

Sesquicentenario de la Academia Nacional de Ciencias, Argentina

**Segundo Simposio Guillermo Whitttembury
Academia de Ciencias de América Latina (ACAL)**

Córdoba, Argentina

2019

**Dinámica del transporte intracelular: Una relación mutua
entre lípidos y proteínas**

Dr. Jose Luis Daniotti

CONICET. Universidad Nacional de Córdoba. Centro de Investigaciones en Química
Biológica de Córdoba (CIQUIBIC), Córdoba, Argentina.

Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Químicas. Departamento de
Química Biológica Ranwel Caputto. Córdoba, Argentina.

daniotti@fcq.unc.edu.ar

Resumen

La modificación de proteínas por unión covalente a lípidos constituye un importante mecanismo de asociación a membranas, transporte y distribución intracelular de dichas proteínas. La S-acilación (o palmitoilación) de proteínas, en particular, consiste en la adición de una molécula lipídica a uno o más residuos de cisteína a través de un enlace tioéster. Se estima que esta modificación postraduccional ocurre en aproximadamente el 12% del proteoma humano. La S-acilación permite la asociación reversible de proteínas periféricas con membranas o, en el caso de proteínas integrales de membrana, modula su dinámica de segregación dentro del plano lateral de la membrana. En esta disertación describo las consecuencias que tiene la S-acilación de proteínas en el transporte intracelular y la asociación a membranas de las mismas. Menciono, además, información relevante que ilustra cómo la unión covalente de lípidos a proteínas juega un papel importante que determina movimientos intracelulares precisos mediante: *i)* La regulación del intercambio membrana-citosol; *ii)* La segregación del complejo proteína-lípido en microdominios de membrana o *iii)* Modificando el flujo de proteínas por medio de sistemas de transporte vesicular o por difusión.

Introducción general

La composición de lípidos en las membranas de los diversos compartimientos subcelulares de células eucariotas es variable. No obstante, la mayor parte de los lípidos se sintetizan en el retículo endoplásmico. Esto implica, en consecuencia, que los lípidos tienen que ser clasificados y transportados de manera selectiva en el interior celular y, más aún, mantener dicha composición a lo largo del tiempo.

Las proteínas, principalmente aquellas asociadas de manera permanente o transitoria a membranas biológicas, también deben ser transportadas selectivamente en el interior celular y, al igual que los lípidos, muchas inician su proceso de transporte a nivel del retículo endoplásmico. Diversos autores, entre ellos Gerrit van Meer de la Universidad de Utrecht, Holanda, han sugerido que los procesos de transporte de lípidos y de proteínas de membrana evolucionaron de manera coordinada e interrelacionada, constituyéndose ambos tipos de moléculas como engranajes indispensables de una compleja maquinaria de clasificación y transporte intracelular (1, 2).

La unión covalente de lípidos a proteínas representa, a mi entender, una sofisticación evolutiva del transporte intracelular de éstas moléculas en células eucariotas. Este fenómeno, al que podemos referirnos como lipidación de proteínas, en células eucariotas se puede dividir en dos categorías principales: 1) La que se lleva a cabo en el citosol o en la cara citoplasmática de las membranas celulares y 2) La que ocurre en el lumen de organelas de la vía secretoria. Con respecto a esta última categoría, la adición de glicosilfosfatidilinositol (GPI) a determinadas proteínas en el retículo endoplásmico es la modificación lipídica mejor caracterizada. En este caso, las proteínas transitan la ruta exocítica hacia la superficie celular, donde permanecen unidas a la cara extracelular de la membrana plasmática por medio del anclaje GPI. Otra modificación que ocurre en las proteínas de secreción (como los morfógenos y las citocinas) es la adición de colesterol y ácidos grasos (N-acilación) a través de un enlace éter o amida, respectivamente. Ejemplos de estos son las proteínas Hedgehog y Wingless Wnt-1 y Wnt-3a. Con respecto a los procesos de lipidación que se llevan a cabo en el citosol o en la cara citoplasmática de las membranas celulares podemos mencionar tres tipos principales: *i*) Prenilación, adición de un grupo isoprenilo como farnesilo de 15 carbonos o geranylgeranilo de 20 carbonos a un residuo cisteína a través de un enlace tioéter; *ii*) N-miristoilación, adición de un grupo miristoilo a un residuo de glicina a través de un enlace amida y *iii*) S-acilación, la adición de un ácido graso de cadena larga, generalmente palmitato, a un residuo cisteína a través de un enlace tioéster.

