



Gradu Amaierako Lana

Biokimika eta biologia molekularreko gradua

Neuronetako proteina palmitoilatuen detekzioa, identifikazioa eta ikusaraztea klik kimika bidez

Egilea:

Ainhoa Barberan Garai

Zuzendaria:

Xabier Contreras

AURKIBIDEA

SARRERA	1
HELBURUAK	3
MATERIALAK ETA METODOAK	3
1) Zelula-hazkuntza.....	3
2) Palmitoilatutako proteinen fluoreszentiaren neurketa gelean	3
2.1. Zelulen tratamendua	3
2.2. Zelulen apurketa eta proteinen lorpena.....	4
2.3. Klik kimika erreakzioa.....	4
2.4. Fluoreszentiaren neurketa gelean CHO-K1 eta 3T3 zeluletan.....	5
2.5. Argi infragorriaren neurketa neuronetan	5
2.5.1. Poliakrilamidazko gelean.....	5
2.5.2. PVDF mintzean.....	5
3) Palmitoilatutako proteinen aberastea masa espektrometriarako	5
3.1. Klik kimika erreakzioa	6
3.2. Immunoprezipitazioa	6
4) Palmitoilatutako proteinen ikusaraztea zeluletan	6
4.1. Zelulen tratamendua eta prestaketa.....	6
4.2. Klik kimika erreakzioa eta tindaketak	7
5) Lehiaketa saioa azido palmitikoarekin	7
EMAITZAK ETA EZTABAIDA	8
1) Palmitoilatutako proteinen azterketa CHO-K1 eta 3T3 zeluletan	8
1.1. Gelean	8
1.1.1. Palmitoilatutako proteinen detekzioa	8
1.1.2. Palmitoilatutako proteinen aberastea masa espektrometriarako	9
1.2. Fixatutako zeluletan	10
2) Palmitoilatutako proteinen azterketa neuronetan	11
2.1. Gelean	11
2.1.1. Palmitoilatutako proteinen detekzioa	11
2.1.2. Palmitoilatutako proteinen aberastea masa espektrometriarako	12
2.2. Fixatutako zeluletan	12
2.2.1. Proteina palmitoilatuen ikusaraztea	12
2.2.2. Lehiaketa saioa azido palmitikoarekin.....	13
ONDORIOAK	15
BIBLIOGRAFIA	15

SARRERA

2003. urtean giza genomaren sekuentziazioa plazaratu zenean, ikusi zen espero zirenak baino askoz gutxiago direla proteinak kodetzen dituzten geneak (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Gene kodetzaile kopuruak azaldu ezin dezakeen proteinen aniztasun funtzionala, besteak beste bi mekanismori esker lortzen da; transkripzio-mailan moztitsasketa alternatiboari esker eta itzulpen osteko eraldaketan bidez. Proteoma osoa ulertu ahal izateko, beraz, ezinbestekoa da bi prozesu horiek modu zehatzean ezagutzea eta deskribatzea. Itzulpen osteko eraldaketetan arreta jarritz, izenak berak dioen bezala proteinek sintetizatu ondoren jasaten dituzten aldaketa bezala defini daitezke. Itzulpen osteko eraldaketa ohikoenen artean talde funtzional ezberdinen lotura kobalenteak daude, gehienetan entzimen laguntzaz ematen direnak. Mota honetako eraldaketa arruntenak hurrengo hauek direla esan daiteke: fosforilazioa, glikosilazioa, ubikitinazioa, alkilazioa eta azilazioa. Horiez gain, itzulpen osteko eraldaketa bezala kontsideratzen dira egitura egokia lortzeko beharrezko beste zenbait aldaketa ere, hala nola, zenbait proteinak jasaten dituzten mozketak (Walsh et al., 2005).

Eraldaketa guzti hauek ondorio ezberdin ugari ekarri ditzakete, baina orokorrean proteinetan daukaten eraginaren arabera hiru talde handitan bana ditzakegu: proteinaren funtzio katalitikoan eragina daukatenak, zelula barneko kokapena aldatzen dutenak eta proteinak degradatuak izateko markatzen dituztenak. Sistema guzti hau kinasek, fosfatasek, transferasek, ligasek eta proteasek erregulatzen dute eta hauen funtzioaren garrantziaren adierazle bezala, uste da itzulpen osteko eraldaketak egiten dituzten entzimek proteomaren %5 ingurua osatzen dutela (Walsh et al., 2005). Horren sistema konplexua eta garrantzitsua izanik, pentsatzekoa da bertan ematen diren alterazioek askotariko ondorio kaltegarriak ekar ditzaketela. Hori frogatuz, asko dira itzulpen osteko eraldaketen desorekak eta patologiak erlazionatzen dituzten ebidentziak.

Itzulpen osteko eraldaketa lipidikoetan sartuz, zehazki azilazioetan, miristoilazioa (C14) eta palmitoilazioa (C16) dira arruntenak. Azken hau bereziki interesgarria da bere izaera dinamikoa dela eta; izan ere, itzulgarria den lipidazio bakarra da. Orokorrean palmitoilazioaren inguruan hitz egitean, S-palmitoilazioaz ari gara, hau da, DHHC lipido transferasek zisteinetan egiten duten azilazioaz. Hala ere, ikusi da proteina batzuk, hala nola hedgehog proteinak, amida lotura bidez palmitoilatu daitezkeela N-terminaleko zisteina batean, Hhat (*Hedgehog acyltransferase*) entzimen bidez (N-palmitoilazioa) (Pepinsky et al., 1998). S-palmitoilaziora bueltatuz, aurrez esan bezala, itzulgarria da tioester loturaren labiltasunagatik. APT1 eta 2 (*acyl protein thioesterases 1, 2*) eta PPT1 eta 2 (*Palmitoyl-protein thioesterases 1, 2*) dira tioester lotura horren apurketaz arduratzen diren entzimak (Duncan eta Gilman, 1998; Tomatis et al., 2010; Camp eta Hofmann, 1993).

Lipidazio guztietan bezala, palmitoaren loturak hidrofobizitatea ematen dio proteinari eta beraz palmitoilazioaren funtzio nagusietako eta arruntenetako bat proteina solugarrien

atxikipena mintzera bideratzea izango da. Hala ere, palmitoilazioaren efektuak mintzeko aingura soila izatetik haratago doaz. Izan ere, ikusi da beste eragin asko ere badituela, hala nola proteina-garraioan, proteinen egonkortasunean, proteinen mikrodomeinuetarako bideraketan eta proteina-proteina elkarrekintzetan (Resh, 2006; Greaves eta Chamberlain, 2007; Linder eta Deschenes, 2007). Mota askotako proteinek jasaten dute azilazio hau, baina talde ezagunen artean ondorengoak aipa ditzakegu: GTPasa txikien Ras superfamilia, GPCR-ak (*G-protein coupled receptor*) eta tirosina kinasa hartzaileak. Palmitoilazioak proteina hauen erregulazioan funtzio garrantzitsua betetzen du eta ondorioz, azilazio honen desorekak patologia ugariren sorrera eragin dezake. Esate baterako, ikusi da TEAD1-4 transkripzio faktoreen palmitoilazioak Hippo seinaleztapen bidezidorraren aktibazioa emendatzen duela. Bidezidor hau zelulen proliferazioaren eta heriotzaren erregulatuzailea izanik, gehiegizko aktibazioak edo desorekak minbizia sor dezake (Chan et al., 2016). Minbiziaz gain, beste zenbait patologiatan ere ikusi da palmitoilazioaren eragina, adibidez gaixotasun kardiobaskularretan (Lin et al., 2013), epilepsian (Baker et al., 2015) eta zenbait gaixotasun neurodegeneratibotan (Cho eta Park, 2016). Horren prozesu garrantzitsua izan arren, oraindik asko dira palmitoilazioaren mekanismoari, funtzioei eta substratuei buruz argitu beharreko kontuak.

