar la cepa JY99 con el plásmido purificado se debería reproducir el crecimiento.

En esta etapa se encontró la mayor cantidad de problemas, ya que el crecimiento de las colonias no se reproducía luego de las transformaciones con los plásmidos recuperados. De las 4,25 millones de transformantes originales obtuvimos 35 péptidos (nombrados iAkr1-1 al iAkr1-35) re-purificados pero ninguno sostuvo el fenotipo de crecimiento luego de la re-transformación en la cepa original JY99.

Si algún péptido inhibiera la actividad de Akr1 se esperaría que la cepa transformada con ese plásmido pudiera crecer, al menos parcialmente, en el medio sin histidina (-URA -HIS). En la Figura 10 se observa un ensayo de crecimiento de las levaduras re-transformadas a modo de ejemplo.



**Figura 10. Prueba de crecimiento de la cepa re-transformada con los péptidos.** Prueba de crecimiento en distintos medios de la cepa del JYV99 luego de ser re-transformada con los péptidos seleccionados en el ensayo a gran escala o con vector vacío (EV). Se incluye la cepa JYV100 transformada con vector vacío (EV) como control.

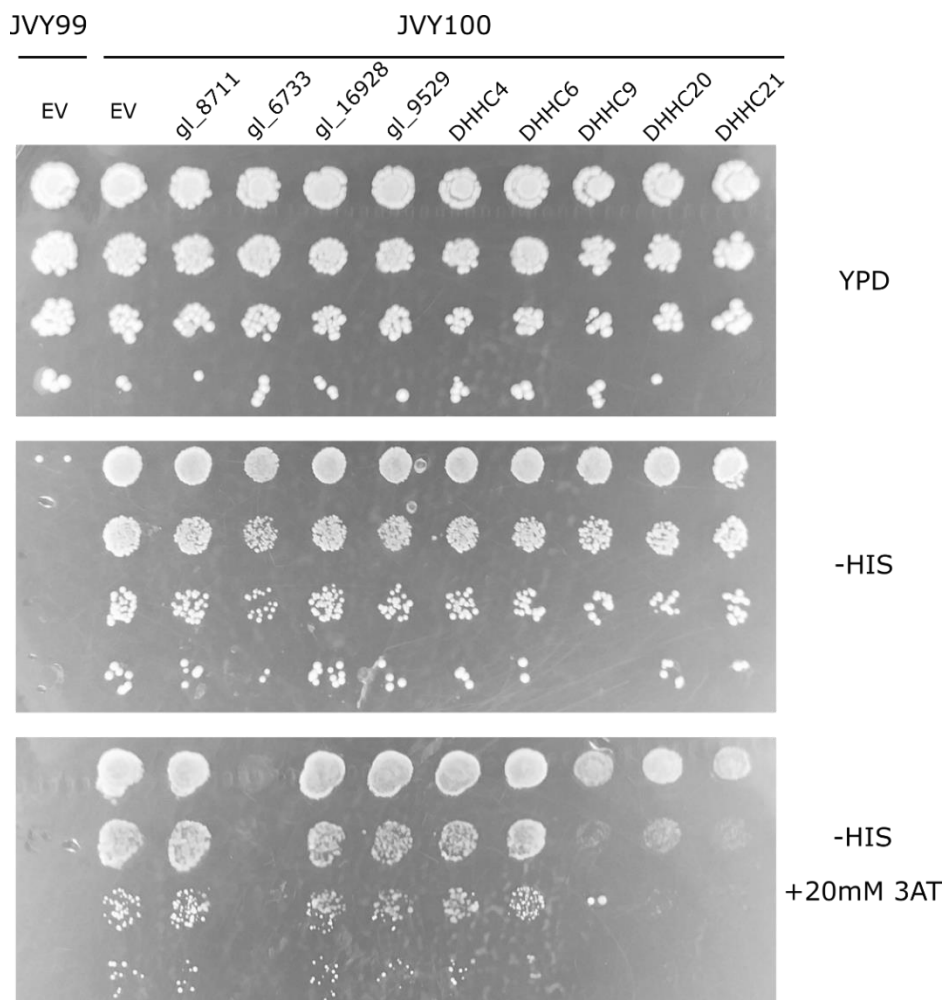
Hasta el momento no se logró obtener candidatos a ser péptidos inhibidores para la PAT endógena Akr1.

#### MÉTODO DE BÚSQUEDA DE INHIBIDORES PARA PATS HETEROLOGAS

La PAT endógena Akr1 no presenta interés terapéutico, pero posee la ventaja de que su función puede ser complementada por otras DHHC tanto de levaduras como de humanos y otras especies. Se ha visto que cepas que no poseen Akr1 son termosensibles, no pueden crecer con normalidad a 37° C, y si bien no está completamente comprendido el porqué de este fenotipo se conoce que múltiples PATs son capaces de revertirlo (Anexo II) (77). Teniendo esto en cuenta se seleccionaron PATs heterólogas con mayor interés terapéutico y se buscó adaptar el método de búsqueda para encontrarles inhibidores.

Se decidió trabajar con la cepa JVY100 que carece de Akr1 y por lo tanto la proteína de fusión FT-Yck2 no está palmitoilada. Esta cepa permite ver si alguna PAT heteróloga puede complementar la falta de Akr1 y acilar a FT-Yck2. Si alguna palmitoilara la proteína de fusión podríamos utilizar la cepa transformada con la PAT de interés para buscar inhibidores.

Las PATs seleccionadas para probar en nuestro ensayo provienen de mamíferos y del parásito de interés en salud humana, *G. lamblia*. Particularmente, trabajamos con las PATs de *G. lamblia* gl\_8711, gl\_6733, gl\_16938, gl\_9529, las PATs humanas DHHC4, DHHC6 y DHHC20 y las PATs de ratón DHHC9 y DHHC21. Transformando la cepa que no posee la PAT endógena Akr1 (JVY100) con las S-aciltransferasas heterólogas seleccionadas se puede evaluar si alguna de ellas palmitoila el FT-Yck2, ya que se esperaría que no crezcan en medio sin histidina.



**Figura 11. Adaptación del ensayo a PATs heterólogas.** Ensayo de crecimiento de las cepas JY99 transformada con vector vacío (EV) y JY100 transformada con vector vacío (EV) y con las PATs de *G. lamblia* gl\_8711, gl\_6733, gl\_16938, gl\_9529, las PATs humanas DHHC4, DHHC6 y DHHC20 y las PATs de ratón DHHC9 y DHHC21. El ensayo

se realizó en medio completo (YPD), medio mínimo sin histidina (-HIS) y medio mínimo sin histidina suplementado con 20 mM 3AT (-HIS+20 mM 3AT).

Como se puede observar en la Figura 11 (panel intermedio) al transformar la cepa JVY100 con las PAT heterólogas no se observa una disminución de la capacidad de crecimiento en medio sin histidina (-HIS) como si se puede observar para la cepa control JVY99. Esto indicaría que FT-Yck2 no se está palmitoilando o no se palmitoila en su totalidad, por lo que una fracción de la quimera está ingresando al núcleo y permitiendo la expresión del gen HIS3. Una de las formas de salvar este problema es mediante el agregado de la droga 3AT. Se suplementó el medio sin histidina con 20 mM 3AT y se observó que para varias PATs había una disminución significativa del crecimiento. Particularmente, la PAT de *G. lamblia* gl\_6733, las PATs de ratón DHHC9 y DHHC21 y la PAT humana DHHC20 ven afectado su crecimiento. La PAT gl\_6733 se comporta de manera similar a la cepa control JVY99, mientras que las PATs de mamíferos tienen un crecimiento afectado, pero no nulo (Figura 11 panel inferior).

En estas condiciones, el método podría funcionar para la búsqueda de inhibidores de las PATs heterólogas gl\_6733, DHHC9, DHHC20 y DHHC21 ya que en todos los casos se observa una disminución del crecimiento en el medio de selección, lo que sería suficiente para separar levaduras con la PAT de interés inhibida respecto de las que tienen PATs funcionales. Las cepas con la PAT inhibida deberían crecer en el medio con 3AT de forma similar a JVY100 transformada con vector vacío.

Con el avance en la búsqueda de péptidos cíclicos inhibidores se presentó el problema de que las PATs con las que trabajamos tienen el mismo marcador de selección que los plásmidos que expresan los péptidos. Se decidió crear plásmidos con un nuevo marcador de selección que es compatible con nuestras cepas y que no es común en plásmidos de levaduras.

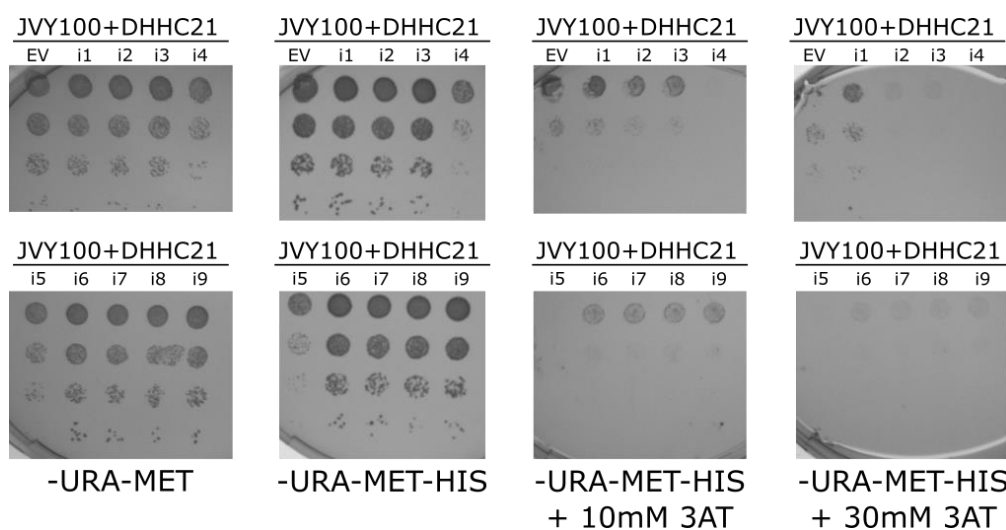
En general, para los marcadores de selección en levaduras se utilizan auxotrofías, así en una levadura que no puede generar uracilo porque tiene mutada o delecionada una enzima de la vía de síntesis del mismo se inserta un plásmido que posee el gen faltante, del mismo organismo o de un organismo similar. De este modo al colocar las levaduras en medio, por ejemplo, sin uracilo sólo podrán crecer aquellas que tienen inserto el plásmido que les permita completar la vía de síntesis del uracilo. Los marcadores más comunes en levadura son URA3, que es el que se repetía en los vectores, LEU2, HIS3, TRP1 y ADE2. Ninguno de estos marcadores estaba disponible para ser utilizado en las cepas del método de búsqueda de inhibidores, por lo cual se construyeron vectores nuevos modificando por recombinación homologa los vectores existentes e intercambiando el gen URA3 por el gen MET15 de la vía de síntesis de la metionina. A partir de ADN genómico purificado de levadura se realizó una PCR para amplificar el gen MET15, utilizando oligonucleótidos (*PJV29-Met15F* y *PJV29-Met15R*) a los cuales se les añadió en los extremos fragmentos de ADN

idénticos a los que flanquean el gen URA3 en los vectores YEplac195. Los plásmidos de partida se digirieron para linealizarlos. Al transformar las levaduras con los dos fragmentos lineales (PCR más plásmido digerido) la levadura recombina los fragmentos de ADN con secuencias homologas y forma un nuevo plásmido que contiene el nuevo marcador. Para seleccionar los plásmidos reconstituidos se colocan las levaduras en medio sin metionina y sólo crecerán las colonias que realizaron la recombinación y poseen el vector de interés. Posteriormente se purifica el plásmido de la levadura y se amplifica en bacterias. Este proceso se realizó para un vector vacío, utilizado como control, y para los vectores que expresan las PATs de interés.

Por su importancia en procesos de cáncer de mama y de disfunción endotelial ante la respuesta inflamatoria sistémica se decidió iniciar una búsqueda de inhibidores de la PAT DHHC21 (43,78).

Se realizó el mismo protocolo que para Akr1 con la diferencia de que el medio de selección para la transformación con los péptidos fue medio sin uracilo ni metionina (-URA-MET), y el medio de selección de inhibidores fue medio sin uracilo, metionina, ni histidina (-URA-MET-HIS) con cantidades variables de 3AT (5 mM 3AT o 30 mM 3AT) o sin 3AT.

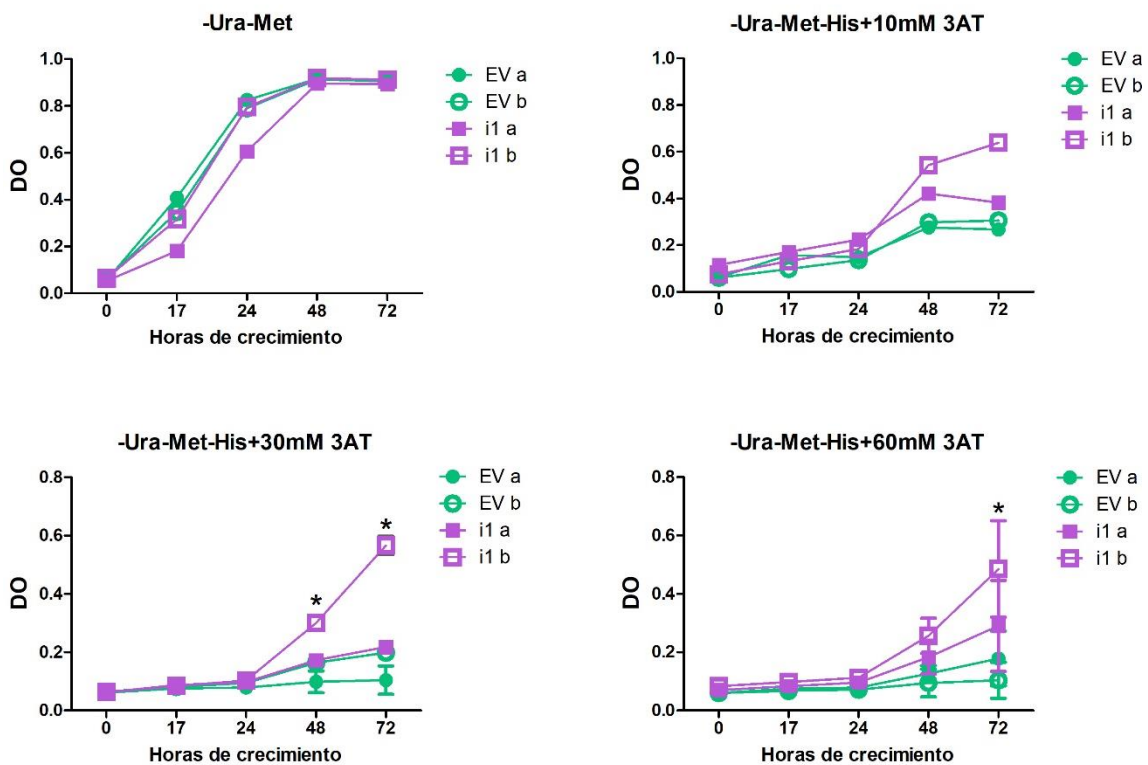
Luego de la transformación con los plásmidos de los péptidos cíclicos se obtuvieron 2 millones de transformantes. Se recuperaron las colonias de las transformantes y se sembraron en las placas de selección, sólo se obtuvieron colonias únicas en la placa con 30 mM 3AT, lo cual indica que en este ensayo es crucial elevar la cantidad de 3AT. De este primer ensayo sólo 16 colonias crecieron en el medio de selección y sostuvieron su fenotipo luego de que se repicaron en el mismo medio.



**Figura 12. Prueba de crecimiento de la cepa JY100 transformada con DHHC21 y re-transformada con los péptidos.** Prueba de crecimiento en distintos medios de la cepa

del JVY100 transformada con DHHC21 luego de ser re-transformada con los péptidos seleccionados en el ensayo a gran escala (i1-9) o con vector vacío (EV).

Se realizó la purificación de los plásmidos de los péptidos de la misma forma que para Akr1, pero se debió añadir una instancia de control debido a que la levadura posee dos plásmidos que pueden ser purificados. De los 16 péptidos iniciales se lograron recuperar 9 y se re-transformaron en la cepa JVY100 para evaluar si sostenían el fenotipo. Como se observa en la Figura 12, solo el péptido denominado iDHHC21-1 (“i1”) conservó la capacidad de crecer en medio sin histidina con alta concentración de 3AT. El resto de los péptidos no sostuvieron el fenotipo de crecimiento, e incluso a altas concentraciones de 3AT parecen afectar a la levadura ya que crece en menor medida que la transformada con vector vacío.



**Figura 13. Curvas de crecimiento con el péptido iDHHC21-1.** Curvas de crecimiento de la cepa JVY100 transformada con DHHC21 y el péptido iDHHC21-1 (se utilizaron dos transformantes diferentes i1 a, curva violeta con cuadros rellenos, e i1 b curvas violetas con cuadrados sin relleno) o vector vacío (también se utilizaron dos transformantes diferentes EV a, curva verde con círculos rellenos, y EV b, curva verde con círculos sin relleno). En los paneles inferiores se muestran los valores de la media de densidad óptica con su desviación estándar. El asterisco indica un p-valor < 0,001 comparando i1b con los controles de EV.



El péptido iDHC21-1 ("i1") conserva el fenotipo de crecimiento en el medio de selección sin histidina (-URA-MET-HIS) suplementado con 3AT, pero siempre parece crecer de manera similar al vector vacío. Para ver si lo que se observaba era una inhibición leve se decidió hacer una curva de crecimiento en medio líquido para seguir más de cerca el crecimiento en el tiempo. Se utilizaron 2 clones diferentes de nuestra cepa JY100 transformada con vector vacío y dos clones de la cepa transformada con el plásmido del péptido i1.