Mi disertación se centralizará principalmente en el proceso de S-acilación de proteínas periféricas de membrana, con especial énfasis en cómo esta modificación química regula la afinidad a membranas biológicas y la distribución intracelular de algunas proteínas modelos utilizadas en nuestras investigaciones (más información en ref. 3). En primer lugar, mencionaré de manera breve algunas características generales del proceso de S-acilación, así como de la maquinaria molecular que lleva a cabo dicho proceso celular.

S-acilación de proteínas

A la fecha se ha demostrado de manera experimental o sugerido mediante análisis *in silico* que aproximadamente unas 2000 proteínas humanas están/estarían palmitoiladas, lo que representa aproximadamente el 12% del proteoma humano. Aunque no existe un consenso claro sobre la secuencia de aminoácidos requeridos en una proteína para que ocurra esta modificación por lípidos, algunas características compartidas por diferentes sustratos pueden ayudar a predecir la palmitoilación, y en ese sentido se han desarrollado algoritmos para identificar posibles sitios de S-acilación. En el caso de las proteínas integrales de membrana, la palmitoilación puede ocurrir en las cisteínas ubicadas en el dominio citoplasmático o cerca del borde citosólico del dominio transmembrana. Por el contrario, para las proteínas solubles, las cisteínas S-acilables están presentes cerca de regiones con cierta afinidad por membranas biológicas, como puede ser una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos o básicos, o cercanas a sitios donde se producen otras modificaciones lipídicas como la miristoilación o prenilation.

El proceso de S-acilación está mediado por proteínas acil-transferasas (PAT) que pertenecen a la familia DHHC (aspartato-histidina-histidina-cisteína), mientras que las proteínas acil-tioesterasas (APT) son requeridas para el proceso opuesto de deacilación (Figura 1). Las enzimas PAT se describieron por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* en el año 2002. El número de enzimas PAT es variable, habiéndose descrito 7 en levadura y 23 en humanos, presentando todas ellas un dominio enriquecido en cisteínas con un motivo DHHC conservado, el cual es indispensable para el proceso enzimático. El motivo DHHC se encuentra en uno de los bucles citosólicos de estas proteínas integrales de cuatro a seis pasos transmembrana. Estas enzimas se localizan principalmente en el complejo de Golgi, pero también se las ha encontrado en el retículo endoplásmico, en membrana plasmática y en los endosomas (3).

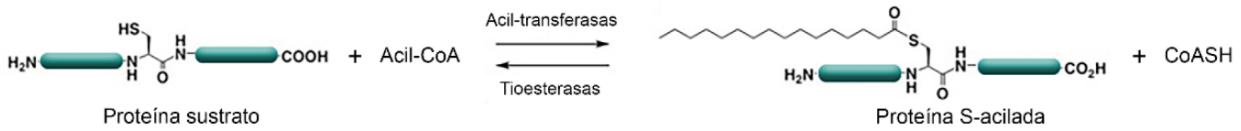


Figura 1. S-acilación dinámica y reversible. Los óvalos de color representan la proteína que es modificada. El residuo de cisteína blanco de la S-acilación se muestra conjuntamente con el enlace tioéster que se forma entre su grupo tiol y el ácido graso. El sustrato donador de dicho lípido es el acil-coenzima A (acil-CoA). Las acil-transferasas (PAT) y las tioesterasas (APT) son las enzimas involucradas en el proceso de acilación y deacilación, respectivamente. [Tesis doctoral de la Dra. M.P. Pedro, Universidad Nacional de Córdoba, 2016, (15)].