Palmitoilazioaren inguruan egindako zenbait ikerketek erakutsi dute funtzio bereziki garrantzitsuak betetzen dituela giza burmuinean. Garapenean zehar neuriten hazkuntzarako, axoiek beraien bidea aurkitzeko eta neuronen desberdintzapenerako garrantzitsua dela ikusi da. Heldutasunean, ordea, hainbat proteina sinaptikoren palmitoilazioak neurotransmisioa erregulatu duela frogatu da (El-Husseini eta Brecht, 2002). Azkenaldian pil-pilean dagoen gaia da giza burmuinaren deskribapen zehatz eta osoa egitearena, Giza Burmuinaren Proiektuak (Europa), BRAIN ekimenak (Ameriketako Estatu Batuak) eta Brain/MINDS-ek (Japonia) ondo erakusten duten bezala. Palmitoilazioak daukan garrantzia eta gainera burmuina ulertzeko dagoen interes handia ikusita, lan honetan bi ideia horiek uztartzen saiatuko gara eta horretarako, neuronak erabiliko ditugu azilazio honen azterketa egiteko.

Badaude zenbait faktore palmitoilomaren azterketa zailtzen dutenak, besteak beste loturaren itzulgarritasuna, hidrofobizitatea eta palmitoilatutako proteinen urritasuna. Tipikoki isotopo erradiaktiboak erabili dira lipidoak markatu eta hauek aztertu ahal izateko, baina ezagunak dira erradiaktibitatearekin lan egitearen arazoak; hala nola, segurtasun neurri zorrotzen beharra, gastu ekonomiko handia eta esperimentu oso luzeak. Gaur egun, bi dira nagusiki erabiltzen diren hurbilketak: zisteinetan zentratutakoa eta lipidoetan zentratutakoa (Peng et al., 2016). Azken honek palmitoilazio dinamiko aztertzeko aukera ematen du eta horregatik estrategia hau izan da lan honetarako aukeratutakoa. Hurbilketa honek zelulak azida edo alkino taldea daukaten gantz-azidoekin tratatzean datza. Tratamendu ostean klik kimikaz baliatuz gantz-azidoen talde osagarria (azida edo alkinoa) daukaten erreportariak gehitu daitezke, modu espezifikoan palmitoilatutako proteinetara lotuko direnak. Zenbait ikerketek erakutsi dute gantz-

azido analogo alkinoak hobeak direla azidak baino; izan ere, karbono katearen hidrofobizitatea mantentzen dute eta horrela, emaitza positibo faltsu asko ekiditen dira (Charron et al., 2008). Hori dela eta, lan honetan ω -alkinil azido palmitikoa erabiliko da palmitoilomaren azterketa egiteko.

HELBURUAK

Lan honen helburua klik kimika bidez neuronetako palmitoilazio prozesua modu ezberdinetan aztertzea ahalbidetzen duten protokoloen garapena da. Alde batetik, proteoma osoa edukita proteina palmitoilatuak detektatzeko ahalegina egingo da. Detekzio honetatik palmitoilazio-patroiak lortu ahalko lirateke, prozesua dinamikoa izanik erabilgarria izan daitekeena egoera ezberdinetan palmitoilomaren irudi orokor bat edukitzeko. Bestalde, palmitoilatutako proteinen aberastea lortu nahi da, hauek gero masa espektrometria analisi bidez identifikatuak izan ahal izateko. Amaitzeko, neuronetako palmitoiloma mikroskopio bidez zuzenean ikusten saiatuko gara. Lan honen irismenetik kanpo gelditu arren, espero da lortu nahi diren emaitzak palmitoilazioa *in vivo* aztertzeko modu erraz eta fidagarri baten aurrekariak ere izango direla.

Protokolo hauen garapenarekin eta jada eskuragarri dauden teknika eta tresnak erabiliz, oraindik neuronetako palmitoilazioaren inguruan argitzeke dauden kontuak aztertu ahalko lirateke. Honek aurrerapen handia suposatuko luke; izan ere, egoera fisiologikoan gertatzen den guztia ulertzeko gai baldin bagara, errazagoa izango da baldintza patologikoak ulertu eta beraien kontra egitea.

MATERIALAK ETA METODOAK

1) Zelula-hazkuntza:

Erabilitako zelula-lerroak arratoi-enbrioien kortexeko neuronak, CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary- K1*) zelula epitelialak eta 3T3 fibroblastoak izan ziren. Neuronak UPV/EHU-ko Neurozientzien departamentuko animaliategitik lortu ziren CHO-K1 eta 3T3-ak hazteko DMEM/F12 medioa (Life Technologies, Ameriketako Estatu Batuak, AEB) erabili zen, %10 FBS (*Fetal Bovine Serum*), 10ml/L penizilina-streptomizina (Life Technologies) eta 6mM glutamina (Thermo Fisher Scientific, AEB) gehituta. Neuronak mantentzeko, ordea, B27 eta antibiotikodun medio neurobasala (Life Technologies) erabili zen. Neuronen hazkuntzako laugarren egunean glia zelulen inhibitzailea den ARA-C (*Arabinosilzitosina*, Sigma-Aldrich, AEB) 20 μ M gehitu zitzaion. Zelula guztiak 37°C-tan eta %5-eko CO₂ baldintzatan mantendu ziren inkubagailuetan.

2) Palmitoilatutako proteinen fluoreszentiaren neurketa gelean

2.1. Zelulen tratamendua

CHO-K1 eta 3T3 zelulak tratamenduaren aurreko egunean 10 cm-tako Petri plaketan erein ziren (T75 botiletatik), hurrengo egunean %70-80 arteko konfluentzia izateko diluzioa eginez. Neuronak, aldiz, plaka berdinetan mantendu ziren, edozein aldaketarekiko sentikorragoak baitira. Tratamendu egunean zelulak azido palmitikoaren analogoa den ω -alkinil azido palmitikoaren 50 μ M-ekin tratatu ziren. Lan honetan ω -alkinil azido palmitikoari palmitoil-alkino bezala egingo zaio errferentzia. CHO-K1 eta 3T3 zeluletan tratamendua lipidorik gabeko medio berriarekin egin zen, gantz-azidoaren sarrera zeluletara errazte aldera. Neuronetan, ordea, beraien hazkuntza-medioan bertan gehitu zen tratamendua. Zelula-lerro guztietako kontrol-plakei etanola gehitu zitzaien alkinoaren kantitate berdinean. Neuronak tratamendua jarri eta bi denbora ezberdinetan jaso ziren: 6 orduz eta gau osoan zehar egon ondoren (*overnight*, 16-20h).

2.2. Zelulen apurketa eta proteinen lorpena

Zelulak apurtzeko, plaka bakoitza 5ml PBS-rekin (*Phosphate Buffered Saline*-ekin) garbitu ondoren, 500 μ l apurketa-soluziorekin (PBS %1 Triton eta %1 SDS-rekin, pH=7.4) mantendu zen 15 minutuz gela tenperaturan. Disoluzio horri proteasa-inhibitzaile koktela (100X) eta DNasa I (*Deoxyribonucleasa I from bovine pancreas*, Sigma) ere gehitu zitzaion. Apurketaren ondoren, plakaren gainazaleko zelulak harraskatu ziren, helburu horretarako diseinatua dagoen gailua erabiliz. Eppendorfetan jaso ostean, lagin bakoitza bi aldiz pasarazi zen 1.2mm eta 0.6mm-ko diametrodun orratzetatik, 1ml-ko xiringak erabiliz. Gero, laginak 16000 g-tara zentrifugatu ziren 10 minutuz eta gain-jalkinak soilik jaso, jalkinean material solugaitza gelditzen baita. Proteina guztiak prezipitatzeko Wessel eta Flüggek (1984) deskribatutako kloroformo/metanol protokoloa erabili zen. Azken pausuan, metanol hotzarekin garbiketa bat gehitu zitzaion protokoloari, jalkin garbiagoa lortzeko. Prezipitazioaren jalkinak 37°C-tan lehortu ziren, metanol arrasto guztiak kentzeko. Azkenik, jalkinak PBS+%1 SDS disoluzioaren 0.5-1ml-tan birsuspenditu ziren. Horretarako, nahasteak zenbaitetan 70°C-tan 10 minutuz berotu eta 70°C-tan 15 minutuz bainuan sonikatu ziren.