El crecimiento de la cepa en medio sin selección para los inhibidores (-URA-MET) es similar sin importar si está transformada con vector vacío o con el péptido. En medio sin histidina con 30 o 60 mM 3AT vemos una diferencia de crecimiento estadísticamente significativa a 72 h, donde el péptido le confiere a la cepa mayor capacidad de crecimiento. El clon i1b muestra una diferencia de crecimiento con los 2 controles con un  $p < 0,001$ , mientras que el clon i1a tiene una diferencia menos marcada (Figura 13). Estos resultados posicionan al péptido i1 como un buen candidato para futuros estudios.

Durante el desarrollo de esta tesis se logró crear cepas útiles para la búsqueda de péptidos cíclicos inhibidores y se trabajó en establecer un protocolo apropiado para realizar esa búsqueda. El método se puede utilizar para buscar inhibidores de la PAT endógena de levaduras Akr1 y con pequeñas adaptaciones se puede utilizar para PATs heterólogas. Además, cuenta con la ventaja de ser de selección positiva, lo que facilita la selección de posibles inhibidores disminuyendo los falsos positivos.

Para Akr1 no se pudo identificar ningún péptido capaz de disminuir o anular la actividad de la enzima. Se analizaron 4,25 millones de transformantes, lo cual representaría un 13% de la cantidad de plásmidos diferentes de la colección. Si tenemos en cuenta que existen varias copias de cada plásmido podemos afirmar que el porcentaje efectivamente analizado de la colección es menor que ese 13%. De continuar la búsqueda quizá podría encontrarse algún péptido inhibidor. Lo más dificultoso de este ensayo es la purificación de los plásmidos. Sería ideal para poder continuar la búsqueda, encontrar una manera más rápida y económica de recuperar los péptidos de las levaduras para poder re-transformar y ver si el fenotipo de crecimiento en el medio de selección se debe efectivamente al efecto del péptido.

Una posible causa para la aparición de falsos positivos puede ser la generación de mutaciones supresoras, es decir cuando el fenotipo generado por la mutación en un gen es revertido por la mutación en otro gen. Las transformaciones en levaduras suelen ser eventos mutagénicos que pueden causar variaciones en el genoma (79). Si alguna de estas mutaciones afecta el sistema de expresión tal y como fue diseñado ya sea evitando el anclaje a membrana, disminuyendo la expresión de la PAT o aumentando la expresión de la quimera FT-Yck2, del gen HIS3 o activando vías alternativas de síntesis de histidina generaría falsos positivos. Esto podría ser una de las causas por las cuales se obtiene un mayor crecimiento inespecífico del esperado inicialmente y podría explicar por qué perdemos el fenotipo de crecimiento en medio sin histidina al re transformar el péptido en la cepa original que no ha mutado.

Si bien no se pudo encontrar candidatos a inhibidores durante la búsqueda, se encontró un péptido que induce a las levaduras a flocular de manera reproducible (Anexo I), lo cual es un indicio de que los péptidos se están procesando y que generan fenotipos en nuestras levaduras. Por otro lado, el hallazgo es interesante ya que este fenómeno podría tener un interés biotecnológico y valdría la pena continuar indagando en los efectos que tiene ese péptido.

Por último, se pudo adaptar el método a PATs heterólogas. Se logró demostrar el potencial para utilizarlo en una PAT de *G. lambia*, gl\_6733 y para tres PATs de mamíferos, DHHC9, 20 y 21 (Figura 11). Se avanzó en hacer un primer intento

de búsqueda de inhibidores para DHHC21, se analizaron 2 millones de transformantes.

El método para PATs heterólogas también es funcional, pero tiene la complicación adicional de que la levadura se encuentra transformada con dos plásmidos (el de la PAT y el de los péptidos cíclicos), lo cual dificulta aún más la recuperación del plásmido del péptido para su re-transformación. A futuro, sería importante insertar la PAT de interés al genoma de la levadura, eliminando uno de los plásmidos, o buscar una nueva forma de purificación e identificación del plásmido más rápida y económica.

A pesar de los inconvenientes descritos pudimos encontrar un posible péptido cíclico inhibidor. Resta realizar ensayos para confirmar si efectivamente el péptido posee un efecto inhibitorio, pero sin dudas es un candidato interesante para continuar investigando. Particularmente es llamativo que al tener dos transformantes diferentes "i1 a" e "i1 b" las mismas presenten comportamientos diferentes. Esto podría tener relación con el hecho de que la expresión desde plásmidos no es constante y las levaduras pueden contener distinto número de plásmidos en su interior, lo que conlleva a niveles de expresión diferentes lo cual modificaría el efecto inhibitorio del péptido. Una posibilidad es que la transformante denominada "i1 b" esté expresando el péptido en mayores niveles que la transformante "i1 a". Otra posibilidad es que la expresión que varía entre transformantes sea la de DHHC21, y que haya menor cantidad de la PAT en "i1 b". Algunas posibles soluciones son la integración de la PAT al genoma o enviar a sintetizar del péptido para su posterior agregado desde el exterior, ambas cosas disminuirían la variabilidad generada por la expresión desde plásmidos.

Es importante destacar que nuevamente nos encontramos muy por debajo de la cantidad de transformantes que serían ideales para probar todos los péptidos de la colección. De proseguir la búsqueda se podrían encontrar nuevos candidatos a ser péptidos inhibidores.

---

## INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se describió un ensayo de búsqueda de inhibidores con péptidos cíclicos que es funcional, pero que tiene complicaciones que lo tornan lento y costoso. Esto impulsó a pensar el desarrollo de un método para testear drogas inhibidoras. Para conseguirlo se debieron crear nuevas cepas, más permeables, ya que la mayoría de las drogas no ingresan a la levadura en su estado salvaje. Además, se debió realizar adaptaciones para llevar el método, que hasta ahora se manejó en placas de Petri, a crecimiento líquido que es lo más sencillo para ensayar drogas. Otra ventaja del uso de drogas inhibitorias es que al ingresar desde el exterior celular no se requiere transformar las levaduras, lo que disminuye significativamente las posibilidades de encontrar mutaciones supresoras, uno de los potenciales problemas que se identificaron en el ensayo anterior.

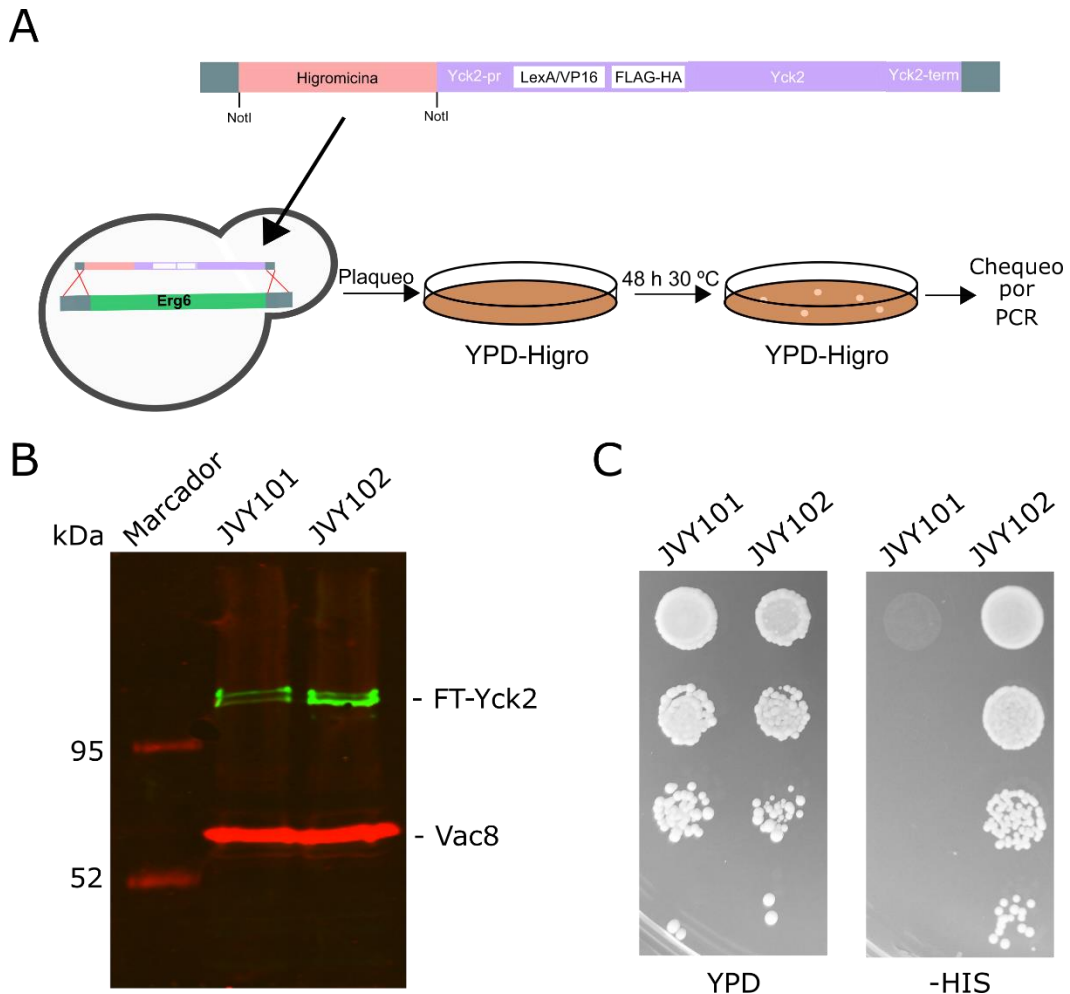
---

## CREACIÓN DE CEPAS PARA LA BÚSQUEDA DE INHIBIDORES DE AKR1

Para adaptar las cepas a la búsqueda de drogas inhibitorias se delecionó el gen *ERG6*, que participa en la vía de síntesis del ergosterol. La falta de este gen genera un aumento de permeabilidad a drogas y además disminuye la eficiencia de una de las bombas utilizadas en la resistencia a drogas, *Pdr5* (80,81). Como la delección de *ERG6* no es compatible con la falta de *TRP1* debido a que en cepas  $\Delta$ *erg6* el importador de triptófano *Tat2* no es completamente funcional decidimos trabajar sobre las cepas originales (NDY1949 y NDY1953) que no poseían en el genoma la quimera *FT-Yck2* (82).

En conjunto con la Farm. M. Luz Giolito, se realizó la delección del gen *ERG6* dirigiendo la inserción del casete que codifica para la quimera *FT-Yck2* a este locus, lo cual es una diferencia respecto a las cepas *JVY99* y *100* cuya inserción se hizo en el gen *TRP1*. Se utilizaron oligonucleótidos con secuencias adyacentes a las del gen *ERG6* (*Erg6-KO-Higro-Fw* y *Erg6-KO-Higro-rev*), el esquema se encuentra en la Figura 14A. Para comprobar la inserción al genoma del casete *FT-Yck2* realizamos un chequeo por PCR y posteriormente se purificaron proteínas totales de ambas cepas para realizar un ensayo de Western blot. En la Figura 14B se observa en verde la expresión del casete *FT-Yck2* y en rojo, como control, la proteína endógena *Vac8*. Por último, se realizaron ensayos para evaluar el fenotipo de crecimiento en medio completo (YPD) y en medio sin histidina (-HIS) donde se ve el fenotipo de interés para la selección de inhibidores. Las cepas seleccionadas para futuros ensayos se denominaron

JVY101 (basada en la NDY1949, *Akr1* wt) y JVY102 (basada en la NDY1953,  $\Delta$ *akr1*) (Figura 14C).



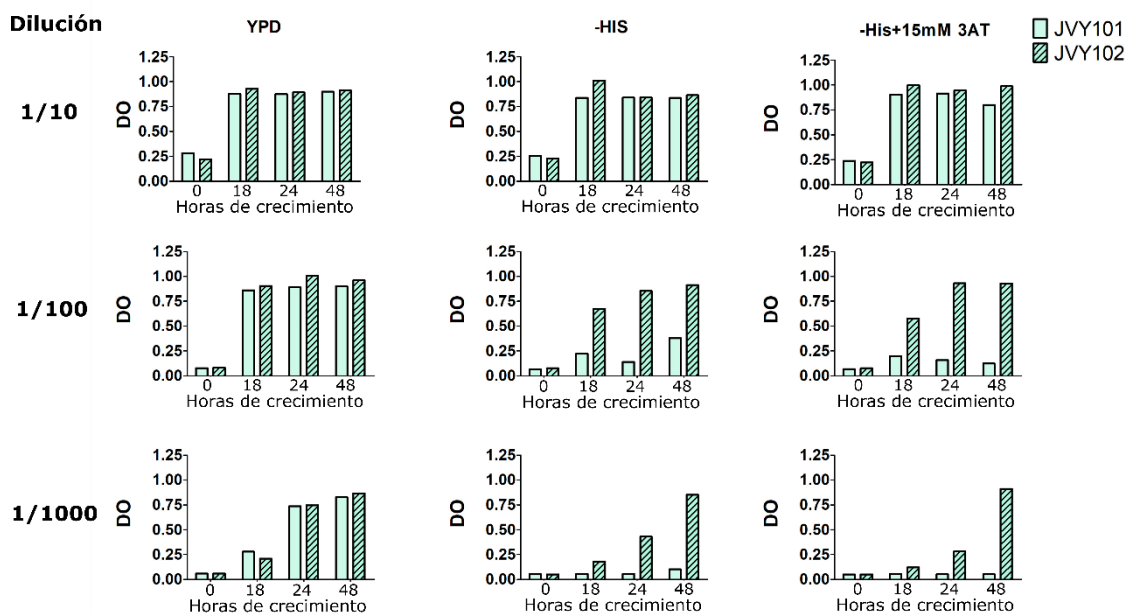
**Figura 14. Proceso de elaboración de las cepas JVY101 y JVY102.** A. Esquema de la inserción al genoma y del proceso de selección de clones positivos. B. Los niveles de expresión del casete FT-Yck2 en las cepas JVY101 y JVY102 fueron analizados mediante el ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo anti-HA. Vac8 se utilizó como control de carga. C. Ensayo de crecimiento donde se observa el crecimiento en medio completo (YPD) y la diferencia de crecimiento en el medio de selección sin histidina (-HIS) entre la cepa que posee la PAT (JVY101) y la que no la posee (JVY102).

Con estas cepas se logró obtener un método útil para buscar inhibidores de *Akr1*. Trabajando con la cepa JVY101 y colocando las levaduras en medio sin histidina suplementado con las drogas de interés solo aquellas con *Akr1* inhibida deberían crecer en ese medio. De esta forma, se espera que la selección positiva de levaduras sin actividad de *Akr1* disminuya los falsos positivos. La cepa JVY100 sirve como control de crecimiento y además es la base para poder adaptar el método a PATs heterólogas.

## ADAPTACIÓN AL CRECIMIENTO EN MEDIO LIQUIDO

El método de búsqueda fue testeado inicialmente en medio sólido, que es una manera óptima de ver diferencias de crecimiento entre cepas, pero no es útil para hacer un rastreo de compuestos a gran escala. Teniendo en cuenta que el objetivo final es testear la mayor cantidad de drogas posible, lo ideal era llevar el método a medio líquido y más puntualmente a un método de crecimiento en multiwells. Esta forma de crecimiento permite crecer al mismo tiempo levaduras en diferentes medios y con diferentes drogas.

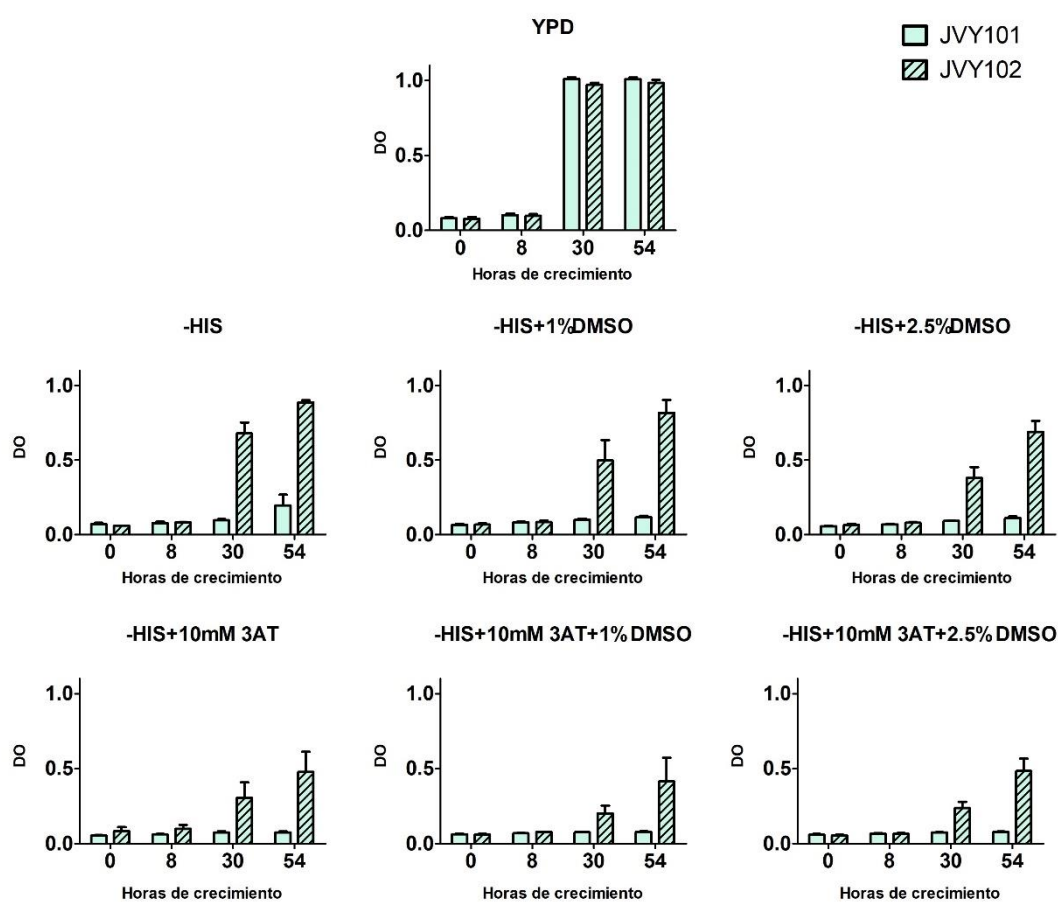
El primer objetivo fue encontrar un conjunto de medio y dilución de levaduras que permitiera reproducir la diferencia de crecimiento que se observó en medio sólido entre la cepa de búsqueda (JVY101) y la cepa control (JVY102) pero en el medio líquido. A partir de un cultivo saturado de levaduras, de densidad óptica (DO) aproximada 5 DO/ml, se probaron 4 diluciones de células y 7 medios selectivos diferentes para intentar encontrar las condiciones de máxima diferenciación de crecimiento entre las cepas desarrolladas para el método de búsqueda. En la Figura 15 se observa el crecimiento en medio completo (YPD), medio sin histidina (-HIS) y medio sin histidina suplementado con 3AT (-HIS+ 15 mM 3AT), el resto de las condiciones probadas pueden verse en Materiales y métodos.