Es probable que las enzimas PAT muestren un cierto grado de redundancia ya que pueden tener especificidad de sustrato que se superponen parcialmente. Sin embargo, se ha demostrado que algunos sustratos particulares dependen de la actividad de una PAT individual para su eficiente modificación postraduccional. En levadura, por ejemplo, la eliminación de Swf1, la enzima PAT responsable de la palmitoilación de la proteína SNARE (receptor de unión al factor sensible a N-etilmaleimida soluble) denominada Tlg1, conduce a una ausencia completa de palmitoilación de Tlg1, que no se rescata por la sobreexpresión de ninguna de las otras PAT de levadura.

Algunos aspectos de la biología de PAT que aún deben investigarse en profundidad son: cómo las diferentes PAT logran sus respectivas localizaciones intracelulares, la relevancia de las modificaciones postraduccionales (O- y N-glicosilación, S-acilación, etc.) en la actividad y estabilidad de PAT y, muy importante, el intercambio dinámico de enzimas PAT entre membranas celulares ya que estas enzimas podrían ser relevantes para S-acilación de un sustrato específico en diferentes entornos.

Numerosos estudios demuestran la importante contribución de la S-acilación al transporte intracelular de proteínas. Sin embargo, las enzimas PAT han sido generalmente considerados "actores estáticos" que, en mi opinión, pueden no representar la situación real a nivel celular. Una de las pocas pruebas que destacan la importancia de estos conceptos provino del laboratorio de Luck Chamberlain en la Universidad de Strathclyde, Glasgow, Inglaterra (4). Demostraron que la enzima PAT denominada DHHC2, que media la S-acilación de la proteína PSD95 (postsynaptic density-95), está regulada por un ciclo dinámico de la enzima PAT que conecta la membrana plasmática con los endosomas de reciclaje. Además, un estudio anterior demostró que el bloqueo de la actividad sináptica, que conduce a una mayor palmitoilación de PSD95, también modula el transporte de DHHC2, promoviendo su acumulación en sitios cercanos a la membrana postsináptica (5).

Las enzimas que median la deacilación de proteínas no se han caracterizado tan ampliamente como las PAT, con solo dos APT citosólicas descritas hasta la fecha: APT1, descrita en el año 2008 y APT2, descrita en nuestro laboratorio en el año 2010 (6). Una proteína adicional, denominada tioesterasa APT1 like, es activa para el sustrato canal de potasio BK, aunque su papel como tioesterasa aún es motivo de debate. Más recientemente se descubrió que la enzima tioesterasa ABHD17 deacila a la proteína N-Ras y a PSD-95 (3).

APT1 y APT2, que comparten una similitud del 64% a nivel de aminoácidos, median el recambio de ácidos grasos en muchas proteínas periféricas y se cree que son selectivas porque no todos los sustratos son deacilados con la misma eficiencia. APT1 y APT2 contienen una tríada catalítica compuesta de serina, histidina y ácido aspártico, y también un motivo de glicina-X-serina-X-glicina, que es característico de la gran familia de α/β hidrolasas y serina hidrolasas. Las estructuras cristalinas de APT1 y APT2 han sido resueltas recientemente, revelando una arquitectura que contiene una estructura central compuesta de láminas β paralelas, conectadas por bucles y rodeadas por α hélices. Un reciente avance extraordinario es el descubrimiento de inhibidores selectivos para APT1 y APT2. Esta herramienta fundamental para el progreso en nuestras investigaciones bioquímicas ha significado, además, el inicio de estudios que demuestran la participación de ciclos acilación/deacilación en el mantenimiento de un fenotipo celular anormal asociado a cáncer (7).

La evidencia experimental obtenida en varios laboratorios (incluido el nuestro) indica que ambas enzimas (APT1 y APT2) son principalmente citosólicas, con un comportamiento altamente hidrofílico. No obstante, se describió que APT1 y APT2 pueden experimentar palmitoilación en el residuo de cisteína presente en posición 2, lo que se sugirió que facilitaría la localización y función de estas tioesterasas en membrana celulares. Sin embargo, debe mencionarse que la cisteína S-acilable en APT1 y APT2 no se conserva en todas las especies analizadas, y el papel exacto de esta modificación aún no está claro.