2.3. Klik kimika erreakzioa

Klik kimika erreakzioa 50 μ g proteinarekin egin zen. Birsuspenditutako laginetik proteina kantitatea kuantifikatzeko BCA (*bicinchoninic acid*) metodoa erabili zen (Thermo Fisher Scientific), fabrikatzailearen argibideak jarraituz eta laginen 1:5 diluzioa eginez. 50 μ g horietako proteina palmitoilatuak markatzeko lehenik talde azidadun fluoroforoaren 50 μ M eta gero, ondorengo ordena eta kontzentrazioan erreaktibo hauek gehitu ziren: 1mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Scharlau) H_2O -n disolbatuta, 0.2 mM TBTA (Sigma-Aldrich) DMSO-n eta 1mM TCEP (Sigma-Aldrich) H_2O -n. CHO-K1 eta 3T3 zeluletan erabilitako azidadun zunda Alexa Fluor™ 488-N₃ (Thermo Fisher Scientific) izan zen eta neuronetan, ordea, IRDye® 800 CW-N₃ (Li-cor Biosciences, AEB). 30-100 μ l-ko erreakzio bolumenean (saioaren arabera) nahastea 37°C-tan

inkubatu zen ordu betez. Zelula-mota bakoitzean 50 µg proteinari ez zitzaion klik kimika egin, beste kontrol bat izateko.

Klik kimika erreakzioa bukatu ondoren proteinen prezipitazioa egin zen berriz, aurrez aipatutako kloroformo/metanol protokolo bera erabiliz, errektiboak eta lotu gabeko fluoroforoa alde batera uzteko. Lehortutako laginak lisirako erabilitako soluzioaren 20-40µl-tan birsuspenditu ziren, lehenago aipatutako beroketa eta sonikazio pausu berdinak jarraituz.

2.4. Fluoreszentziaren neurketa gelean (Alexa Fluor™ 488-N₃) CHO-K1 eta 3T3 zeluletan

Karga-soluzioa (Tris HCl 0.5M pH=6.8, %45glizerola, %10 SDS, %0.03 bromofenol urdina, %12 β-merkaptotetanola) 3 aldiz diluituta egoteko kalkuluak egin ziren. Behin nahasteak eginda, laginak 95°C-tan 5 minutuz desnaturalizatu eta %10 SDS-PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*) gelean migrarazi ziren 170V-tan. Gelaren fluoreszentzia Molecular Imager VersaDoc™ MP 4000 System (Bio-rad Laboratories, AEB) gailuaren bidez detektatu zen 525nm-tan. Bukatzeko, geleko proteina guztiak Coomassie urdinaren tindaketa bidez aztertu ziren Gel-doc EZ Imager (Bio-rad Laboratories) gailuan.

2.5. Argi infragorriaren neurketa (IRDye® 800 CW-N₃) neuronetan

2.5.1.Poliakrilamidazko gelean

Palmitoil-alkinoaren tratamendua gau osoan zehar (16-20h) jaso zuten neuronetan estrategia hau jarraitu zen. 2.4. atalean azaldutako pausu berdinak jarraitu ziren, baina gela Molecular Imager VersaDoc™ gailuan aztertu beharrean, Odyssey® CLx (Li-cor Biosciences) aparatuan behatu zen, azken honek gertuko argi infragorria detektatu baitezake. 800nm-tan neurtu zen gelaren emisioa, 169 µM-ko bereizmena eta 0.5 mm-ko foku-konpentsazioa ezarrita. Amaitzeko, geleko proteina guztiak Coomassie urdinaren tindaketa bidez aztertu ziren Gel-doc EZ Imager gailuan.

2.5.2.PVDF mintzean

Palmitoil-alkinoaren tratamendua 6 orduz jaso zuten neuronetan jarraitu zen estrategia hau. Poliakrilamidazko gelaren lorpena arte 2.4 eta 2.5.1 ataletako prozedura berdina jarraitu zen. Ondoren, gela Immobilon-FL PVDF mintz batera (Merck Millipore, AEB) transferitu zen. Azkenik, mintzaren emisioa 800nm-tan detektatu zen Odyssey® CLx gailuan, 169 µM-ko bereizmena eta 0.75 mm-ko foku-konpentsazioa ezarrita.

3) Palmitoilatutako proteinen aberastea masa espektrometriarako

Palmitoilatutako proteinen aberastea 3T3 zeluletan eta neuronetan, 6 orduz eta gau osoan alkinoarekin tratamendua jaso zutenetan, gauzatu zen. Tratamendua eta baita laginetako proteinen lorpena aurrez azaldu bezala (2.1 eta 2.2 atalak) egin ziren.

3.1. Klik kimika erreakzioa

Klik kimika erreakziorako 3T3 zeluletan 0.5 mg proteina eta neuronetan 1 mg erabili ziren. Kontzentrazioaren kuantifikazioa BCA metodoa fabrikatzailearen argibidepean erabiliz eta laginen 1:5 diluzioa eginez burutu zen. Erreakziorako talde azidadun zunda TAMRA-biotina-N₃ (Jena Biosciences, Alemania) izan zen, 100µM-eko kontzentrazioan. Erreakzioa gauzatzeko ondorengo ordena eta kontzentrazioan erreaktibo hauek gehitu ziren: 1mM CuSO₄·5H₂O H₂O-n disolbatuta, 0.2 mM TBTA DMSO-n eta 1mM TCEP H₂O-n. Eppendorfak 37°C-tan mantendu ziren ordu betez 350 rpm-tan (*revolutions per minute*-etan). Zelula-mota bakoitzeko lagin banari ez zitzaion klik kimika erreakzioa egin, kontrol bezala. Erreakzioa bukatu ondoren proteinen prezipitazioa egin zen berriz, aurrez aipatutako kloroformo/metanol protokolo bera erabiliz. Jalkinak lisi-soluzioaren 200-500 µl-tan birsuspenditu ziren, 30 minutuz 70°C-tan berotuz eta 25 minutuz 70°C-tan bainuan sonikatuz; pausu hauek behar beste alditan errepikatu ziren jalkina guztiz disolbatu arte.

3.2. Immunoprezipitazioa

Immunoprezipitaziorako, Pierce™ High Capacity NeutrAvidin™ Agarose bihitxoan (Thermo Fisher Scientific) 50-100 µl hartu (laginaren bolumenaren arabera) eta lisi-soluzioaren 800 µl-rekin garbitu ziren 3 aldiz; garbiketa bakoitzean bihitxoak 3000g-tara 3 minutuz 4°C-tan zentrifugatu. Gero, proteina lagin bakoitzari proteasa-inhibitzaile koktela (100X) gehitu zitzaion eta soluzioa bihitxoekin inkubatu zen errotazio-gailuan, 2 orduz gela tenperaturan edo gau osoan zehar 4°C-tara. Denbora hori igarota, eppendorfak 3000g-tara 5 minutuz eta 4°C-tan zentrifugatu ziren, bihitxoak, palmitoilatutako proteinei kobalenteki lotuak, hauspeatu zitezten. Bihitxo jalkin bakoitza 5 aldiz garbitu zen apurketa-soluzioarekin, 3000g-tara 3 minutuz 4°C-tan zentrifugatu. Azken garbiketa egitean bihitxoei 30-50µl karga-soluzio gehitu zitzaion eta 5 minutuz likidoari jalkitzen utzi ostean, 5 minutuz 95°C-tan desnaturalizazioa egin zen.

Amaitzeko, immunoprezipitazio aurretik hartutako hasierako laginak (*input-a*) eta immunoprezipitazio ondorengo gain-jalkinetik hartutakoak 5 minutuz 95°C-tan desnaturalizatu ziren karga-soluzioarekin eta immunoprezipitatuarekin batera %10 SDS-PAGE gelean migrarazi. Gelaren fluoreszentzia Molecular Imager VersaDoc™ MP 4000 System (Bio-rad Laboratories) gailuaren bidez detektatu zen. Geleko proteina guztiak Coomassie urdinaren tindaketa bidez aztertu ziren Gel-doc EZ Imager gailuan.