**Figura 15. Selección de condiciones para crecimiento en medio líquido.** Gráficos de crecimiento de las cepas de interés, JVY101 (barras lisas) y JVY102 (barras rayadas), en distintos medios (YPD, primera columna; -HIS, segunda columna; -HIS+15 mM 3AT, tercera columna) para distintas diluciones de células. Las diluciones fueron hechas a partir de un cultivo saturado de levaduras. El crecimiento fue medido como densidad óptica (DO) a distintos tiempos.

Tras analizar los datos obtenidos, se observó que el medio sin histidina y el medio sin histidina suplementado con 3AT permiten, a una dilución de 1/1000, diferenciar bien el crecimiento de las cepas a todos los tiempos evaluados. Además, el análisis de los medios con 2-BP (Materiales y métodos) permitió concluir que en estas condiciones no se puede visualizar el efecto inhibitorio de esta droga, ya que fue tóxica y dificultó mucho el crecimiento de las cepas en general.

Los compuestos de la colección de drogas que se utilizaron en esta tesis se encuentran disueltos en el solvente orgánico DMSO, por lo que el siguiente paso fue evaluar como el DMSO afectaba el crecimiento de las levaduras.

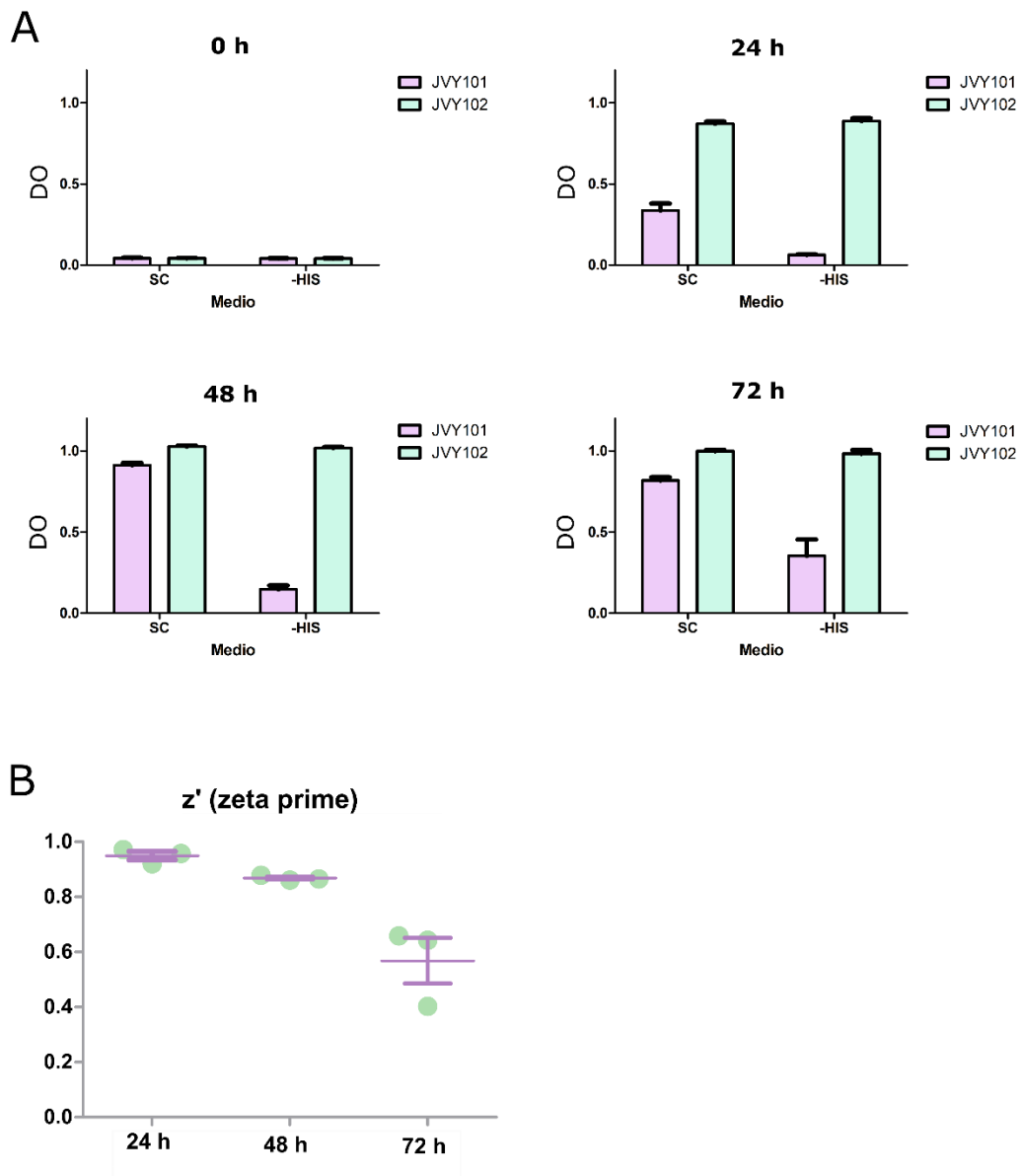


**Figura 16. Efecto del DMSO en el crecimiento.** Gráficos de crecimiento de las cepas de interés, JVY101 (barras lisas) y JVY102 (barras rayadas), en distintos medios (YPD; -HIS y -HIS+10 mM 3AT) con distintos porcentajes de DMSO. El crecimiento fue medido como densidad óptica (DO) a distintos tiempos.

Como se observa en la Figura 16, el DMSO en las concentraciones utilizadas aun permite que las levaduras crezcan en ambos medios (sin histidina con o sin

agregado de 3AT) manteniendo la diferencia de crecimiento entre la cepa de búsqueda y la cepa control.

Teniendo en cuenta los resultados mostrados anteriormente se eligió como medio de trabajo para los futuros ensayos el medio sin histidina, ya que el 3AT no mejora las diferencias de crecimiento para este ensayo en particular. Además, se decidió utilizar como punto de partida, cultivos de levadura a una concentración de 0,005 DO/ml lo que es aproximadamente una dilución 1/1000 de un cultivo saturado.



**Figura 17. Test de crecimiento de las cepas JVY101 y JVY102 en cápsulas multiwell de 96.** A. Gráficos de la media de crecimiento de 16 wells con las cepas de interés, JVY101 (barras lilas) y JVY102 (barras verdes), en medio mínimo completo (SC) o medio sin histidina (-HIS) a distintos tiempos. El crecimiento fue medido como densidad óptica (DO) a distintos tiempos. Las barras de error indican la desviación estándar. B. Gráfico que muestra el valor de Z' a los distintos tiempos del ensayo 24, 48 y 72 h. Se muestran los



valores para 3 ensayos independientes (puntos verdes) junto con la media y la desviación estándar (líneas violetas).

Para tener una comprensión más profunda del comportamiento de las cepas de trabajo en un contexto similar al del ensayo se decidió evaluar la reproducibilidad del crecimiento en el multiwell en las condiciones seleccionadas para el trabajo. En la Figura 17 se observa el crecimiento de las levaduras en placas multiwells a una concentración de 0,005 DO/ml, en medio sin histidina o medio mínimo completo (SC). El crecimiento es medido como densidad óptica (DO) a las 0, 24, 48 y 72 h.

Se puede ver que el crecimiento es muy reproducible, la desviación estándar es mínima a todos los tiempos, y la diferencia de crecimiento entre las cepas es marcada aun pasadas 72 h desde el inicio del ensayo. Esto indicaba que el método podía ser utilizado para ensayos de búsqueda a gran escala, y por ello decidimos calcular el parámetro  $Z'$  (Figura 17). Este parámetro brinda un indicador estadístico de la calidad de cualquier ensayo de búsqueda a gran escala, utilizando los valores de la media de los controles positivos y negativos como así también de sus desviaciones estándares. Si el  $Z'$  es bajo, cercano a cero, indica que el ensayo aún no está optimizado, mientras que valores de  $Z'$  mayores a 0.5 son valorados como ensayos funcionales (83). Este método posee un  $Z'$  promedio de 3 ensayos diferentes independientes de  $0,95 \pm 0,02$  para las mediciones a 24 h,  $0,86 \pm 0,01$  para mediciones a 48 h y  $0,6 \pm 0,1$  para mediciones a 72 h. Esto indica que el ensayo es robusto a todos los tiempos.

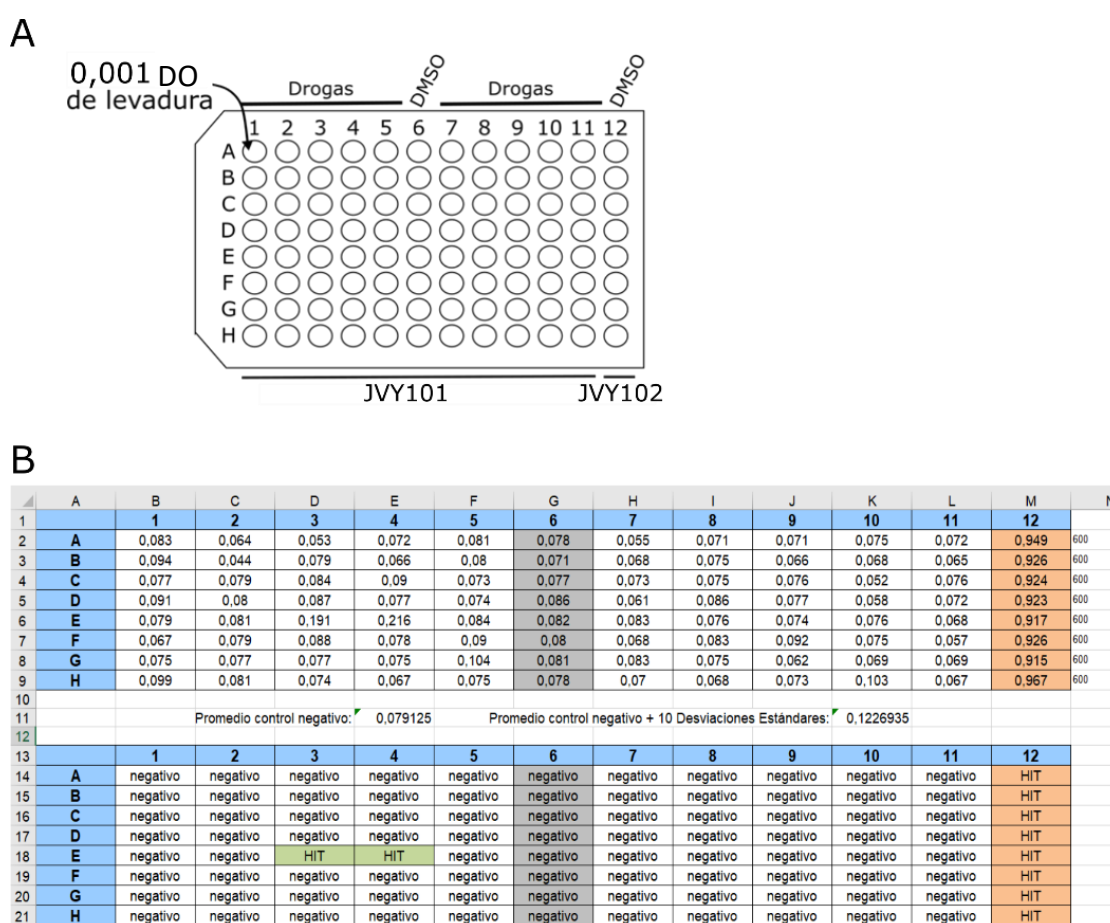
---

#### BÚSQUEDA DE INHIBIDORES – PRIMERA ETAPA

Habiendo establecido que el ensayo funciona de manera óptima en el medio mínimo sin histidina y colocando 0,001 DO de levadura en un volumen de 200  $\mu$ l en cada pocillo decidimos avanzar con la búsqueda efectiva de drogas inhibitoras. Durante el desarrollo de la tesis se trabajó con un extracto de 10mil compuestos de la librería 3D Biodiversity de ChemDiv. Las drogas que componen esta librería fueron seleccionadas por ser biológicamente activas, por tener bajo peso molecular, lipofilicidad óptima y solubilidad optima ([www.chemdiv.com/3d-biodiversity-library](http://www.chemdiv.com/3d-biodiversity-library)).

En una primera etapa se evaluaron 800 compuestos. Para esto se prepararon diez placas como muestra la Figura 18A. Cada pocillo contiene una droga diferente a una concentración final de 10  $\mu$ M, a excepción de los pocillos de las columnas 6 y 12 que contienen los controles JVY101 y JVY102 respectivamente con 2  $\mu$ l de DMSO cada uno (mismo volumen que se agregó al añadir las drogas). Las 10 placas se mantuvieron sin agitación a 30 °C por 72 h y se realizaron lecturas de absorbancia a los tiempos 0, 24, 48 y 72 horas. Para cada lectura se registró una tabla como la que se muestra a modo de ejemplo en la Figura 18B. Posteriormente, se realizó un análisis para ver si las lecturas de

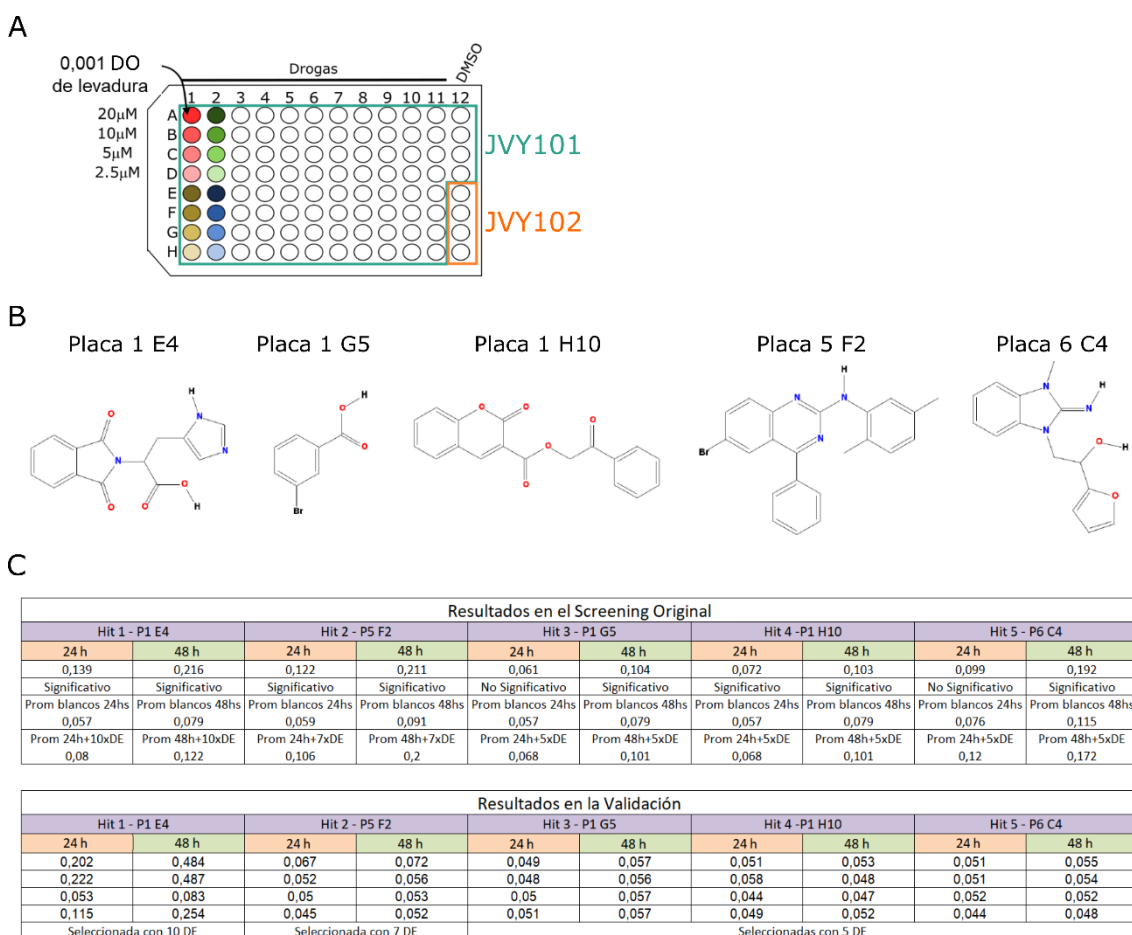
absorbancia que obteníamos para cada droga podían considerarse o no como provenientes de un posible inhibidor. El criterio que se estableció fue considerar como positivos aquellos pocillos que superaran por 10, 7, 5 o 4 desviaciones estándares el valor de la media de los controles negativos, en la Figura 18B se muestra un ejemplo del análisis. Se definieron varios umbrales porque no había claridad en cuanto a que clase de comportamiento esperar de aquellas levaduras que tuvieran parcialmente inhibida la PAT Akr1 y era importante no perder un posible inhibidor poco potente. Durante esta primera etapa de testeos se seleccionaron 22 compuestos que luego fueron re-testeados para ver si sostenían su comportamiento.