Rol de la S-acilación en el transporte intracelular de proteínas de membrana periféricas: El paradigmático caso de la proteína G monomérica H-Ras

Las proteínas de la familia Ras son GTPasas monoméricas que conectan las señales extracelulares con las vías efectoras intracelulares y tienen un papel fundamental en el control de múltiples funciones biológicas, incluidas la proliferación, diferenciación y supervivencia celular, entre muchas otras. Las mutaciones hiperactivadoras en Ras [por ejemplo, el reemplazo del aminoácido glicina con el aminoácido valina en la posición 12 de

la proteína (G12V)] son un sello distintivo observado en un alto porcentaje (20-35%) de procesos neoplásicos en humanos, lo que ha llevado a una investigación intensiva dirigida a interferir con la función Ras.

Existen cuatro isoformas de Ras (H-Ras, N-Ras, K-Ras4A y K-Ras4B), y si bien comparten más del 90% de identidad sus funciones no son redundantes. Todas estas isoformas tienen en su extremo carboxilo terminal una secuencia CAAX (en la que C es una cisteína, A es un aminoácido alifático y X es cualquier aminoácido) que dirige la modificación postraduccional de la proteína. Las proteínas Ras se modifican primero en el citosol, donde una enzima farnesiltransferasa transfiere un grupo isoprenilo de 15 carbonos a la cisteína 186 en el motivo CAAX, lo que permite la asociación transitoria de Ras farnesilado con la cara citoplasmática de las membranas del retículo endoplásmico. Luego, la secuencia AAX presente en el extremo carboxilo terminal es escindida por la endopeptidasa Rce1, y la cisteína farnesilada se metila por una isoprenilcisteína carboxilmetiltransferasa (Icmt) (Figura 2). Dependiendo de la isoforma Ras, una segunda señal para una asociación estable a membrana está presente en las proximidades de la cisteína farnesilada. H-Ras está doblemente S-acilado en las cisteínas 181 y 184, mientras que N-Ras está S-acilado solamente en la cisteína 181. Por el contrario, K-Ras4B no se modifica por S-acilación, pero contiene un dominio polibásico de seis aminoácidos lisina en tándem que facilitan la interacción electrostática con fosfolípidos presentes en la hemicapa citoplasmática de las membranas biológicas. K-Ras4A, por el contrario, es única entre las cuatro proteínas Ras en poseer, además de la cisteína farnesilada, una cisteína S-acilada y una región polibásica.

Después de la farnesilación, proteólisis y metilación, Ras es transportada al complejo de Golgi, donde ocurre la S-acilación por medio del complejo DHHC9/GCP16 y posiblemente por otras PATs. En *Saccharomyces cerevisiae* esta reacción está mediada por su ortólogo Erf2/4. La palmitoilación simple o doble aumenta significativamente la afinidad de Ras prenilado a las membranas biológicas, lo cual es necesario para su correcto transporte y distribución intracelular. N y H-Ras farnesiladas y palmitoiladas se movilizan hacia la membrana plasmática asociada a la hemicapa citoplasmática de las vesículas. Luego, una vez en la superficie celular, las proteínas Ras pueden depalmitoilarse y liberarse nuevamente al citosol, donde viajan por difusión al complejo de Golgi para otra ronda de palmitoilación y transporte exocítico a la membrana plasmática. Una ruta de transporte alternativa e independiente del proceso de deacilación, descrita en nuestro laboratorio, demuestra que H-Ras puede ser endocitada y transportada mediante vesículas al

compartimiento endocítico de reciclado en un proceso dependiente de las proteínas Rab5 y Rab11 (8) (Figura 2).