4) Palmitoilatutako proteinen ikusaraztea zeluletan

4.1. Zelulen tratamendua eta prestaketa

80 000 3T3 zelula/platereko eta 150 000 CHO-K1 zelula/platereko erein ziren 35 mm-ko diametrodun µ-plater altuetan (IBIDI). Neuronen kasuan, 300 000 neurona erein ziren 24 putzutxodun µ-plakako (IBIDI) putzutxo bakoitzean. Zelula-mota guztiak 50 µM palmitoil-

alkinorekin tratatu eta denbora ezberdinetan jaso ziren; 6 ordutara eta gau osoaren ondoren (16-20h). Neuronei 50 μM -eko tratamenduaz gain, 20 μM eta 30 μM -ekoa ere eman zitzairen, kontzentrazioaren eragina ikusteko.

Zelulak finkatu eta iragazkortzeko metanol hotza (-20°C) gehitu zitzairen eta 7 minutuz mantendu. PBS-arekin. 3 aldiz plakak eta putzutxoak garbitu ondoren, lipidoen erauzketa egin zen. Horretarako erauzketarako soluzioarekin (%55 MeOH, %10 CHCl_3 eta %0.75 azido azetiko) 4 inkubazio egin ziren; lehena azkarra eta beste hirurak minutu batekoak. Prestaketa bukatzeko, PBS-arekin bi aldiz garbitu ziren zelulak.

4.2. Klik kimika erreakzioa eta tindaketak

Proteina palmitoilatuak markatzeko klik kimika erreakzioa ondorengo erreaktibo eta kontzentrazioekin egin zen: 5 μM Cy3-Sulfo- N_3 (Jena Biosciences), 1mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ H_2O -n, 0.1mM azido askorbiko (Sharlau) eta 100 mM TRIS-HCl, putzutxo eta plater bakoitzean 1 ml jarrita. Erreakzioa gela tenperaturan eman zen ordu betez. Platerak eta putzutxoak 3 aldiz garbitu ziren PBS-arekin. Ondoren, nukleoak tindatu ziren 1.5 μM Hoechst-ekin (PBS-n) (Invitrogen), 10 minutuz gela-tenperaturan. Azkenik, PBS-arekin 3 garbiketa egin ziren. 24 putzutxotako plakako *coverslips*-ak ProLong Gold itsasgarriarekin (Life Technologies) portetan itsatsi eta lehortzen utzi ziren, mikroskopia ikusi ahal izateko. Lagin guztien fluoreszentiaren bisualizazioa Zeiss Axio Observe ApoTome 2 mikroskopia konfokalean egin zen UPV/EHU-ko SGiker mikroskopiako zerbitzu orokorrean.

5) Azido palmitikoarekin lehiaketa saioa neuronetan

300 000 neurona/putzutxoko erein ziren 24 putzutxodun plakan. Lehiaketa saioa egiteko, neuronak 50 μM palmitoil-alkinorekin tratatu ziren eta aldi berean azido palmitiko endogenoaren kontzentrazio desberdinak ere gehitu zitzaizkien: 0 μM , 200 μM , 1mM, 5mM, 10mM eta 25mM (2 erreplika kontzentrazio bakoitzerako). Azido palmitikoa etanolean disolbatu zen 60°C -tan. Kontrol negatibo bezala 2 putzutxotan neuronak ez ziren ez palmitoil-alkinoarekin ezta azido palmitiko endogenoarekin ere tratatu.

Zelulen finkapena, iragazkortzea, lipidoen erauzketa, klik kimika erreakzioa eta tindaketak aurrez azaldu bezala (4. atala) egin ziren. Kasu honetan ere, *coverslips*-ak portetan itsatsi eta Zeiss Axio Observe ApoTome 2 mikroskopia konfokalean hartu ziren irudiak.

EMAITZAK ETA EZTABAIDA

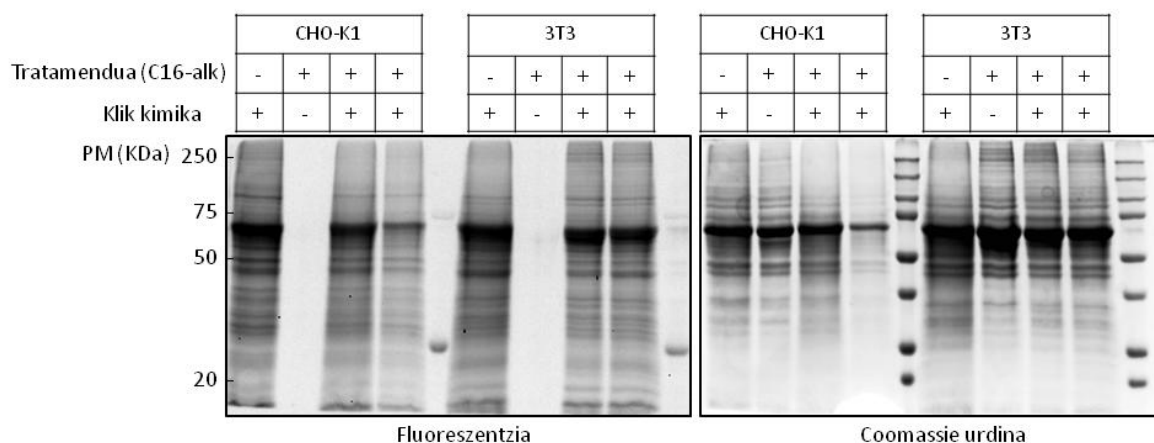
1) Palmitoilatutako proteinen azterketa CHO-K1 eta 3T3 zeluletan (Kontzeptuaren frogapena)

Neuronetan esperimentuak egiten hasi baino lehen, protokolo ezberdinak CHO eta 3T3 zeluletan probatu genituen. Zelula hauetan lortutako emaitzez baliatuz neuronon azterketarako protokoloa optimizatzeko gai izan ginen.

1.1. Gelean

1.1.1.Palmitoilatutako proteinen detekzioa

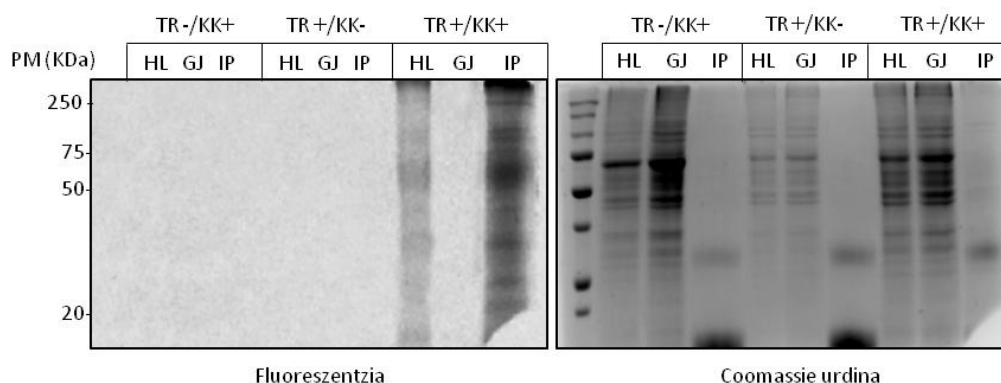
Palmitoil-alkinoarekin tratatutako CHO-K1 eta 3T3 zelulen proteinak Alexa Fluor 488-N₃-rekin markatu ziren klik kimika erreakzio bitartez. Fluoreszentziaren irudian ikus daitekeen bezala, esperimentu hau ez zen arrakastatsua izan palmitoilatutako proteinak modu espezifikoan detektatzeko (**1. irudia**). Izan ere, alkinoarekin tratatutako eta ez tratatutako (etanolarekin) laginek fluoreszentzia-intentsitate oso antzekoa erakusten dute, proteina kantitate aldetik konparagarriak izan arren. Kontrol negatiboa tratamendudun laginaren berdina izateak erakusten du Alexa Fluor 488-N₃ modu ez-espezifikoan lotu zela proteinetara. Honen arrazoia talde azidadun zunda zaharkitua zegoela izan daiteke eta ondorioz, alkinoarekin triazola sortu beharrean bestelako elkarrekintzak egiten dituen degradazio produktuak eman zituela. Literaturan badauden arren Alexa Fluor 488- N₃ erabiliz egindako lanak, gure laborategian geneukan produktuarekin lortutako emaitzak ikusita, neuronetan beste azidadun zunda bat erabiltzeko erabakia hartu genuen. Bestalde, proba bat egin zen laginak gelean kargatu aurretik egindako desnaturalizazioak zeukan eragina ikusteko, tratamendua eta erreakzioa jasotako lagin bat desnaturalizatuz eta bestea zuzenean kargatuz. Bien arteko desberdintasun esanguratsuen proteinak kantitatea da, desnaturalizatu gabeko laginean proteina gutxiago zegoela ikus baitaiteke. Ziurrenik BCA metodoaren erroreagatik edo prozesuan zehar galdu izanagatik sortu zen ezberdintasun hau, baina badaezpada ere, esperimentu honetatik aurrera lagin guztiak beroa erabiliz desnaturalizatu ziren gelean kargatuak izan aurretik.