**Figura 18. Ensayo de búsqueda de inhibidores.** A. Esquema de la organización de las placas utilizadas en el ensayo a gran escala de búsqueda de inhibidores. B. Tabla de resultados modelo. El panel superior muestra las absorbancias obtenidas. El panel inferior muestra los pocillos que contienen posibles inhibidores, nombrados como “HIT”. Se consideran “HIT” en este ejemplo los compuestos en pocillos que han crecido por encima de la media de los controles negativos (Columna 6) más 10 desviaciones estándares.

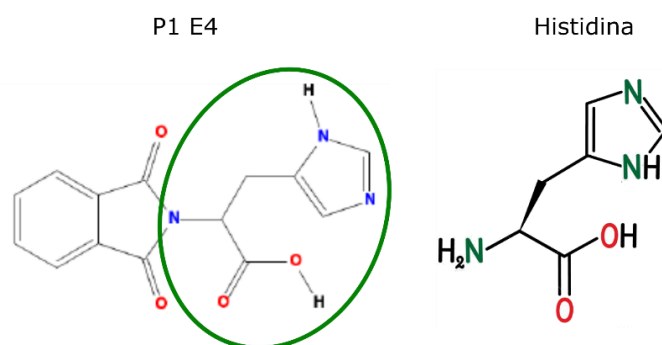
Para realizar la validación del resultado se prepararon placas multiwell colocando en el cultivo de levaduras diluciones seriadas de los 22 compuestos preseleccionados (Figura 19A). Luego de la lectura de la densidad óptica se seleccionaron 5 compuestos que repetían el fenotipo de crecimiento. En la Figura 19B se observa la estructura de los compuestos seleccionados y en la Figura 19C los resultados obtenidos para esas drogas en el ensayo original y en la validación.

El compuesto P1E4 tuvo el mejor comportamiento dosis-respuesta y parecería el más interesante para profundizar. Se descubrió que se trata de N-Phthaloyl-DL-Histidine y que dentro de la estructura del compuesto está incluida la estructura de la histidina (Figura 20), sugiriendo que el compuesto no inhibía la PAT, sino que de alguna manera estaba suplementando el nutriente faltante a la levadura y permitiendo así su crecimiento.



**Figura 19. Validación de compuestos de la primera etapa.** A. Esquema de la placa utilizada para llevar a cabo las validaciones. A la izquierda se muestran las concentraciones de los compuestos. A la derecha se muestra la distribución de las cepas de levaduras. B. Estructura de las 5 drogas seleccionadas luego de la validación. C. El panel superior muestra un resumen del crecimiento de la cepa incubada con las drogas de interés durante el ensayo de búsqueda. El panel inferior muestra la tabla de resultados del crecimiento de la cepa del ensayo con las 5 drogas seleccionadas en las concentraciones que se muestran en A en el mismo orden.

Si bien se descartó este compuesto como posible inhibidor, se decidió continuar utilizándolo en futuros ensayos como un control de crecimiento de la cepa del ensayo y también como control de la correcta administración de las drogas.



**Figura 20. Compuesto P1E4.** Esquema del compuesto P1E4 y de la histidina. En el círculo verde se indica la parte de P1E4 que se corresponde con la estructura de la histidina.

#### BÚSQUEDA DE INHIBIDORES – SEGUNTA ETAPA

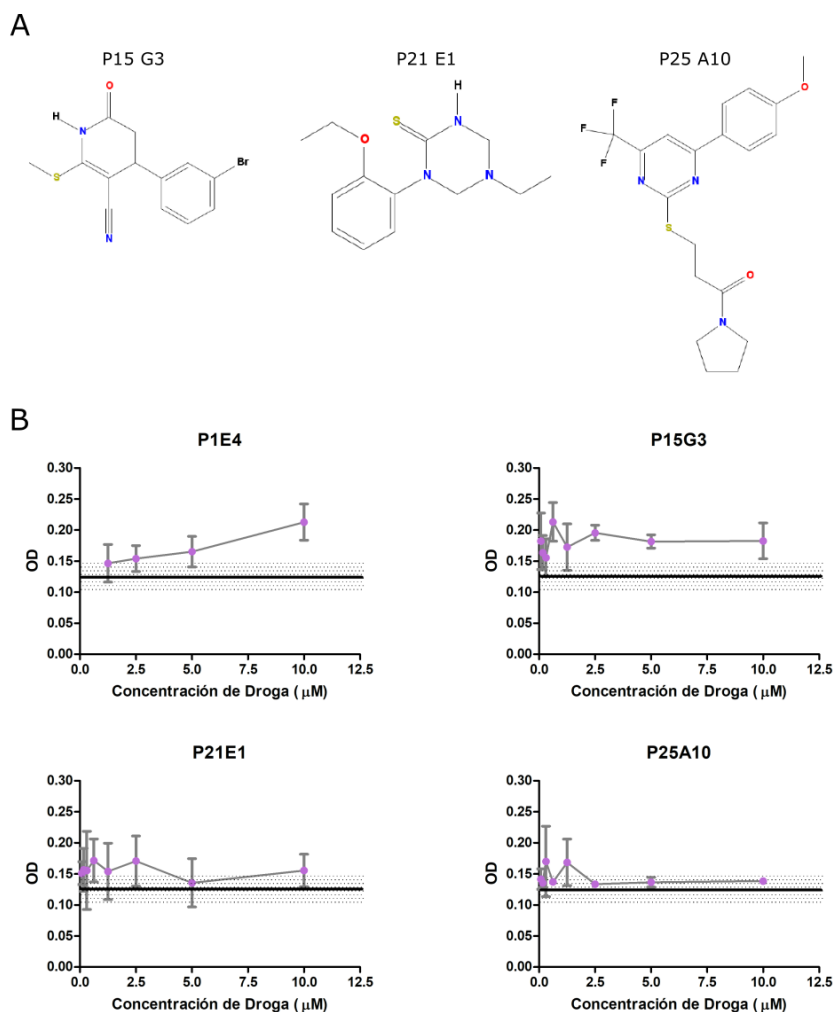
Se repitió el mismo procedimiento de búsqueda a gran escala que se describió en la primera etapa 3 veces más, por lo cual se logró estudiar 3200 de los 10.000 compuestos disponibles en la librería.

Al igual que las drogas seleccionadas en la etapa anterior llevamos los 22 compuestos de la Tabla 2 a una validación del mismo formato que la ilustrada en la Figura 19A.

**Tabla 2. Resultados de la búsqueda para los compuestos preseleccionados.**

Hit			OD 24	Prom +10DE x placa 24 h	Prom +5DE x placa 24 h	OD 48	Prom +10DE x placa 48 h	Prom +5DE x placa 48 h	OD 72	Prom +10DE x placa 72 h	Prom +5DE x placa 72 h
Placa	Letra	Número									
15	G	3	0,068	0,095	0,075	0,125	0,156	0,113	0,357	0,360	0,235
19	A	1	0,225	0,089	0,073	0,236	0,146	0,111	0,431	0,235	0,172
19	B	1	0,184			0,128			0,122		
21	E	1	0,065	0,079	0,070	0,099	0,139	0,114	0,218	0,223	0,184
21	E	11	0,082			0,126			0,22		
21	F	7	0,061			0,136			0,878		
24	A	1	0,148	0,111	0,089	0,198	0,235	0,173	0,335	0,423	0,321
24	H	8	0,065			0,513			0,873		
24	H	9	0,102			0,166			0,32		
25	A	9	0,071	0,120	0,097	0,299	0,250	0,193	0,822	0,509	0,407
25	A	10	0,071			0,524			0,88		
26	G	4	0,058	0,118	0,090	0,297	0,140	0,109	0,942	0,231	0,170
27	A	10	0,053	0,075	0,066	0,225	0,117	0,096	0,77	0,133	0,113
27	A	11	0,129			1,052			0,941		
28	C	8	0,081	0,085	0,072	0,107	0,105	0,092	0,151	0,171	0,138
29	D	1	0,352	0,088	0,075	0,422	0,124	0,101	0,387	0,214	0,166
29	D	3	0,06			0,113			0,115		
30	B	8	0,063	0,160	0,114	0,271	0,354	0,228	0,91	0,434	0,291
32	D	10	0,066	0,062	0,055	0,084	0,078	0,069	0,09	0,135	0,107
34	A	2	0,066	0,059	0,053	0,083	0,068	0,060	0,084	0,088	0,075
35	B	5	0,063	0,064	0,056	0,084	0,080	0,069	0,087	0,165	0,120
35	B	8	0,161			0,15			0,191		

Tomando en cuenta lo obtenido en el ensayo a gran escala y una primera validación idéntica a la realizada en la etapa anterior, se decidió seleccionar algunos compuestos para una valoración más detallada de su comportamiento. Se realizaron validaciones con una mayor amplitud de concentraciones de droga: 10, 5, 2.5, 1.25, 0.62, 0.31, 0.16 y 0.08  $\mu\text{M}$ . Se seleccionaron 3 compuestos P15G3, P21E1 y P25A10 como los más interesantes (Figura 21A). En la Figura 21B se observa el crecimiento de la cepa JYV101 en presencia de los compuestos seleccionados medidos como absorbancia (600 nm) a 48 h con diferentes concentraciones de drogas, se incluye además el compuesto P1E4 a modo de control. El compuesto P15G3 es el que muestra el crecimiento más consistente, superando los registros de absorbancia de la cepa de estudio con DMSO en la mayoría de las concentraciones testeadas. Además, muestra un pico interesante a concentraciones bajas de droga donde se aleja más del control. Los compuestos P21E1 y P25A10 parecen tener un crecimiento menos significativo, pero antes de descartarlos se decidió testear todos los compuestos en un contexto normal de crecimiento para cepas de levadura en laboratorio.

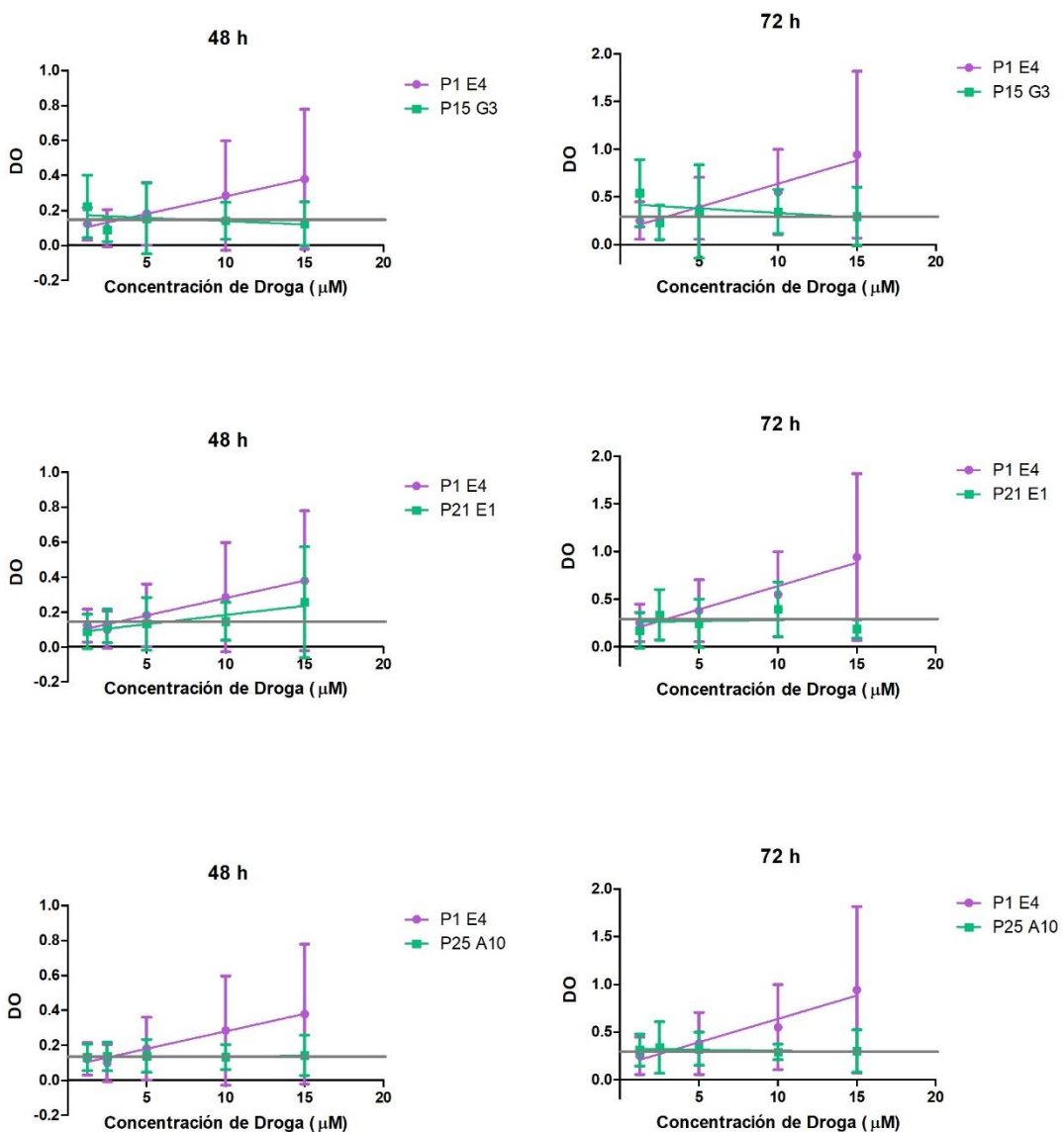


**Figura 21. Validaciones para los compuestos P15G3, P21E1 y P25A10.** A. Estructura de los compuestos P15G3, P21E1 y P25A10. B. Resultados de los crecimientos de la cepa JYV101 incubada con las drogas seleccionadas por 48 h a las concentraciones de droga

indicadas, en placas multiwell. El crecimiento se expresa en densidad óptica (600 nm), las barras grises indican la desviación estándar de dos experimentos independientes. La línea negra indica la media del crecimiento de la cepa JVY101 incubada con DMSO y la zona punteada demarca su desviación estándar.

## SEGUNDA VALIDACIÓN DE CANDIDATOS

Con los compuestos seleccionados hasta aquí, se pasó a una nueva etapa de validaciones. Se crecieron cultivos de la cepa de búsqueda en tubos de medio ensayo, con agitación, a 30 °C, con diferentes concentraciones de las drogas o con DMSO como control.



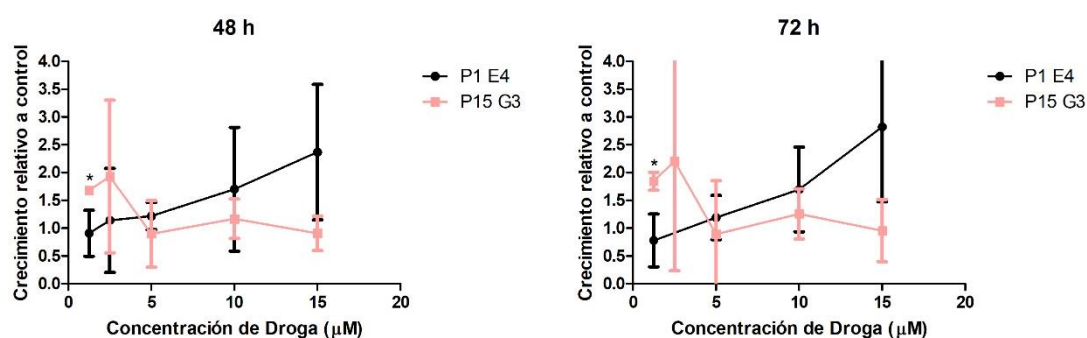
**Figura 22. Crecimiento de la cepa JVY101 con las drogas P15G3, P21E1 y P25A10.** Crecimiento de la cepa de interés JVY101, medida como densidad óptica (DO) al ser incubada con las drogas preseleccionadas en distintas concentraciones a 48 h (paneles izquierdos) y a 72 h (paneles derechos). En todos los casos se utiliza como control



P1 E4. La línea gris indica la media del crecimiento de la cepa JVY101 incubada con DMSO.

En las curvas de crecimiento con los compuestos P21E1 y P25A10 continúa sin observarse un efecto significativo de las drogas ya que no hay una diferencia de crecimiento que sea estadísticamente significativa respecto del control con DMSO en ninguna de las concentraciones utilizadas. Por otro lado, la curva con el compuesto P15G3 resulta interesante porque continúa mostrando un aumento en el crecimiento de la cepa a concentraciones bajas de droga (Figura 22). Si bien este aumento no es sustancial, es consistente con lo observado en las validaciones en placa donde también se observa un pico a concentraciones bajas.

Se decidió graficar el crecimiento de la cepa JVY101 incubada con los compuestos P15G3 y P1E4 relativo al crecimiento de la misma con DMSO para minimizar los errores que se pudieran cometer al hacer el inóculo de levaduras.



**Figura 23. Curva de crecimiento relativo al control.** Crecimiento relativo de la cepa de interés JVY101, al ser incubada con la droga P15G3 y la droga control P1E4, en distintas concentraciones, a 48 h (paneles izquierdos) y a 72 h (paneles derechos). En todos los casos se calcula el crecimiento relativo como densidad óptica con la droga indicada dividida por la densidad óptica de la cepa con DMSO. El asterisco indica un p-valor < 0,05 para los compuestos a esa concentración.

Se puede ver que el crecimiento relativo con la droga P15G3 a una concentración de 1,25 μM es significativamente diferente al crecimiento con la droga control (P1E4) y es aproximadamente el doble que el crecimiento de la cepa JVY101 con DMSO.

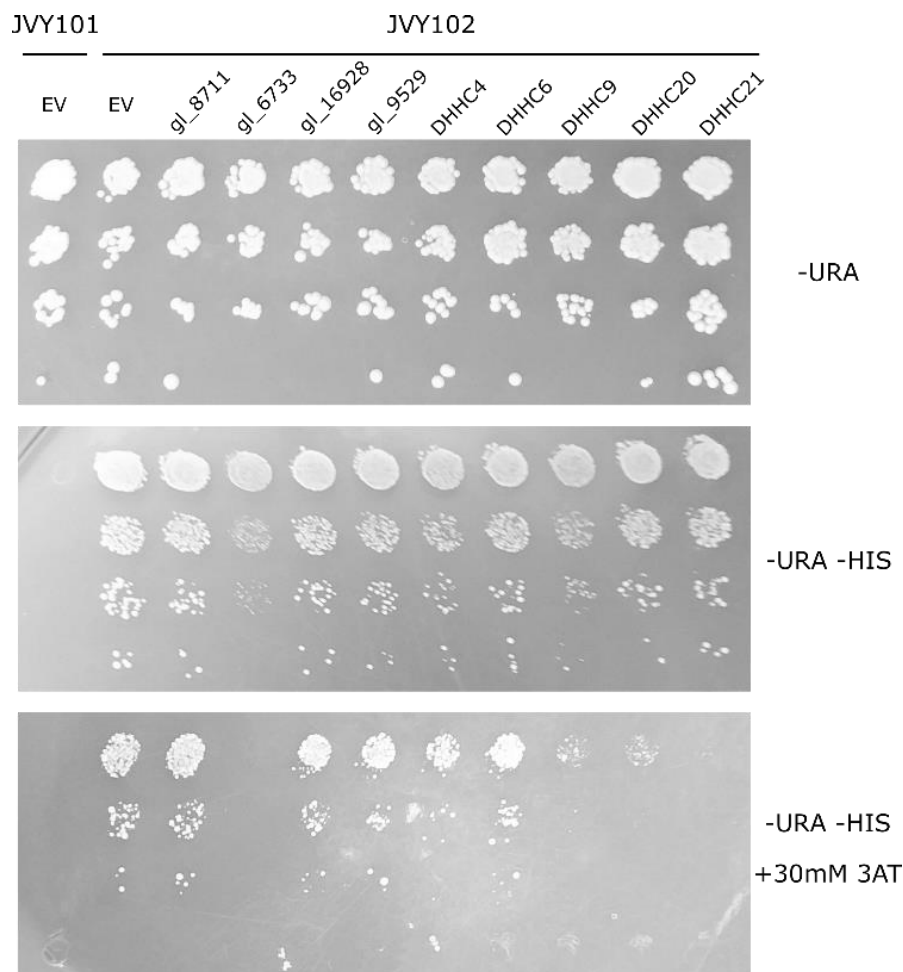
Restan por realizar estudios tendientes a conocer si el compuesto P15G3 es efectivamente un inhibidor, pero puede ser un punto de partida interesante para futuros ensayos.

#### MÉTODO DE BÚSQUEDA DE INHIBIDORES PARA PATS HETERÓLOGAS

De manera similar a lo realizado para la búsqueda de péptidos cíclicos inhibitorios se decidió probar la capacidad de este método de adaptarse para realizar el ensayo en PATs heterólogas. Para esto se utilizó la cepa JVY102 que

posee deletado en su genoma el gen de la PAT endógena Akr1, en esta cepa el casete FT-Yck2 no debería estar palmitoilado permitiendo el crecimiento en medio sin histidina. Si al transformar la cepa con PATs heterólogas de mayor interés alguna de ellas palmitoila el casete se debería ver una pérdida de la capacidad de crecimiento en el medio sin histidina. Las PATs que seleccionamos para este ensayo fueron las PATs de *G. lamblia* gl\_8711, gl\_6733, gl\_16938, gl\_9529, las PATs humanas DHHC4, DHHC6 y DHHC20 y las PATs de ratón DHHC9 y DHHC21, todas fueron insertadas a la cepa utilizando plásmidos de alto número de copia basados en el vector comercial YEplac195 el cual posee como marcador de selección el gen URA3.

Se realizó el ensayo de crecimiento en medio sin uracilo ni histidina (-URA -HIS) y se observó una disminución leve del crecimiento de la cepa JYV102 transformada con la PAT de *G. lamblia* gl\_6733. Para volver el ensayo más astringente y que permitiera ver fenotipos más sutiles adicionamos al medio 30 mM de 3AT, en estas condiciones se observó una marcada disminución del crecimiento en las PATs gl\_6733, DHHC9, DHHC20 y DHHC21 (Figura 24).



**Figura 24. Adaptación del ensayo de drogas a PATs heterólogas.** Ensayo de crecimiento de la cepa JYV102 transformada con vector vacío (EV), con las PATs de *Giardia lamblia* gl\_8711, gl\_6733, gl\_16938, gl\_9529, las PATs humanas DHHC4, DHHC6



y DHHC20 y las PATs de ratón DHHC9 y DHHC21. En la primera columna se añade como control la cepa JY101 transformada con vector vacío (EV). El ensayo se realizó en medio completo (YPD), medio mínimo sin histidina (-HIS) y medio mínimo sin histidina suplementado con 30 mM 3AT (-HIS+30 mM 3AT).

Estos resultados muestran que las 4 PATs pueden palmitoilar el casete FT-Yck2, lo cual indica que serían buenas candidatas para ser utilizadas en nuestro ensayo de búsqueda de drogas.

Se desarrollaron cepas funcionales para la búsqueda de compuestos inhibidores de palmitoiltransferasas, JVY101 y JVY102. Se optimizaron condiciones para que la diferencia de crecimiento entre la cepa que posee la PAT endógena Akr1 y la cepa que no la posee sea máxima. Esto dio como resultado un ensayo funcional y robusto para una búsqueda a gran escala según indica el valor de  $z'$  del ensayo. Además, este ensayo es de selección positiva, permitiendo que crezcan aquellas cepas donde la palmitoilación del sustrato se haya visto afectada. Esto permite disminuir el ruido que generan las drogas que son tóxicas para la levadura o que tienen problemas de permeabilidad e ingreso al organismo.

La puesta a punto nos permitió iniciar pruebas de búsqueda a gran escala de drogas inhibitorias de la actividad de Akr1. Hasta el momento de escritura de esta tesis se han estudiado 3200 compuestos de un extracto de la librería 3D Biodiversity de Chem Div. Resta continuar los ensayos con más compuestos de esa librería o de otras a las que se pudiera acceder.

De las pruebas realizadas hasta el momento se encontró un compuesto, P1E4, que tiene un marcado efecto de crecimiento en las cepas, pero que posee histidina en su estructura, por lo cual se consideró que es un falso positivo. Posiblemente el compuesto sea inestable o la levadura puede metabolizarlo para liberar la histidina de la estructura, suplementando la falta de la misma en el medio de cultivo y permitiendo que las levaduras crezcan. Además, se encontró un compuesto, P15G3, que genera un crecimiento significativo de la cepa de búsqueda. De poseer un efecto inhibitorio su capacidad sería baja, ya que el crecimiento que induce no es sustancial, pero eso no lo hace menos interesante. Un inhibidor poco potente puede ser la base sobre la cual trabajar para encontrar compuestos similares con una mayor capacidad de inhibir la o las PATs de interés. Para esto se podría realizar un análisis de estructura-actividad, comparando compuestos similares, y de esta manera detectar estructuras o grupos funcionales esenciales para la inhibición. Antes de eso será importante realizar más ensayos para comprender el mecanismo de acción del compuesto P15G3 e identificar si efectivamente tiene un efecto inhibitorio.

Sería importante poder desarrollar un método de validación con cultivos creciendo en tubos de medio ensayo, con agitación, que sea más reproducible y nos permita comparar diferencias de crecimiento pequeñas con menores niveles de error. Una opción que podría ser interesante a la hora de pensar en validar el efecto de las drogas sería a través de ensayos de Western blot. En ese sentido, se ha visto que la proteína Yck2 en su forma palmitoilada, con localización en la membrana plasmática se hiperfosforila y corre como una doble banda, esto no sucede en la forma no palmitoilada (27). En la Figura 14B podemos observar como FT-Yck2 muestra una doble banda en la cepa JVY101, mientras que en la cepa JVY102 se observa predominantemente la banda inferior. Si alguna droga

afectara la palmitoilación sería esperable ver un cambio de doble banda a simple banda o algún fenotipo intermedio donde aún se observan las dos bandas, pero se empieza a ver como mayoritaria la inferior.

Se ha mostrado en el pasado que Yck2 es un sustrato promiscuo, que puede ser modificado por muchas PATs de levadura, mamíferos y del parásito *G. lamblia* (Anexo II) (77). Esto permitió pensar que utilizando la cepa JY102, que no posee la PAT endógena Akr1, se podría verificar si alguna PAT heteróloga podía complementar la función de palmitoilación a la proteína FT-Yck2. Si alguna PAT demostraba tener la capacidad de modificar a la quimera entonces podría ser un indicio de que el método es adaptable para buscar inhibidores de otras palmitoiltransferasas con un mayor interés por su impacto en salud humana. Se realizó este ensayo y verificamos que una PAT del parásito *G. lamblia*, gl\_6733, y 3 PATs de mamíferos, DHHC9, DHHC20 y DHHC21, tenían la capacidad de complementar la función de Akr1 y podrían ser potenciales blancos de inhibidores en el método de búsqueda. Estas 4 PATs son las mismas que mostraron ser funcionales en el Capítulo I, lo cual reafirma la capacidad de estas PATs de palmitoilar la quimera FT-Yck2 a pesar de los cambios en la cepa.

Hubo PATs tanto de parásito como de mamífero que no complementaron la función de Akr1 y que no lograron palmitoilar a FT-Yck2, esto puede deberse a múltiples razones. La primera es que efectivamente no puedan palmitoilar a la quimera FT-Yck2 por tener funciones distintas. Esto podría solucionarse modificando la proteína que está fusionada al factor de transcripción para poder utilizar sustratos endógenos de cada PAT. Utilizar los pares enzimas-sustrato específicos tendría la ventaja añadida de que se podrían encontrar no solo inhibidores de la actividad palmitoiltransferasa sino también de la interacción entre las proteínas, aumentando las posibilidades de obtener un resultado positivo y aumentando las chances de que el inhibidor sea de alta especificidad.

Otras posibilidades por las cuales una PAT puede no funcionar en el ensayo son que no se expresen correctamente, que se estén degradando, o incluso que le falte algún complemento, cofactor o modificación postraducciona. Por ejemplo, DHHC6 debe ser palmitoilada por DHHC16 para poder llevar adelante su función como palmitoiltransferasa (31). Esto quizá podría ser solucionado expresando ambas PATs en las levaduras del ensayo.

Los compuestos que se esperaría encontrar utilizando este método de búsqueda se podrían clasificar en cuatro grupos: inhibidores específicos de la PAT en estudio, inhibidores generales de la palmitoilación, inhibidores que afecten de manera indirecta la palmitoilación o compuestos que interfieran con el nivel de expresión de la PAT. Los primeros dos grupos serían de gran interés tanto en ciencia básica como siendo utilizados a modo de base para futuros tratamientos terapéuticos. Sería interesante poder encontrar ambos tipos de inhibidores, ya que servirían para responder distintos tipos de preguntas. Los inhibidores específicos que pudiéramos encontrar esperaríamos que estén afectando de

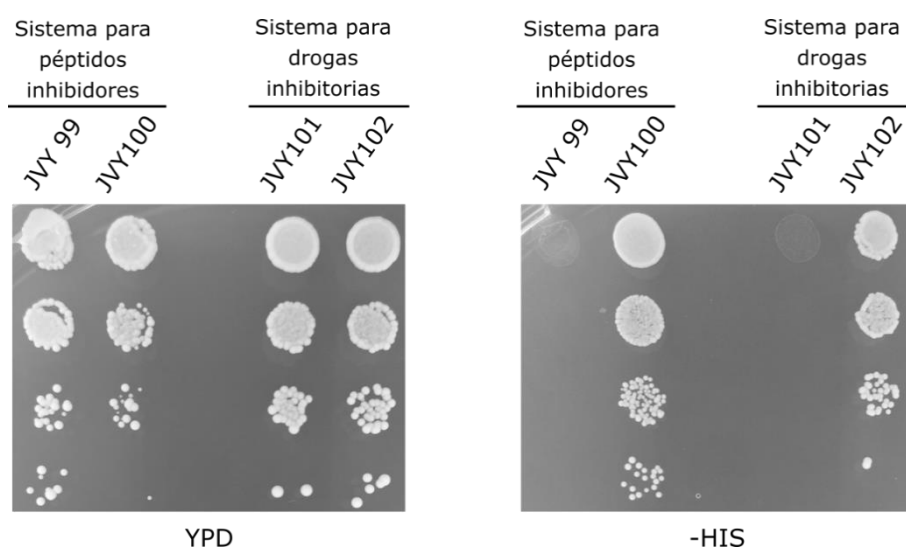
alguna manera algún sitio que es único de la PAT en estudio, por ejemplo, el sitio de reconocimiento de sustratos, lo cual sería interesante porque en muchos casos el mismo no se conoce. En cuanto a los inhibidores generales, deberían afectar mecanismos comunes de todas las DHHC, por ejemplo, bloqueando el sitio activo que se encuentra conservado en esta familia de enzimas o afectando el motivo PaCCT que interacciona con el mismo. Es importante destacar que las levaduras son viables con hasta 5 de sus 7 PATs delecionadas, es decir que si bien un inhibidor general podría ser letal, no se debe descartar encontrar un inhibidor de amplio espectro o quizá uno general si no estuviera en concentraciones óptimas. Para saber si el compuesto seleccionado es específico o general simplemente se los debe testear contra las otras PATs de levadura, muchas de las cuales tienen ensayos fenotípicos simples para ver si son funcionales o no, similares al de la termosensibilidad de Akr1.

Tanto los compuestos que inhiban indirectamente a la palmitoilación o que afecten la expresión de las PATs serían falsos positivos. Los indirectos no dejan de ser interesantes porque podrían aportar datos sobre cómo funciona la regulación de la S-acilación, aspecto que aún es poco claro. Por último, los compuestos que disminuyan la expresión de la PAT de interés pueden confundirse con inhibidores ya que van a facilitar la expresión de HIS3, permitiendo que la cepa crezca en el medio de selección. Esto es fácilmente solucionable testeando los compuestos contra la PAT expresada utilizando diferentes promotores y siguiendo su expresión por medio de ensayos de Western blot.

Actualmente en el laboratorio se está trabajando en comenzar a desarrollar estrategias de búsqueda de inhibidores de las PATs heterólogas utilizando el FT-Yck2, pero también intentando cambiar la proteína Yck2 por sustratos propios de las PATs de interés. Se ha iniciado este trabajo utilizando la DHHC20 humana por su potencial como blanco de terapias de tratamiento para el cáncer.

CONCLUSIÓN

Se pudo diseñar y obtener 4 cepas capaces de ser utilizadas en ensayos de búsqueda de inhibidores de palmitoiltransferasas. Con esas 4 cepas se construyeron dos métodos de búsqueda diferentes para distintos tipos de inhibidores. Las cepas JVY99 y JVY100 pueden ser utilizadas para péptidos inhibidores que se sintetizan en el interior de la levadura. Las cepas JVY101 y JVY102 pueden utilizarse para ensayos con drogas inhibitorias ya que al tener el gen ERG6 deletado son más permeables al ingreso de las mismas. En este punto ambos pares de cepas poseen un crecimiento diferenciado y marcado entre las levaduras que poseen la PAT endógena Akr1 (JVY99 y JVY101) que no pueden crecer en medio sin histidina, y las que no poseen la PAT (JVY100 y JVY102) que crecen normalmente en medio sin histidina (Figura 25).



**Figura 25. Cepas para dos métodos de búsqueda de inhibidores.** Ensayo de crecimiento donde se puede ver la diferencia de crecimiento de las cepas que poseen la PAT (JVY99 y JVY101) y las que no la poseen (JVY100 y JVY102) para los dos métodos de búsqueda que utilizaremos en el medio de selección sin histidina (-HIS).

Se inició la búsqueda de inhibidores de la PAT Akr1 trabajando sobre las cepas JVY99 y JVY101 que poseen la PAT y que no pueden crecer en medio sin histidina. Las cepas JVY100 y JVY102 fueron utilizadas como controles en los ensayos, pero también son las cepas base para las adaptaciones a métodos de búsqueda de inhibidores de PATs heterólogas de mayor interés para la salud humana. Ambos métodos mostraron indicios de que podrían adaptarse al uso de PATs heterólogas, particularmente para las PATs gl\_6733, DHHC9, DHHC20 y DHHC21 se podrían iniciar ensayos sin mayores complicaciones.

La búsqueda de péptidos inhibidores para la PAT Akr1 no arrojó hasta el momento potenciales inhibidores, pero sí se identificó al péptido iDHHC21-1 (i1) como potencial candidato inhibidor de la PAT de ratón DHHC21. Resta

profundizar el estudio para saber si estamos efectivamente en presencia de un inhibidor.