1. irudia. Palmitoilatutako proteinen detekzioa Alexa Fluor 488-N₃ bidez. Ezkerreko irudian %10 poliakrilamidazko gelaren fluoreszentzia eta eskuinean, Coomassie tindaketaz egindako karga-kontrola. Kontrol bezala lagin bati 50µM palmitoi-alkino tratamendua beharrea etanola eman zitzaion eta beste bati tratamendua eman arren ez zitzaion klik kimika erreakzioa egin. Tratamendua eta erreakzioa jaso zuten laginetan (+/+), ezkerretik hasitako lehenengoak 95°C-tan 5 minutuz desnaturalizatu ziren eta bigarrenak ez.

1.1.2. Palmitoilatutako proteinen aberastea masa espektrometriarako

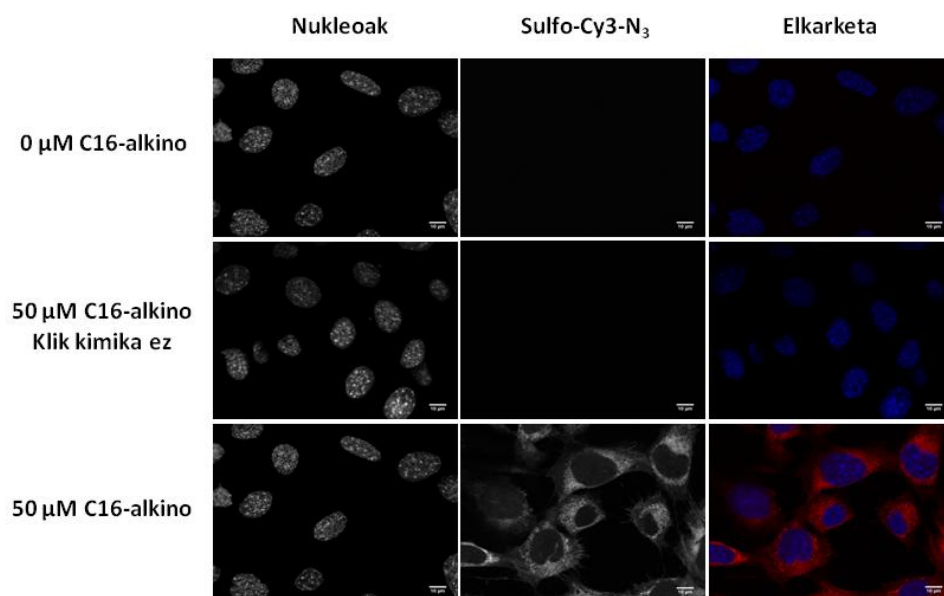
Immunoprezipitazio bidez aurretik TAMRA-biotina-N₃-rekin markatutako proteinak aberastu ziren. Immunoprezipitazio honen emaitzek erakusten dute jarraitutako protokoloa erabilgarria eta egokia dela palmitoilatutako proteinak isolatzeko. Izan ere, palmitoil-alkinoarekin tratatu gabeko laginean ez da fluoreszentziarik detektatu eta tratatutakoan, ordea, bai (**2. irudia**). Honek erakusten du TAMRA-biotina-N₃ zundak modu espezifikoan elkareragiten duela alkino taldea daukaten molekulekin, kasu honetan palmitoil-alkinoarekin. Nahiz eta fluoreszentziaren seinalea nabarmena izan, coomassie tindaketaren irudian ikus daiteke immunoprezipitatu oso proteina gutxi zeudela (**2. irudia**). Hori dela eta, neuronen saioa egiteko 0.5 mg proteina beharrea 1 mg erabiltzeko erabakia hartu zen esperimendu honen ondoren. Hala ere, esperotako emaitzak ziren; izan ere, jakina da palmitoilatutako proteinak ez direla oso ugariak.



2. irudia. Palmitoilatutako proteinen aberastea immunoprezipitazio bidez. Palmitoil-alkinorekin tratatutako zelulak apurtu ondoren TAMRA-biotina- N₃-rekin markatu ziren eta immunoprezipitazio bidez hauspeatu. Kontrolatuko bati ez zitzaion tratamendua eman (etanola) eta besteari ez zitzaion klik kimika erreakzioa egin. TR= 50 µM palmitoil-alkinorekin tratamendua; KK= Klik kimika erreakzioa; HL= Hasierako lagina (immunoprezipitatu aurretik, *input*); GJ= Gain-jalkina (immunoprezipitazio ondoren); IP= Immunoprezipitatu. Ezkerreko irudian %10 poliakrilamidazko gelaren fluoreszentzia eta eskuinean, Coomassie tindaketaz egindako karga-kontrola.

1.2. Fixatutako zeluletan

Fixatutako zeluletan proteina palmitoilatuak markatzeko jarraitutako protokoloa egokia dela frogatzen dute lortutako emaitzek (**3. irudia**). Izan ere, bi kontroletan, tratamendua jaso ez duten zeluletan eta tratamendua jaso bai, baina klik kimika erreakzioa egin ez zitzaienten zeluletan, ez da inolako fluoreszentiarik ikusten. Palmitoil-alkinoarekin tratatu eta klik kimika bidez Sulfo-Cy3-N₃-rekin markatutakoetan, ordea, seinale fluoreszente nabarmena ikus daiteke. Lipidoen erauzketa egin zenez, badakigu seinalea palmitoilatutako proteinei soilik dagokiela eta ez azido palmitikoa daukaten triazilglizerido edo bestelako lipidoei. Argazkia hartu zen momentuan, palmitoilatutako proteina gehienak nukleoaren inguruan aurkitzen direla erraz ikus daiteke irudian. Hau esperotako emaitza da; izan ere, jakina da erretikulu endoplasmatikoko pikortsuak eta Golgik osatutako sistema arduratzen dela proteinen palmitoilazioaz (Ohno et al., 2006). Irudiko fluoreszentiaren kokapena, beraz, bat dator zelulako barne-mintzen sistemaren kokalekuarekin. Horrez gain, zelularen profila markatuz ere ikus daiteke fluoreszentzia, zelula-mintzean proteina palmitoilatuak daudela adierazten diguna. Hau ere bat dator aurrez genekienarekin, ezaguna baita palmitoilatutako proteinen gehiengoa zelularen mintzean aurkitzen dela (Salaun et al., 2010). Gau osoan zehar tratatutako 3T3 zeluletako emaitzak soilik erakutsi arren, sei orduz tratatutako 3T3-etan eta CHO-K1 zeluletan (6 orduz tratatuak eta gau osoan zehar) egindako esperimentuetan ondorio berdinetara iritsi ginen. Emaitza positibo hauek ikusita, neuronekin prozedura berdina jarraitzeko erabakia hartu genuen.



3. irudia. Proteina palmitoilatuen bistaratzea finkatutako 3T3 zeluletan. Palmitoil-alkinoarekin tratatutako zelulei sulfo-Cy3-N₃ gehitu zitzaienten klik kimika erreakzio bidez. Kontrol bezala zelula batzuei 50 μ M palmitoil-alkino tratamendua beharrean etanola eman zitzaienten eta beste batzuei tratamendua eman arren ez zitzaienten klik kimika erreakzioa egin. Gorriz proteina palmitoilatuak (sulfo-Cy3-N₃) eta urdinez nukleoak (Hoechst). Eskala-barra 10 μ m.

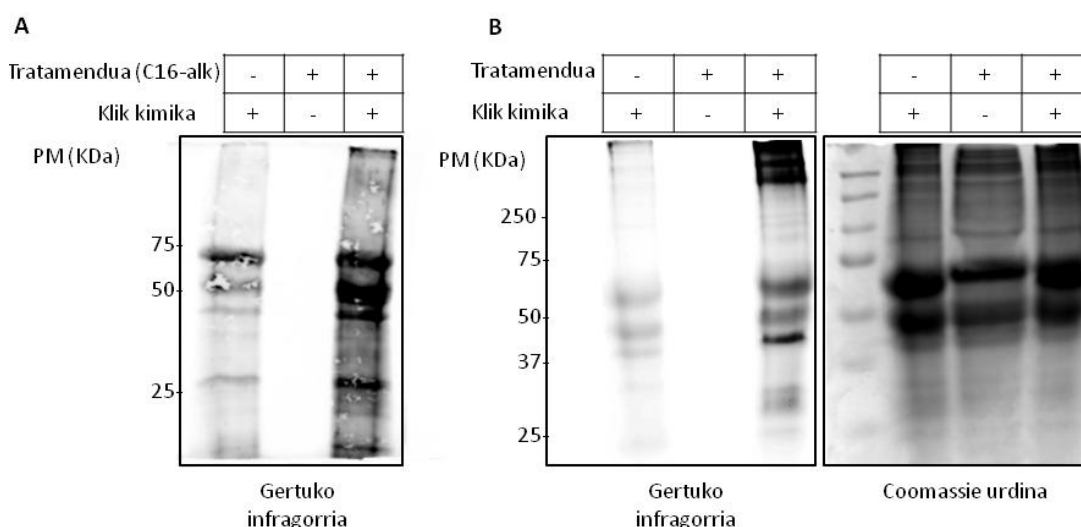
2) Palmitoilatutako proteinen azterketa neuronetan

2.1. Gelean edo mintzean

2.1.1. Palmitoilatutako proteinen detekzioa

Alexa Fluor 488-N₃ erabili beharrean klik kimika IRDye-N₃-rekin eginez, neuronetan palmitoilatutako proteinak modu espezifikoagoan detektatzea lortu genuen, PDVF mintzean eta gelean eskuratutako emaitzek erakusten duten bezala (**4. irudia**). Bai mintzean neurtutako argi infragorriaren emisioak (**4.A irudia**) eta baita gelean neurtutakoak ere (**4.B irudia**) erakusten dute lehenengo kontrol negatiboan, neurri askoz txikiagoan bada ere, IR-dye-N₃-a dagoela. Badirudi zundaren lotura ez-espezifiko hau lotuta egon daitekeela proteina kantitatearekin. Izan ere, 4.B irudian argi ikusten da kontrolean seinale infragorria ematen duten hiru banda lodienak bat datozela proteina gehien aurkitzen diren bandekin (37 eta 75 KDa artean).

Aipatzekoa da poliakrilamidazko gela Odyssey CLx gailuan enfokatzeko izandako zailtasuna. Gailuaren protokoloaren argibideak jarraituz (Odyssey CLx Operator's manual, 14) foku-kompentsazioa gelaren lodieraren erdian ezarri genuen, kasu honetan 0.75 mm-tan, baina ez ginen gela enfokatzeko gai izan, beste saiakera batzuk eginda ere. Enfokatzeko arazo honengatik eta PDVF mintzaren bereizmen nahiko baxuagatik, ez da oso nabarmena inkubazio-denboraren eragina palmitoilatutako proteinengan. Hala ere, sei orduz tratamendua jasotako neuronetan (mintzean, **4.A irudia**) badaude tratamendua gau osoan zehar jaso duten neuronetan (gelean, **4.B irudia**) ez dauden bandak eta alderantziz. Honek bat egiten du jakina den bezala palmitoilazio prozesua dinamikoa den ideiarekin, hau da, palmitoilatutako proteinak denboran zehar aldatzen doazen ideiarekin (Salaun et al., 2010).

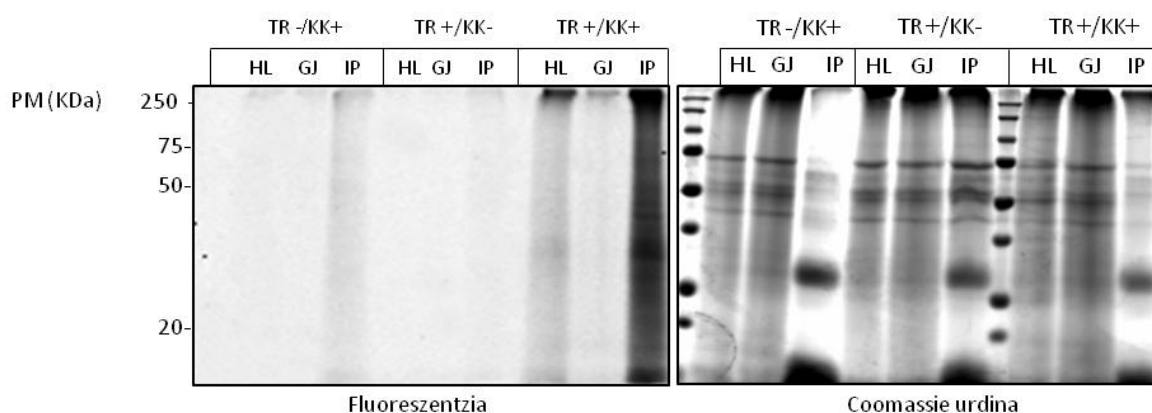


4. irudia. Palmitoilatutako proteinen detekzioa IR-dye 800 CW bidez. Neuronak palmitoil-alkinoarekin tratatu eta apurtu ostean IR-dye 800 CW-rekin markatu ziren. Kontrol bezala zelula batzuei 50µM palmitoil-alkino tratamendua beharrean etanola eman zitzairen eta beste batzuei tratamendua eman arren ez zitzairen klik kimika erreakzioa egin. **(A)** 6 orduz tratatutako neuronetan, markatutako proteinen emisio infragorria mintzean. **(B)** 16-20 orduz tratatutako neuronetan, markatutako proteinen emisio infragorria %10 poliakrilamidazko gelean (ezkerrean) eta karga-kontrola eskuinean.

2.1.2. Palmitoilatutako proteinen aberastea masa espektrometriarako

Esperimentu honekin balioztatu da jarraitutako protokoloa, TAMRA-biotina- N_3 markaketarekin eta honen osteko immunoprezipitazioarekin, baliogarria dela neuronetako proteina palmitoilatuak ere aberasteko (**5. irudia**). Izan ere, tratamendua eta klik kimika erreakzioa jasotako laginean, hasierako laginean (*input*-ean) eta immunoprezipitatuaren soilik ikus daiteke seinalea. Lehenengo kontrol negatiboak detektatutako seinale hori espezifikoa dela bermatzen du, bere intentsitatea oso baxua baita. Lan honetan gau osoan zehar tratamendua jasotako neuronan emaitzak soilik agertu arren, sei orduz jaso zutenetan emaitza oso antzekoak lortu ziren.