En cuanto al ensayo de búsqueda de drogas inhibitorias se encontró un compuesto interesante, P15G3, que parece tener mayor actividad a concentraciones bajas en la cepa con la PAT endógena Akr1. Para esta droga aún resta indagar sobre el mecanismo de acción, si está actuando sobre la PAT o si está activando algún otro mecanismo que permite que la cepa de interés crezca. Es importante destacar que a pesar de que no sería un inhibidor potente puede ser la base para desarrollar drogas derivadas con un mayor potencial de acción.

Más allá de estos resultados preliminares lo más destacable es que ambos métodos de búsqueda son funcionales y quedan como herramientas para uso futuro en nuestro laboratorio. Estos desarrollos son de gran interés para el campo de la S-acilación que se encuentra activamente buscando inhibidores específicos de la palmitoilación en general y de las diferentes PATs en particular. Es importante destacar que continuamos con los estudios de búsqueda aquí presentados ya que restan por explorar muchos potenciales candidatos, péptidos y drogas, en ambas colecciones. Próximamente estaremos iniciando la búsqueda de drogas inhibitorias para la PAT DHHC20 en conjunto con la Farm. María Luz Giolito.





## CEPAS DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE UTILIZADAS

Cepas salvajes de laboratorio utilizadas (84):

**BY4741** *MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*. Derivada de la cepa de laboratorio S288C.

**BY4742** *MATa his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0*. Derivada de la cepa de laboratorio S288C.

Las cepas NDY1949 y NDY1953 fueron cedidas amablemente por el Dr. Nicholas Davis. El genotipo de las cepas es el siguiente:

**NDY1949** *Mat a his3-Δ1 ura3-Δ0 leu2-Δ0 can1::STE2pr-LEU2 lyp1Δ cyh2Δ leu2Δ::LexA-HIS3::natMX4 met15Δ::YCK2(CCIIS)*.

**NDY1953** *Mat a his3-Δ1 ura3-Δ0 leu2-Δ0 can1::STE2pr-LEU2 lyp1Δ cyh2Δ leu2Δ::LexA-HIS3::natMX4 met15Δ::YCK2(CCIIS) akr1Δ::LEU2*.

Las cepas generadas en esta tesis poseen los siguientes genotipos:

**JVY99** *Mat a his3-Δ1 ura3-Δ0 leu2-Δ0 can1::STE2pr-LEU2 lyp1Δ cyh2Δ leu2Δ::LexA-HIS3::natMX4 met15Δ::YCK2(CCIIS) trp1Δ:hphMX4:LexA-VP16-HA-FLAG-Yck2*

**JVY100** *Mat a his3-Δ1 ura3-Δ0 leu2-Δ0 can1::STE2pr-LEU2 lyp1Δ cyh2Δ leu2Δ::LexA-HIS3::natMX4 met15Δ::YCK2(CCIIS) akr1Δ::LEU2 trp1Δ:hphMX4:LexA-VP16-HA-FLAG-Yck2*

**JVY101** *Mat a his3-Δ1 ura3-Δ0 leu2-Δ0 can1::STE2pr-LEU2 lyp1Δ cyh2Δ leu2Δ::LexA-HIS3::natMX4 met15Δ::YCK2(CCIIS) erg6Δ:hphMX4:LexA-VP16-HA-FLAG-Yck2*

**JVY102** *Mat a his3-Δ1 ura3-Δ0 leu2-Δ0 can1::STE2pr-LEU2 lyp1Δ cyh2Δ leu2Δ::LexA-HIS3::natMX4 met15Δ::YCK2(CCIIS) akr1Δ::LEU2 erg6Δ:hphMX4:LexA-VP16-HA-FLAG-Yck2*

## PLÁSMIDOS UTILIZADOS

El plásmido pND3544 fue cedido amablemente por el Dr. Nicholas Davis. Contiene el casete LexA-VP16-HA-FLAG-Yck2 (FT-Yck2) bajo los promotores y terminadores endógenos de Yck2, marcador de selección URA3 y es de tipo 2 $\mu$  (multi copias).

El plásmido Higo-pND3544 fue elaborado en esta tesis. Se digirió el gen hphMX4 de resistencia a higromicina del plásmido pFA6a-hphNT1 (75) utilizando la enzima *NotI* y posteriormente se introdujo en el plásmido pND3544 digerido

con la misma enzima. El sitio *NotI* del plásmido de destino es un sitio único que se encuentra en el extremo 5' del promotor del casete FT-Yck2. La construcción HphMX4-FT-Yck2 se utilizó posteriormente para hacer la inserción al genoma en las cepas de búsqueda.

Los plásmidos de expresión de las PATs heterólogas están basados en plásmidos YEplac195 (85) con promotor TPI y terminador PGK (PJV753).

El gen de DHHC20 humana, con uso de codones optimizado para levaduras, en un plásmido pUC57 fue sintetizado por la compañía GeneScript (NJ, USA). Por digestión con las enzimas de restricción *KpnI* y *PstI* se obtuvo el fragmento correspondiente al gen de DHHC20 y se lo colocó en el PJV753 utilizando los mismos sitios.

Los genes de DHHC9 y DHHC21 de ratón se obtuvieron amplificando la secuencia codificante de las proteínas a partir de plásmidos pEF-BOS HA que fueron amablemente cedidos por Dr. M. Fukata (86). El gen de DHHC9 se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos *oDHHC9 for* y *oDHHC9 rev* y se insertó en el PJV753 en los sitios *BamHI* y *SacI*. El gen de DHHC21 se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos *oDHHC21 01* y *oDHHC21 02* y se insertó en el PJV753 en los sitios *BamHI* y *HindIII*.

Los genes de DHHC4 y DHHC6 se obtuvieron de los plásmidos PJV254 y PJV200 respectivamente, ambos elaborados en nuestro laboratorio previo a esta tesis. Se cortó el gen de DHHC4 utilizando los sitios *BamHI* y *HindIII* y se insertó en el PJV753 utilizando los mismos sitios. El gen de DHHC6 se digirió utilizando los sitios *BamHI* y *SalI* y se insertó en el PJV753 utilizando los mismos sitios.

Por último, los genes de las PATs de *G. lamblia* *gl\_8711*, *gl\_6733*, *gl\_16928* y *gl\_9529* en plásmidos de levadura de tipo YCplac33 (85) con promotor TPI y terminador PGK fueron cedidos por la Dra. Carolina Touz. Los genes fueron digeridos con las enzimas de restricción *BamHI* y *HindIII* y se colocaron en el PJV753 utilizando los mismos sitios.

Para los plásmidos en los cuales se intercambié el marcador de selección URA3 por el marcador MET15 se amplificó el gen MET15 de ADN genómico extraído de una cepa BY4742 utilizando los oligonucleótidos *PJV29-Met15F* y *PJV29-Met15R*. Luego se transformó en simultáneo con el plásmido PJV753 digerido en los sitios *StuI* y *EcoRV* para generar el nuevo plásmido por recombinación homóloga (Gap Repair). Al nuevo plásmido vacío lo denominamos PJV775. Realizamos el mismo proceso con los plásmidos de DHHC20 y DHHC21 en el PJV753.

## TABLA DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Nombre	Secuencia
Trp1-S1Knop_Fw	Gtgagtatacgtgattaagcacacaaaggcagcttggagtatgcgtacgc tgcaggtcgac
oRv Yck2term-Trp1	Gtgcacaaacaataacttaaataaataactactcagtaataacgatcttgata ctctgtatttag
oDHHC9 for	Aaagagctcatgtctgtgatggg
oDHHC9 rev	Tttggatccctacttctcagcttc
oDHHC21 01	Aaaggatccatgggtcttcggattcactttgtgt
oDHHC21 02	Tttaagcttttagacgtgattggcaaagtggtag
PJV29-Met15F	Cattaacctataaaaaataggcgtatcacgaggcccttcgctgccatcctc atgaaaactg
PJV29-Met15R	Catctccatgcagttggacgatcgatgataagctgtcaaacctgtgagag aaagtagg
Erg6-KO-Higro-Fw	Acataatttaaaaaacaagaataaaataataatagtaggcagcata agcgtacgctgcaggtcgac
Erg6-KO-Higro-rev	Aaataggtatataatcgtgcgctttattgaatcttattgatctagtgatgatctt gatactctgtatttag

## ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS Y WESTERN BLOT

Para la preparación de las muestras se utilizaron de partida 4 DOs de células de levadura a una densidad óptica de entre 0,8 y 1 DO/ml. Se agregó TCA (Ácido Tricloro Acético) a una concentración final de 10% V/V y se incubó a las células por 10 minutos en hielo. Luego se centrifugaron a 10.000 xg durante 2 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células colectadas se resuspendieron en 300 µL de TCA 10% V/V y se les agregaron 200 µL de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Las células se lisaron mecánicamente por agitación durante 10 minutos a 4°C. Se centrifugó durante 1 minuto a 300 xg para eliminar las perlas de vidrio y restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó 1 minuto a 16.000 xg para precipitar las proteínas. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 90 µL de buffer de corrida con 1/5 de 2-Mercaptoetanol más 10 µL de Buffer Tris base 1M.

Para la realización de geles de poliacrilamida en presencia de SDS se utilizó el sistema descrito por Laemmli (87). Los extractos proteicos se calentaron a 55 °C durante cinco minutos en presencia de buffer de corrida. La electroforesis se desarrolló a temperatura ambiente a 12 V/cm hasta que las proteínas se concentraron en el gel separador y luego se aplicaron 18 V/cm hasta que el frente de corrida llegó al final del gel. La transferencia de las proteínas a la membrana

de nitrocelulosa se realizó de acuerdo a lo descrito por Towbin (88). Se bloqueó la membrana de nitrocelulosa en una solución de leche bovina descremada al 5% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. La incubación con el anticuerpo primario (anti-HA de ratón dilución 1:1500, elaborado por Sigma Aldrich, US y anti-Vac8 de conejo dilución 1:1000, elaborado en nuestro laboratorio) y secundario (anti-IgG de ratón dilución 1:20000, IRDye800, elaborado por LI-COR Bioscience, UK y anti-IgG de conejo dilución 1:2000, IRDye680, elaborado por LI-COR Bioscience, UK) se realizó en PBS más leche al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente o durante 16 horas a 4°C. Entre las incubaciones de anticuerpos primarios y secundarios se realizaron 3 lavados de la membrana con PBS por 5 minutos cada uno. Al finalizar, se realizaron 3 lavados adicionales con PBS y las membranas fueron escaneadas usando el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, UK).

## PURIFICACIÓN DE ADN GENÓMICO DE LEVADURAS

Se cosecharon 2 ml de un cultivo de levadura saturado, crecido toda la noche. Se agregó a las células 400 µl de buffer TENTS (Tritón 2%, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH=8 y SDS 1%), 400 µl de mezcla fenol, cloroformo, isoamílico (25:24:1) y 100 µl de perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro. Se colocó todo en disruptor mecánico por 2 min y posteriormente se centrifugó a máxima velocidad por 3 minutos. Se tomó la fase superior y se colocó en un nuevo tubo junto con 50 µl de solución de acetato de potasio y ácido acético (60 ml 5 M KOAc; 11,5 ml HAc; 28,5 ml de agua) y 500 µl de isopropanol. Se centrifugó por 20 min a máxima velocidad a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70% a -20 °C. Se volvió a centrifugar por 5 min a máxima velocidad a 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se secó el pellet de ADN y se resuspendió en 30 µl de agua con ARNasa.

## PURIFICACIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE LEVADURAS

Se realizó el protocolo de purificación de ADN genómico con la modificación de que se agregó la ARNasa en el paso de lisis y no en la solución final de resuspensión.

Se tomaron 3 µl de la solución final de ADN genómico y plasmídico y se transformaron bacterias. Para esto se colocaron los 3 µl en 100 µl de bacterias DH5α ultracompetentes y se incubaron en hielo 30 min. Se realizó un choque térmico colocándolas 90 segundos a 42 °C. Se volvieron a colocar 2 min en hielo y luego se agregaron 800 µl de medio bacteriano LB. Se incubó a 37 °C por 1 hora y luego se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Se resuspendió el pellet de

bacterias en 100 µl de medio y se sembró en placas con selección de antibióticos.

Se incubó toda la noche a 37 °C y de las colonias que se obtuvieron se purificó el plásmido utilizando el kit de miniprep Puro Plásmido (Productos Bio-Lógicos, Universidad Nacional de Quilmes).

## TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Todos los gráficos y tratamientos estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad Prism 5. En todos los casos se graficó la media de los valores observados  $\pm$  desviación estándar.

En el Capítulo I los análisis estadísticos fueron del tipo “Two-way ANOVA” seguidos de un test post hoc de Bonferroni, en el cual se consideró como significativo (\*) un  $p < 0,001$ .

En el Capítulo II los análisis fueron del tipo prueba t desapareada y se consideró como significativo (\*) un  $p < 0,05$ .

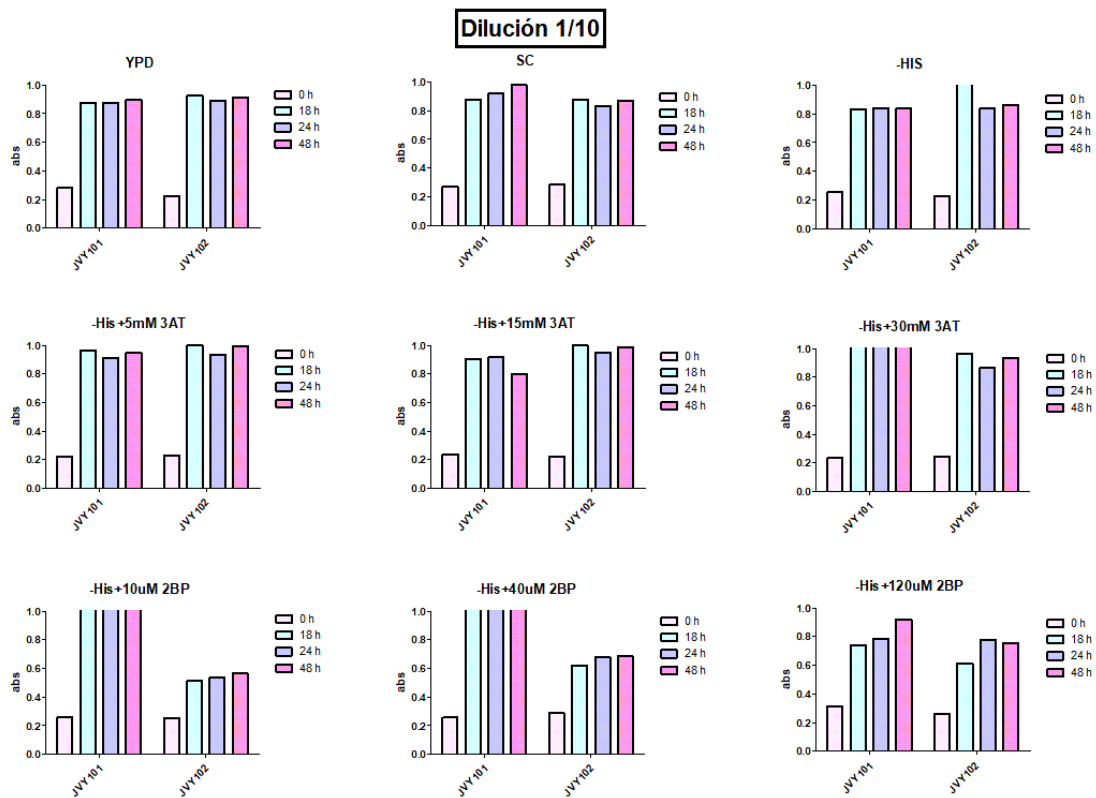
## SELECCIÓN DE MEDIO Y DILUCIÓN DE TRABAJO (CAP. II)

Para determinar las mejores condiciones de trabajo en placas multiwell se decidió optimizar el crecimiento de las cepas de trabajo de manera tal que la diferencia entre ambas sea marcada.

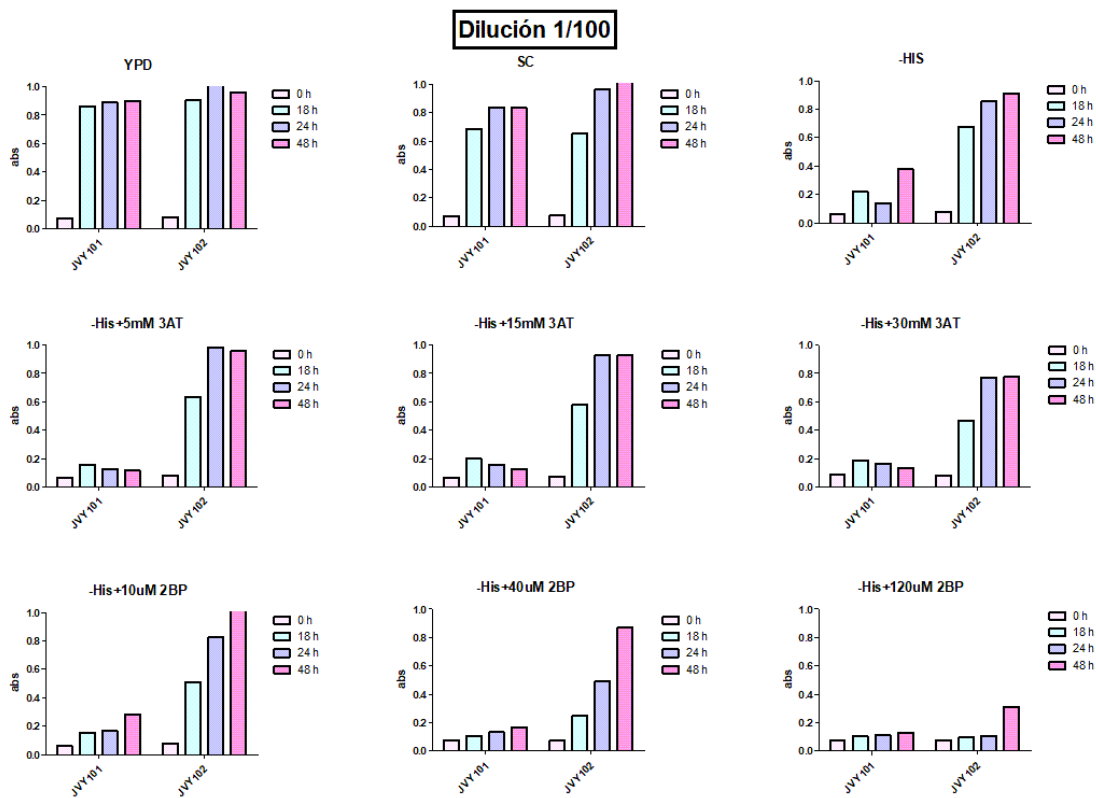
Durante la puesta a punto del crecimiento en medio líquido se probaron 4 diluciones de levadura. Se partió de cultivos saturados, crecidos durante toda la noche agitando a 30 °C con una densidad óptica aproximada de 5 DO/ml. A los cultivos de partida se los llevó a una dilución final en well de 10, 100, 1000 y 10.000 veces.