Esperimentu honen hurrengo pausua emaitzak masa espektrometria bidezko azterketa egitera bidaltzea izango litzateke, hau da, palmitoilatutako proteinak identifikatzea. Immunoprezipitazio bidezko aberaste honek kantitate txikitik aurkitzen diren proteinen identifikazioa ahalbidetzen du, lehenago erabiltzen ziren teknikek ez bezala. Izan ere, markaketa soilak eginez proteinak masa espektrometrorara bidaliz gero, asko eta asko ez lirateke aztertuak eta ondorioz identifikatuak izango beraien urritasunagatik. Tratamendua jasotako laginetik identifikatutako proteinak tratamendua jaso ez dutenarekin konparatu beharko lirateke eta bat egiten badute, proteina palmitoilatuaren zerrendatik kendu.



5. irudia. Palmitoilatutako proteinen aberastea neuronetan immunoprezipitazio bidez. Palmitoil-alkinoarekin tratatutako 3T3 zelulak apurtu ondoren TAMRA-biotina- N_3 -rekin markatu ziren eta immunoprezipitazio bidez "arrantzatu". Kontrolerako bati ez zitzaion tratamendua eman (etanola) eta besteari ez zitzaion klik kimika erreakzioa egin. TR= 50 μ M palmitoil-alkinorekin tratamendua; KK= Klik kimika erreakzioa; HL= Hasierako lagina (immunoprezipitatu aurretik, *input*); GJ= Gainjalkina (immunoprezipitazio ondoren); IP= Immunoprezipitatu. Ezkerreko irudian %10 poliakrilamidazko gelaren fluoreszentzia eta eskuinean, Coomassie tindaketaz egindako karga-kontrola.

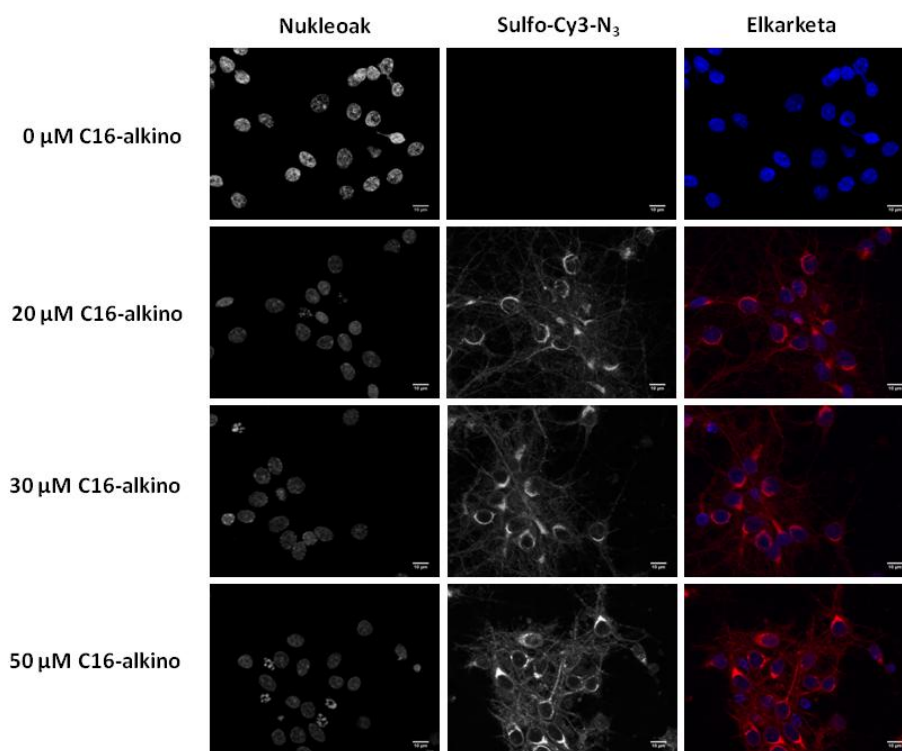
2.2. Fixatutako zeluletan

2.2.1. Proteina palmitoilatuaren ikusaraztea

3T3 eta CHO-K1 zeluletan jarraitutako protokolo bera neuronetarako ere erabilgarria dela berresten dute lortutako emaitzek eta baita palmitoil-alkino tratamenduaren kontzentrazio

egokiena 50 μM -ekoa dela ere (**6. irudia**). Izan ere, tratamendua jaso ez duten zeluletan ez da inolako fluoreszentiarik detektatu, zundaren lotura alkinoarekiko espezifikoa dela aditzera ematen diguna. Tratamenduaren kontzentrazioaren arabera desberdintasunei dagokionez, ez dago ezberdintasun oso nabarmenik, baina 50 μM -koa jaso duten zeluletan fluoreszentzia zertxobait intentsuagoa dela ikus daiteke. Hori dela eta, esan dezakegu 20 μM eta 30 μM arazorik gabe erabil daitezkeela, baina seinalea are argiagoa izatea nahi badugu 50 μM -ekoa izango litzatekeela kontzentrazioa optimoa edo gomendagarria.

3T3 zelulen kasuan bezala, seinalearen zati intentsuena nukleoaren inguruan aurkitzen da, erretikulu endoplasmatikoa eta Goldi aparatua doazen lekuan. Proteina palmitoilatuak dendrita eta axoietako mintzean ere modu nabarmenean ikus daitezke irudietan, batez ere 50 μM -eko tratamendua jasotakoetan.

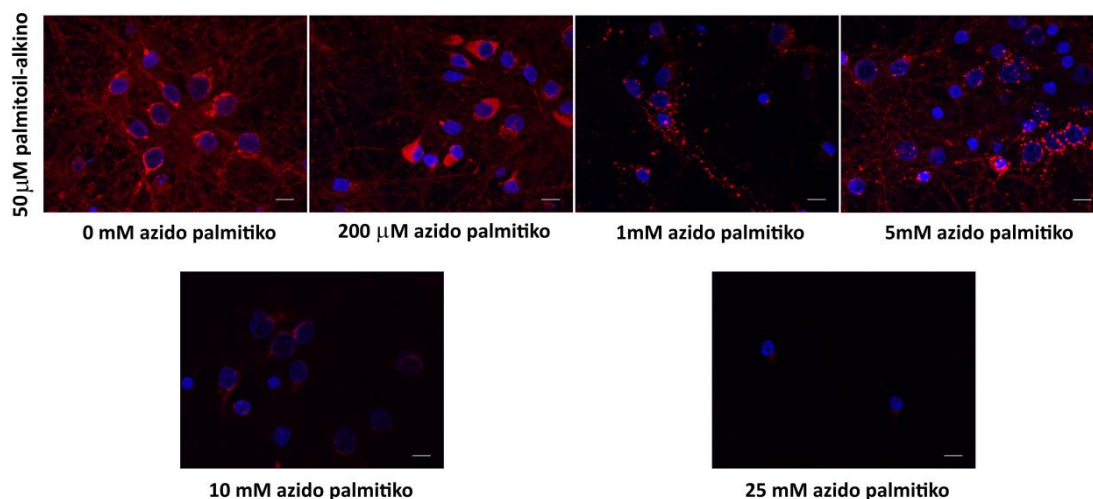


6.irudia. Palmitoilatutako proteinen bisualizazioa finkatutako neuronetan. Palmitoil-alkinoarekin tratatutako zelulei sulfo-Cy3-N₃ gehitu zitzaion klik kimika erreakzio bidez. Kontrol bezala zelula batzuei 50 μM palmitoi-alkino tratamendua beharrean etanola eman zitzaion. Gorri proteina palmitoilatuak (sulfo-Cy3-N₃) eta urdinez nukleoak (Hoechst). Eskala-barra 10 μm .

2.2.2. Lehiaketa saioa azido palmitikoarekin

Aurrez aipatutako esperimentu guztietan erabilitako palmitoil-alkinoak, azido palmitiko endogenoaren metabolismo bera jasaten duen ikusteko egin zen lehiaketa saio hau. Guri interesatzen zaiguna zeluletan eraldatutako gantz-azidoak endogenoaren sarrera eta erabilera berdina izatea da, horrela lortuko baitira emaitza fisiologikoenak eta beraz, fidagarrienak.