Cada una de las diluciones descriptas fue realizada en 9 medios diferentes, dos medios completos (YPD y SC) y 7 medios de selección sin histidina (-HIS) sin suplementar o suplementados con 3AT o 2BP.

En las Figuras 26-29 se puede observar el crecimiento medido en absorbancia (abs) de las distintas diluciones y los distintos medios. Se estableció como criterio que las condiciones óptimas de trabajo se lograban realizando una dilución 1/1000 en medio sin histidina (-HIS).

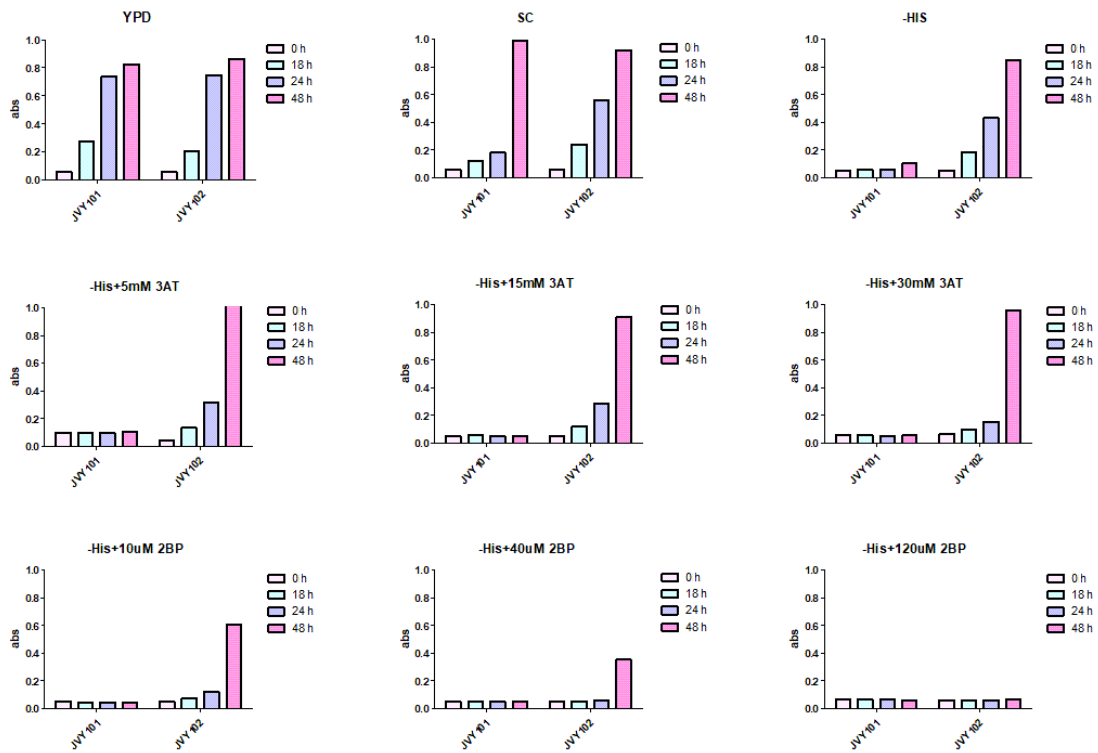


**Figura 26. Crecimiento de las cepas JYV101 y JYV102 en distintos medios a una dilución 1/10 de un cultivo saturado.**



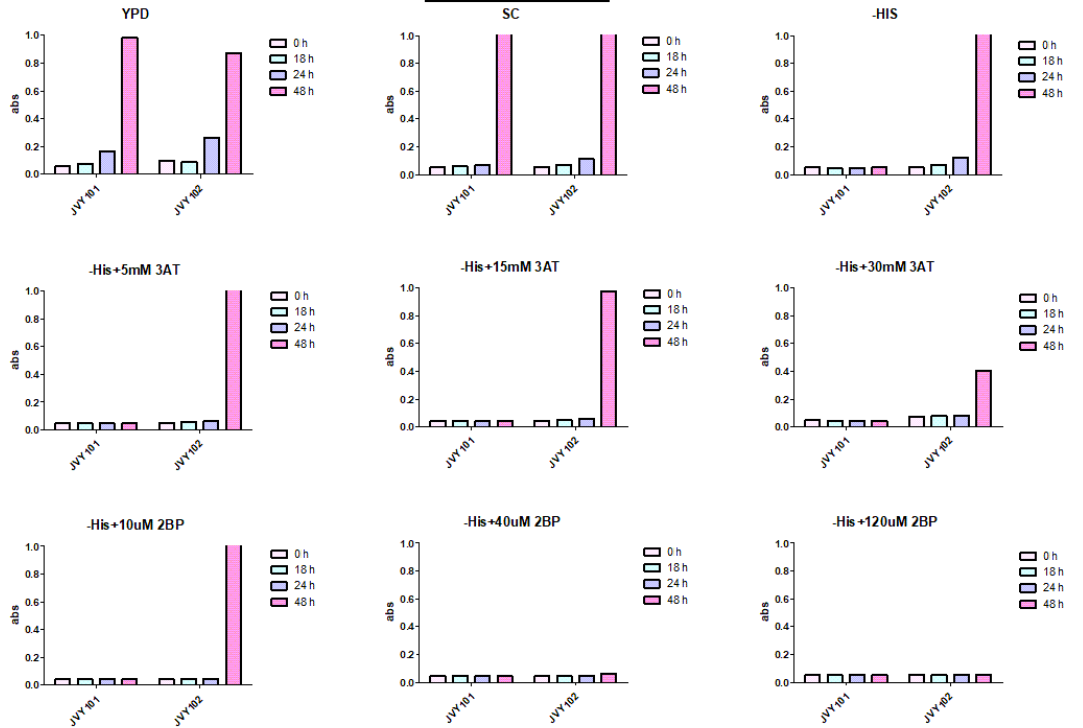
**Figura 27. Crecimiento de las cepas JYV101 y JYV102 en distintos medios a una dilución 1/100 de un cultivo saturado.**

**Dilución 1/1000**



**Figura 28. Crecimiento de las cepas JYV101 y JYV102 en distintos medios a una dilución 1/1000 de un cultivo saturado.**

**Dilución 1/10000**



**Figura 29. Crecimiento de las cepas JYV101 y JYV102 en distintos medios a una dilución 1/10000 de un cultivo saturado.**





1. Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ. Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angew Chem Int Ed*. 2005;44(45):7342-72.
2. Chen B, Sun Y, Niu J, Jarugumilli GK, Wu X. Protein Lipidation in Cell Signaling and Diseases: Function, Regulation, and Therapeutic Opportunities. *Cell Chem Biol*. 19 de julio de 2018;25(7):817-31.
3. Paulick MG, Bertozzi CR. The Glycosylphosphatidylinositol Anchor: A Complex Membrane-Anchoring Structure for Proteins. *Biochemistry*. 8 de julio de 2008;47(27):6991-7000.
4. Wang M, Casey PJ. Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. febrero de 2016;17(2):110-22.
5. Chamberlain LH, Shipston MJ. The physiology of protein S-acylation. *Physiol Rev*. abril de 2015;95(2):341-76.
6. Xue L, Gollapalli DR, Maiti P, Jahng WJ, Rando RR. A palmitoylation switch mechanism in the regulation of the visual cycle. *Cell*. 11 de junio de 2004;117(6):761-71.
7. Kang R, Swayze R, Lise MF, Gerrow K, Mullard A, Honer WG, et al. Presynaptic trafficking of synaptotagmin I is regulated by protein palmitoylation. *J Biol Chem*. 26 de noviembre de 2004;279(48):50524-36.
8. Washbourne P. Greasing transmission: palmitoylation at the synapse. *Neuron*. 16 de diciembre de 2004;44(6):901-2.
9. Martin BR, Wang C, Adibekian A, Tully SE, Cravatt BF. Global profiling of dynamic protein palmitoylation. *Nat Methods*. 6 de noviembre de 2011;9(1):84-9.
10. Ren J, Wen L, Gao X, Jin C, Xue Y, Yao X. CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel PEDS*. noviembre de 2008;21(11):639-44.
11. Blanc M, David F, Abrami L, Migliozi D, Armand F, Bürgi J, et al. SwissPalm: Protein Palmitoylation database. *F1000Research*. 2015;4:261.
12. Blanc M, David FPA, van der Goot FG. SwissPalm 2: Protein S-Palmitoylation Database. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2019;2009:203-14.
13. Roth AF, Wan J, Bailey AO, Sun B, Kuchar JA, Green WN, et al. Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell*. 2 de junio de 2006;125(5):1003-13.
14. Martin BR, Cravatt BF. Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells. *Nat Methods*. febrero de 2009;6(2):135-8.
15. Resh MD. Fatty acylation of proteins: The long and the short of it. *Prog Lipid Res*. 2016;63:120-31.
16. Rana MS, Kumar P, Lee C-J, Verardi R, Rajashankar KR, Banerjee A. Fatty acyl recognition and transfer by an integral membrane S-acyltransferase. *Science*. 12 de 2018;359(6372).
17. Pedro MP, Vilcaes AA, Gomez GA, Daniotti JL. Individual S-acylated cysteines differentially contribute to H-Ras endomembrane trafficking and acylation/deacylation cycles. *Mol Biol Cell*. 1 de abril de 2017;28(7):962-74.

18. Daniotti JL, Pedro MP, Valdez Taubas J. The role of S-acylation in protein trafficking. *Traffic Cph Den.* 2017;18(11):699-710.
19. Greaves J, Prescott GR, Fukata Y, Fukata M, Salaun C, Chamberlain LH. The Hydrophobic Cysteine-rich Domain of SNAP25 Couples with Downstream Residues to Mediate Membrane Interactions and Recognition by DHHC Palmitoyl Transferases. *Mol Biol Cell.* 15 de marzo de 2009;20(6):1845-54.
20. Mueller GM, Maarouf AB, Kinlough CL, Sheng N, Kashlan OB, Okumura S, et al. Cys Palmitoylation of the  $\beta$  Subunit Modulates Gating of the Epithelial Sodium Channel. *J Biol Chem.* 10 de enero de 2010;285(40):30453-62.
21. Mukherjee A, Mueller GM, Kinlough CL, Sheng N, Wang Z, Mustafa SA, et al. Cysteine palmitoylation of the  $\gamma$  subunit has a dominant role in modulating activity of the epithelial sodium channel. *J Biol Chem.* 16 de mayo de 2014;289(20):14351-9.
22. Valdez-Taubas J, Pelham H. Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J.* 20 de julio de 2005;24(14):2524-32.
23. Dietrich LEP, Ungermann C. On the mechanism of protein palmitoylation. *EMBO Rep.* noviembre de 2004;5(11):1053-7.
24. González Montoro A, Quiroga R, Maccioni HJF, Valdez Taubas J. A novel motif at the C-terminus of palmitoyltransferases is essential for Swf1 and Pfa3 function in vivo. *Biochem J.* 15 de abril de 2009;419(2):301-8.
25. González Montoro A, Quiroga R, Valdez Taubas J. Zinc co-ordination by the DHHC cysteine-rich domain of the palmitoyltransferase Swf1. *Biochem J.* 15 de septiembre de 2013;454(3):427-35.
26. González Montoro A, Chumpen Ramirez S, Quiroga R, Valdez Taubas J. Specificity of transmembrane protein palmitoylation in yeast. *PLoS One.* 24 de febrero de 2011;6(2):e16969.
27. Roth AF, Papanayotou I, Davis NG. The yeast kinase Yck2 has a tripartite palmitoylation signal. *Mol Biol Cell.* 1 de agosto de 2011;22(15):2702-15.
28. Greaves J, Gorleku OA, Salaun C, Chamberlain LH. Palmitoylation of the SNAP25 protein family: specificity and regulation by DHHC palmitoyl transferases. *J Biol Chem.* 6 de agosto de 2010;285(32):24629-38.
29. Lemonidis K, Salaun C, Kouskou M, Diez-Ardanuy C, Chamberlain LH, Greaves J. Substrate selectivity in the zDHHC family of S-acyltransferases. *Biochem Soc Trans.* 15 de 2017;45(3):751-8.
30. Ohno Y, Kihara A, Sano T, Igarashi Y. Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim Biophys Acta.* abril de 2006;1761(4):474-83.
31. Abrami L, Dallavilla T, Sandoz PA, Demir M, Kunz B, Savoglidis G, et al. Identification and dynamics of the human ZDHHC16-ZDHHC6 palmitoylation cascade. *eLife.* 15 de 2017;6.
32. Fredericks GJ, Hoffmann FW, Hondal RJ, Rozovsky S, Urschitz J, Hoffmann PR. Selenoprotein K Increases Efficiency of DHHC6 Catalyzed Protein Palmitoylation by Stabilizing the Acyl-DHHC6 Intermediate. *Antioxid Basel Switz.* 29 de diciembre de 2017;7(1).
33. Swarthout JT, Lobo S, Farh L, Croke MR, Greentree WK, Deschenes RJ, et al. DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J Biol Chem.* 2 de septiembre de 2005;280(35):31141-8.

34. Mitchell DA, Hamel LD, Ishizuka K, Mitchell G, Schaefer LM, Deschenes RJ. The Erf4 subunit of the yeast Ras palmitoyl acyltransferase is required for stability of the Acyl-Erf2 intermediate and palmitoyl transfer to a Ras2 substrate. *J Biol Chem*. 5 de octubre de 2012;287(41):34337-48.
35. Ko P-J, Dixon SJ. Protein palmitoylation and cancer. *EMBO Rep*. 2018;19(10).
36. Zaballa M-E, van der Goot FG. The molecular era of protein S-acylation: spotlight on structure, mechanisms, and dynamics. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. agosto de 2018;53(4):420-51.
37. Lin DTS, Davis NG, Conibear E. Targeting the Ras palmitoylation/depalmitoylation cycle in cancer. *Biochem Soc Trans*. 15 de 2017;45(4):913-21.
38. Fraser NJ, Howie J, Wypijewski KJ, Fuller W. Therapeutic targeting of protein S-acylation for the treatment of disease. *Biochem Soc Trans*. 28 de 2020;48(1):281-90.
39. Runkle KB, Kharbanda A, Stypulkowski E, Cao X-J, Wang W, Garcia BA, et al. Inhibition of DHHC20-Mediated EGFR Palmitoylation Creates a Dependence on EGFR Signaling. *Mol Cell*. 05 de 2016;62(3):385-96.
40. Kharbanda A, Walter DM, Gudiel AA, Schek N, Feldser DM, Witze ES. Blocking EGFR palmitoylation suppresses PI3K signaling and mutant KRAS lung tumorigenesis. *Sci Signal*. 3 de marzo de 2020;13(621).
41. Chen B, Zheng B, DeRan M, Jarugumilli GK, Fu J, Brooks YS, et al. ZDHHC7-mediated S-palmitoylation of Scribble regulates cell polarity. *Nat Chem Biol*. 2016;12(9):686-93.
42. Hernandez JL, Davda D, Cheung See Kit M, Majmudar JD, Won SJ, Gang M, et al. APT2 Inhibition Restores Scribble Localization and S-Palmitoylation in Snail-Transformed Cells. *Cell Chem Biol*. 19 de enero de 2017;24(1):87-97.
43. Pedram A, Razandi M, Deschenes RJ, Levin ER. DHHC-7 and -21 are palmitoylacyltransferases for sex steroid receptors. *Mol Biol Cell*. enero de 2012;23(1):188-99.
44. Veit M, Söllner TH, Rothman JE. Multiple palmitoylation of synaptotagmin and the t-SNARE SNAP-25. *FEBS Lett*. 29 de abril de 1996;385(1-2):119-23.
45. Gonzalo S, Linder ME. SNAP-25 Palmitoylation and Plasma Membrane Targeting Require a Functional Secretory Pathway. *Mol Biol Cell*. marzo de 1998;9(3):585-97.
46. Cho E, Park M. Palmitoylation in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Pharmacol Res*. 2016;111:133-51.
47. Sanders SS, Hayden MR. Aberrant palmitoylation in Huntington disease. *Biochem Soc Trans*. abril de 2015;43(2):205-10.
48. Gadalla MR, Veit M. Toward the identification of ZDHHC enzymes required for palmitoylation of viral protein as potential drug targets. *Expert Opin Drug Discov*. febrero de 2020;15(2):159-77.
49. Percherancier Y, Planchenault T, Valenzuela-Fernandez A, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Bachelier F. Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J Biol Chem*. 24 de agosto de 2001;276(34):31936-44.
50. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber CM, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature*. 22 de agosto de 1996;382(6593):722-5.