Lortutako emaitzekin benetan horrela dela frogatzen da, hau da, alkino taldea daukan gantz-azidoak azido palmitiko arruntaren bidezidor metaboliko berdina jarraitzen dituela ikusi da (**7. irudia**). 50 μM palmitoil-alkinorekin tratatu ziren neuronak zeuden putzutxo guztiak ($n=2$) eta momentu berean azido palmitiko arrunta gehitu zitzaizen kontzentrazio gorakorretan: 0 μM , 200 μM , 1 mM, 5 mM, 10 mM eta 25 mM. Azido palmitikorik gabeko neuronetan ikusten da fluoreszentiaren intentsitate altuena. 200 μM azido palmitikorekin seinalearen jaitziera bat nabari daitekeen arren, zelulak oraindik palmitoil-alkinoa erabiltzen ari direla ikus daiteke. 1 mM eta 5 mM-ekin, ordea, bi gantz-azidoen lehiaketaren eragina nabarmena egiten da. Izan ere, neuronak azido palmitikoa erabiltzen hasten dira, hau kantitate askoz altuagoan dagoelako, eta palmitoil-alkinoa lipido-tantetan pilatzen hasten da. Lipido-tantak gordailu bezala sortzen dituzte zelulek, momentuan behar ez dituzten lipidoak triazilglizerido eta esterifikatutako kolesterol bezala pilatuz. 5 mM-eko tratamendua jasotako neuronetan fluoreszentzia 1 mM-eko jaso dutenetan baino intentsuagoa izatearen arrazoia azido palmitikoaren disolbagarritasun baxua izan daiteke. Izan ere, kontzentrazio altuetan giro tenperaturan prezipitatzeko joera dauka. Hori dela eta, posible da 5mM-eko tratamendua zeukaten zeluletan azido palmitikoa zelulara sartu aurretik prezipitatu eta ondorioz lehiaketa gutxiago ikustea. 10 mM eta 25 mM azido palmitikorekin palmitoil-alkinoaren desplazamendua ia erabatekoa da, fluoreszentiaren seinale oso baxuak erakusten duen bezala. Kontzentrazio hauetan palmitoil-alkinoa ez da ia zelula barnera sartzen, zelulak askoz errazago barneratuko duelako kontzentrazio oso altutan aurkitzen den azido palmitikoa. Aurrez esan bezala, gantz-azido endogenoak eragiten duen alkinoaren desplazamendu hau biek metabolismo bera jasaten dutenaren adierazle da.



7. irudia. Lehiaketa saioa azido palmitikoaren eta palmitoil-alkinoaren artean. Putzutxo guztiak 50 μM palmitoil-alkinorekin eta aldi berean, azido palmitikoaren kontzentrazio gorakorrekin (0 μM , 200 μM , 1 mM, 5 mM, 10 mM eta 25 mM) tratatu ziren. Gorriz proteina palmitoilatuak (sulfo-Cy3-N₃) eta urdinez nukleoak (Hoechst). Eskala-barra 10 μm .

Behin protokolo guzti hauek gelean zein zeluletan baliagarriak direla frogatuta, hurrengo pausua organo mailara pasatzea izango litzateke. Lan honen kasuan, interes nagusia neuronetan egonik, burmuina izango litzateke aztertu beharreko organoa. Alkinoarekin tratamendua liposomak erabiliz egin ahalko litzateke, animalari hauek injektatuz edo janarian emanez. Gantz-azidoaren asimilaziorako nahikoa denbora utzi ostean burmuina disekezionatuko litzateke eta *ex vivo* klik kimika erreakzioa egin. Klik kimika erreakzioa *in vivo* egin nahi izanez gero, kontutan hartu behar da kobrea zitotoxikoa dela eta beraz, ezin izango litzatekeela erreakzioaren katalizatzaile bezala erabili. Organo osoaren edo behintzat zati lodien fluoreszentsia mikroskopio konfokalk bitartez aztertzeko ezinbestekoa da organoa gardena izatea eta beraz, garbiketa (*clearing*) teknika ezberdinak erabili beharko lirateke hori lortzeko.

ONDORIOAK

Lan honetan neuronetan palmitoilazioa aztertzeko jarraitu beharreko protokolo ezberdinen garapena eta optimizazioa egitea lortu dugu. Klik kimikan oinarrituz eta gantz-azido analogo alkinoak eta erreportari azidak erabiliz, gai izan gara palmitoilatutako proteinak modu espezifikoan detektatzeko, identifikatzeko eta ikusarazteko.

Zelula mailako frogapenak soilik direla ahaztu gabe, uste dugu deskribatutako protokoloak baliagarriak izan daitezkeela etorkizun hurbil batean palmitoilazioa organo mailan, kasu honetan burmuin mailan, *in vivo* aztertzeko.

BIBLIOGRAFIA

- Baker K., Astle D. E., Scerif G., Barnes J., Smith J., Moffat G., Gillard J., Baldeweg T., Raymond F. L. 2015. Epilepsy, cognitive deficits and neuroanatomy in males with ZDHHC9 mutations. *Ann Clin Transl Neurol.* 2: 559-569
- Camp L. A. , Hofmann S. L. 1993. Purification and properties of a palmitoyl-protein thioesterase that cleaves palmitate from H-Ras. *J. Biol. Chem.* 268: 22566–22574
- Chan P., Han X., Zheng B., DeRan M., Yu J., Jarugumilli G. K., Deng H., Pan D., Luo X., Wu X. 2016. Autopalmitoylation of TEAD proteins regulates transcriptional output of the Hippo pathway. *N. Chem. Bio. Online* argitaratua.
- Charron G., Zhang M. M., Yount J. S., Wilson J., Raghavan A. S., Shamir E., Hang H.C. 2008. Robust fluorescent detection of protein fatty-acylation with chemical reporters. *J. Am. Chem. Soc.* 131: 4967-4975
- Cho E., Park M. 2016. Palmitoylation in Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Pharmacol. Res.* 111: 133-151
- Duncan J. A., Gilman A. G. 1998. A cytoplasmic acyl-protein thioesterase that removes palmitate from G protein α subunits and p21 (RAS). *J. Biol. Chem.* 273: 15830–15837
- El-Husseini A. E., Brecht D.S. 2002. Protein palmitoylation: A regulator of neuronal development and function. 3: 791-802.

- Greaves J. , Chamberlain L.H. 2007. Palmitoylation-dependent protein sorting. *J. Cell Biol.* 176: 249–254
- International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431: 931-945
- Lin M., Fine M., Lu J., Hofmann S. L., Frazier G., Hilgemann D. W. 2013. Massive palmitoylation-dependent endocytosis during reoxygenation of anoxic cardiac muscle. *eLife.* 2: e01295
- Linder M.E., Deschenes R.J. 2007. Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8:74–84
- Ohno Y., Kihara A., Sano T., Igarashi Y. 2006. Intracellular localization and tissue-specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain containing proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1761: 474-483
- Peng T., Thinon E., Hang H. C. 2016. Proteomic analysis of fatty-acylated proteins. *Chem. Biol.* 30: 77-86
- Pepinsky R. B., Zeng C., Wen D., Rayhorn P., Baker D. P., Williams K. P., Bixler S.A., Ambrose C. M., Garber E. A., Miatkowski K., Taylor F. R., Wang E. A., Galdes A.. 1998. Identification of a palmitic acid-modified form of Human Sonic hedgehog. *J. Biol. Chem.* 273: 14037-14045
- Resh M.D. 2006. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat. Chem. Biol.* 2: 584–590
- Salaun C., Greaves J., Chamberlain L.H. 2010. The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *JCB.* 191: 1229-1238.
- Tomatis V. M., Trenchi A., Gomez G. A., Daniotti J. L. 2010. Acyl-protein thioesterase 2 catalyzes the deacylation of peripheral membrane-associated GAP-43. *PLoS One* 5: e15045
- Walsh C. T., Garneau-Tsodikova S., Gatto, Jr G. J. 2005. Protein Posttranscriptional modifications: The chemistry of proteome diversifications. *Angew. Chem.* 44: 7342-7372.
- Wessel D., Flügge U. I. 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138: 141-143.