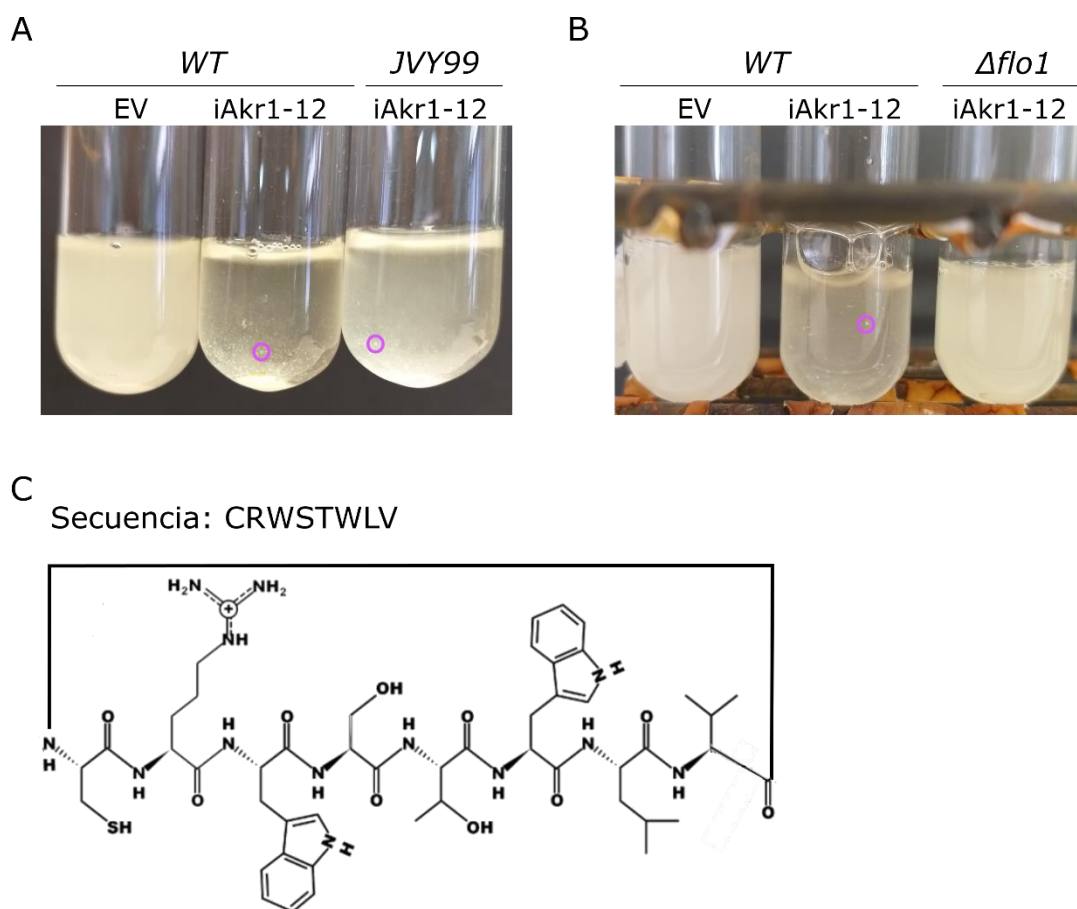
51. Brown RWB, Sharma AI, Engman DM. Dynamic protein S-palmitoylation mediates parasite life cycle progression and diverse mechanisms of virulence. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* abril de 2017;52(2):145-62.
52. Touz MC, Conrad JT, Nash TE. A novel palmitoyl acyl transferase controls surface protein palmitoylation and cytotoxicity in *Giardia lamblia*. *Mol Microbiol.* noviembre de 2005;58(4):999-1011.
53. Merino MC, Zamponi N, Vranych CV, Touz MC, Rópolo AS. Identification of *Giardia lamblia* DHHC proteins and the role of protein S-palmitoylation in the encystation process. *PLoS Negl Trop Dis.* julio de 2014;8(7):e2997.
54. Batista CM, Kessler RL, Eger I, Soares MJ. Treatment of *Trypanosoma cruzi* with 2-bromopalmitate alters morphology, endocytosis, differentiation and infectivity. *BMC Cell Biol.* 31 de 2018;19(1):19.
55. Resh MD. Use of analogs and inhibitors to study the functional significance of protein palmitoylation. *Methods San Diego Calif.* octubre de 2006;40(2):191-7.
56. Davda D, El Azzouny MA, Tom CTMB, Hernandez JL, Majmudar JD, Kennedy RT, et al. Profiling targets of the irreversible palmitoylation inhibitor 2-bromopalmitate. *ACS Chem Biol.* 20 de septiembre de 2013;8(9):1912-7.
57. Pedro MP, Vilcaes AA, Tomatis VM, Oliveira RG, Gomez GA, Daniotti JL. 2-Bromopalmitate reduces protein deacylation by inhibition of acyl-protein thioesterase enzymatic activities. *PLoS One.* 2013;8(10):e75232.
58. Ducker CE, Griffel LK, Smith RA, Keller SN, Zhuang Y, Xia Z, et al. Discovery and characterization of inhibitors of human palmitoyl acyltransferases. *Mol Cancer Ther.* julio de 2006;5(7):1647-59.
59. Jennings BC, Nadolski MJ, Ling Y, Baker MB, Harrison ML, Deschenes RJ, 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.* febrero de 2009;50(2):233-42.
60. Hamel LD, Lenhart BJ, Mitchell DA, Santos RG, Giulianotti MA, Deschenes RJ. Identification of Protein Palmitoylation Inhibitors from a Scaffold Ranking Library. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2016;19(4):262-74.
61. Martin DDO, Kanuparthi PS, Holland SM, Sanders SS, Jeong H-K, Einarson MB, et al. Identification of Novel Inhibitors of DLK Palmitoylation and Signaling by High Content Screening. *Sci Rep.* 06 de 2019;9(1):3632.
62. Holland SM, Collura KM, Ketschek A, Noma K, Ferguson TA, Jin Y, et al. Palmitoylation controls DLK localization, interactions and activity to ensure effective axonal injury signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 de enero de 2016;113(3):763-8.
63. Boncompain G, Herit F, Tessier S, Lescure A, Del Nery E, Gestraud P, et al. Targeting CCR5 trafficking to inhibit HIV-1 infection. *Sci Adv.* octubre de 2019;5(10):eaax0821.
64. Roth AF, Feng Y, Chen L, Davis NG. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J Cell Biol.* 14 de octubre de 2002;159(1):23-8.
65. Lobo S, Greentree WK, Linder ME, Deschenes RJ. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 25 de octubre de 2002;277(43):41268-73.
66. Denny PW. Yeast: bridging the gap between phenotypic and biochemical assays for high-throughput screening. *Expert Opin Drug Discov.* 2018;13(12):1153-60.

67. Kao LR, Peterson J, Ji R, Bender L, Bender A. Interactions between the ankyrin repeat-containing protein Akr1p and the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* enero de 1996;16(1):168-78.
68. Feng Y, Davis NG. Akr1p and the type I casein kinases act prior to the ubiquitination step of yeast endocytosis: Akr1p is required for kinase localization to the plasma membrane. *Mol Cell Biol.* julio de 2000;20(14):5350-9.
69. Pryciak PM, Hartwell LH. AKR1 encodes a candidate effector of the G beta gamma complex in the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway and contributes to control of both cell shape and signal transduction. *Mol Cell Biol.* junio de 1996;16(6):2614-26.
70. Horswill AR, Benkovic SJ. Cyclic peptides, a chemical genetics tool for biologists. *Cell Cycle Georget Tex.* abril de 2005;4(4):552-5.
71. Kritzer JA, Hamamichi S, McCaffery JM, Santagata S, Naumann TA, Caldwell KA, et al. Rapid selection of cyclic peptides that reduce alpha-synuclein toxicity in yeast and animal models. *Nat Chem Biol.* septiembre de 2009;5(9):655-63.
72. Tavassoli A. SICLOPPS cyclic peptide libraries in drug discovery. *Curr Opin Chem Biol.* junio de 2017;38:30-5.
73. Jensen NB, Strucko T, Kildegaard KR, David F, Maury J, Mortensen UH, et al. EasyClone: method for iterative chromosomal integration of multiple genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Yeast Res.* marzo de 2014;14(2):238-48.
74. Mead DJ, Gardner DC, Oliver SG. The yeast 2 micron plasmid: strategies for the survival of a selfish DNA. *Mol Gen Genet MGG.* diciembre de 1986;205(3):417-21.
75. Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, et al. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast Chichester Engl.* agosto de 2004;21(11):947-62.
76. Joung JK, Ramm EI, Pabo CO. A bacterial two-hybrid selection system for studying protein–DNA and protein–protein interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20 de junio de 2000;97(13):7382-7.
77. Ohno Y, Kashio A, Ogata R, Ishitomi A, Yamazaki Y, Kihara A. Analysis of substrate specificity of human DHHC protein acyltransferases using a yeast expression system. *Mol Biol Cell.* 1 de diciembre de 2012;23(23):4543-51.
78. Beard RS, Yang X, Meegan JE, Overstreet JW, Yang CGY, Elliott JA, et al. Palmitoyl acyltransferase DHHC21 mediates endothelial dysfunction in systemic inflammatory response syndrome. *Nat Commun.* 22 de septiembre de 2016;7:12823.
79. Shortle D, Novick P, Botstein D. Construction and genetic characterization of temperature-sensitive mutant alleles of the yeast actin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* agosto de 1984;81(15):4889-93.
80. Mukhopadhyay K, Kohli A, Prasad R. Drug susceptibilities of yeast cells are affected by membrane lipid composition. *Antimicrob Agents Chemother.* diciembre de 2002;46(12):3695-705.
81. Kodedová M, Sychrová H. Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS One.* 2015;10(9):e0139306.
82. Daicho K, Makino N, Hiraki T, Ueno M, Uritani M, Abe F, et al. Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an erg2 yeast mutant. *FEMS Microbiol Lett.* septiembre de 2009;298(2):218-27.

83. Zhang null, Chung null, Oldenburg null. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*. 1999;4(2):67-73.
84. Brachmann CB, Davies A, Cost GJ, Caputo E, Li J, Hieter P, et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast Chichester Engl*. 30 de enero de 1998;14(2):115-32.
85. Gietz RD, Sugino A. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*. 30 de diciembre de 1988;74(2):527-34.
86. Fukata M, Fukata Y, Adesnik H, Nicoll RA, Brecht DS. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron*. 16 de diciembre de 2004;44(6):987-96.
87. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 15 de agosto de 1970;227(5259):680-5.
88. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. septiembre de 1979;76(9):4350-4.
89. Verstrepen KJ, Klis FM. Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol*. abril de 2006;60(1):5-15.
90. Van Mulders SE, Christianen E, Saerens SMG, Daenen L, Verbelen PJ, Willaert R, et al. Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*. marzo de 2009;9(2):178-90.



Durante la búsqueda de posibles inhibidores de Akr1 se identificó que la cepa JY99 transformada con el plásmido “iAkr1-12” floculaba. La floculación es el fenómeno mediante el cual las levaduras forman estructuras multicelulares complejas de agregación llamadas “flocs” (89,90). Como se puede ver en la Figura 30A la transformación de la cepa JY99 o de una cepa salvaje (WT) con el plásmido que expresa el péptido iAkr1-12 genera la formación de flocs (ejemplos marcados con un círculo lila).



**Figura 30. Efecto del péptido iAkr1-12.** A. Foto representativa del crecimiento en tubos de medio ensayo de una cepa salvaje (WT) transformada con vector vacío (EV) o con el péptido iAkr1-12 y de la cepa del ensayo JY99 transformada con el péptido iAkr1-12. Se observan en las cepas transformadas con el péptido un crecimiento aglomerado en flocs (ejemplos destacados con círculos lilas). B. Foto representativa del crecimiento en tubos de medio ensayo de una cepa salvaje (WT) transformada con vector vacío (EV) o con el péptido iAkr1-12 y de una cepa  $\Delta flo1$  transformada con el péptido iAkr1-12. Solo se observan flocs (ejemplo destacado con círculo lila) en la cepa salvaje transformada con el péptido. C. Secuencia aminoacídica del péptido y esquema ilustrativo de su estructura.



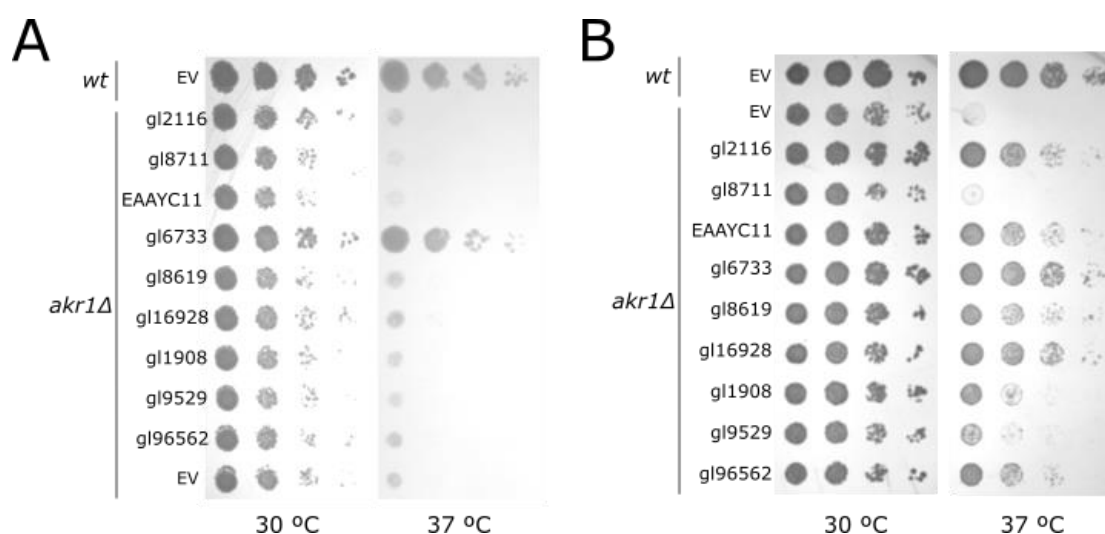
Las proteínas encargadas de la floculación son una familia de adhesinas de superficie llamadas proteínas Flo, *S. cerevisiae* posee 5, Flo1, Flo5, Flo9, Flo10 y Flo11. En cepas de laboratorio estas proteínas generalmente no se expresan ya que su activador transcripcional Flo8 contiene una mutación sin sentido, pero cuando se expresan, la que genera el fenotipo más fuerte de floculación es Flo1 (90). Para ver si la vía de las proteínas Flo estaba involucrada con el efecto que observábamos al expresar el péptido iAkr1-12 decidimos expresarlo en una cepa sin el gen que codifica para la proteína Flo1 ( $\Delta flo1$ ). Como se observa en la Figura 30B al expresar el péptido en esta cepa el mismo ya no induce floculación.

Este resultado parece indicar que el péptido de alguna manera estaría activando la vía de las proteínas Flo, puntualmente la proteína Flo1, ya que al eliminarla del genoma se pierde el fenotipo de floculación. Si la proteína Flo1 no estuviera relacionada al efecto observado su delección no debería generar cambios en el fenotipo cuando transformamos la cepa  $\Delta flo1$  y la misma se comportaría igual a la cepa salvaje.

Secuenciamos el plásmido del péptido iAkr1-12 y pudimos obtener la secuencia del péptido de interés (Figura 30C) que podría utilizarse en futuros ensayos ya que la floculación es muy utilizada en procesos de importancia biotecnológica. Particularmente se utiliza mucho en la industria de la cerveza y el vino para poder retirar las levaduras del fermento de una forma sencilla, ya que los flocs precipitan con facilidad (89).

## II. ESTUDIO DE LA COMPLEMENTACIÓN DE AKR1 POR LAS PATS DE *G. LAMBLIA*

Ensayo de complementación de la función de la PAT Akr1 por las 9 proteínas DHHC del parásito *G. lamblia*. Se evaluó la capacidad de crecer de una cepa de levadura que no posee la PAT Akr1 (BY4741  $\Delta akr1$ ) transformada con vector vacío o con vectores que expresan las DHHC del parásito a 30 °C (temperatura óptima de crecimiento) o a 37 °C. A altas temperaturas las cepas que no poseen la PAT Akr1 no pueden crecer, este fenotipo se revierte si alguna PAT complementa la función.



**Figura 31. Ensayo de complementación de función de la PAT Akr1.** A. Comparación de crecimiento a 30 y 37 °C de la cepa salvaje (*wt*) transformada con vector vacío con la cepa  $\Delta akr1$  transformada con vector vacío o con las DHHC de *G. lamblia* utilizando vectores de bajo número de copias. B. Comparación de crecimiento a 30 y 37 °C de la cepa salvaje (*wt*) transformada con vector vacío con la cepa  $\Delta akr1$  transformada con vector vacío o con las DHHC de *G. lamblia* utilizando vectores de alto número de copias.

La única PAT que complementa la función de la PAT Akr1 con vectores de bajo número de copia es gl\_6733, ya que la cepa  $\Delta akr1$  recupera la capacidad de crecimiento a 37 °C, mientras que la cepa con las otras PATs no pueden crecer, de manera similar a la cepa transformada con el vector vacío (Figura 31A).

Cuando se utilizan vectores de alto número de copias 8 de las 9 PATs complementan la función total o parcialmente (Figura 31B). Esto abre las posibilidades de trabajar con varias de estas PATs en el ensayo de búsqueda de inhibidores.