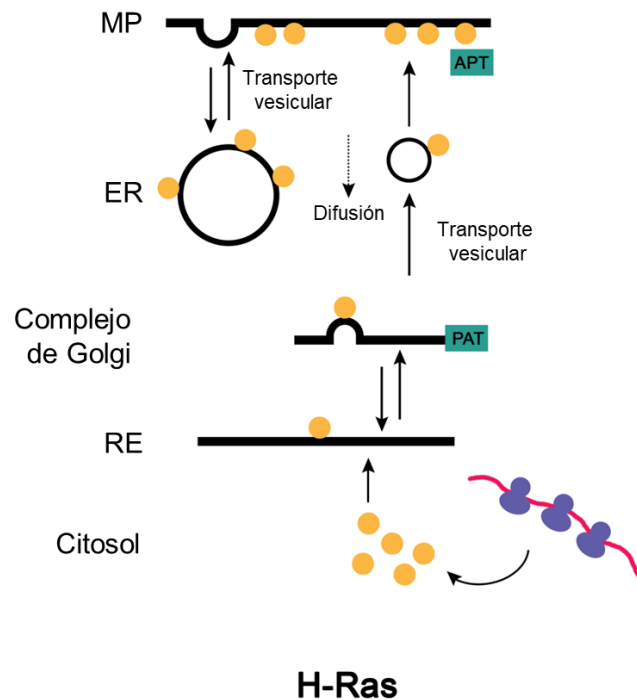


Figura 2. Modelo del tráfico intracelular de H-Ras. El modelo propuesto fue diseñado teniendo en consideración los aportes realizados por investigaciones del laboratorio del Dr Jose Luis Daniotti (CIQUIBIC-UNC-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina), así como los presentados anteriormente en publicaciones de diferentes laboratorios. H-Ras se modifica primero en el citosol, donde una enzima farnesiltransferasa transfiere un grupo isoprenilo de 15 carbonos a la cisteína 186 en el motivo CAAX. Luego, el motivo CAAX de H-Ras es procesado (proteólisis y metilación) a nivel de membranas del retículo endoplásmico (RE). Posteriormente, H-Ras se palmitoila en el Complejo de Golgi en cisteínas 181 y 184. De esta manera, es incorporada a vesículas de transporte con destino hacia la membrana plasmática (MP). En dicha localización, H-Ras puede ser endocitada y llevada a endosomas de reciclado (ER). Una fracción podría, eventualmente, deacilarse por acción de las APTs, retornando al Complejo de Golgi o RE por transporte no vesicular (Difusión).

Esta ruta de transporte de H-Ras desde la membrana plasmática a endosomas de reciclado fue descrita en varios tipos celulares y sería altamente dependiente de los niveles de expresión de APT1 y APT2, cuya acción catalítica favorecería la disociación de H-Ras de membrana, reduciendo su transporte mediado por vesículas. Además, se demostró que una fracción de la proteína diacilada GAP-43 también se localiza en endosoma de reciclado, arribando al mismo desde la membrana plasmática mediante transporte vesicular. Tanto para H-Ras como para GAP-43, la doble palmitoilación es necesaria para su transporte y localización en endosoma de reciclado. Más recientemente, se ha descrito una ruta exocítica alternativa para N- y H-Ras en células COS-1, en la que las proteínas salen de la red trans-Golgi (TGN) y pasan por endosoma de reciclado en su camino hacia la membrana plasmática.

Podemos inferir que H-Ras es factible de ser S-acilado en las cisteínas 181 y 184, pero la estequiometría de S-acilación no se sabe a ciencia cierta y la información sobre cómo estos residuos contribuyen individualmente al transporte intracelular de H-Ras es escasa. Los estudios iniciales del laboratorio de John F. Hancock en la Universidad de Queensland, Brisbane, Australia, han demostrado que la mutación de los sitios de S-acilación resulta en que H-Ras se acumule en diferentes compartimentos subcelulares (9). Más recientemente, nuestro laboratorio demostró que las cisteínas S-aciladas 181 y 184 contribuyen de manera diferencial a la afinidad de H-Ras a la membrana y exhiben diferentes sensibilidad y cinética de deacilación (10) (Figura 3). En particular, se encontró que las especies de H-Ras monoaciladas se incorporan de manera selectiva y con diferente eficiencia a las vesículas de transporte a nivel del complejo post-Golgi. La proteína H-Ras que se palmitoila solo en la cisteína 184 se incorpora más eficientemente en el complejo de Golgi a las vesículas que tienen por destino a la membrana plasmática. En particular, experimentos de fotoactivación y de fotoblanqueo de fluorescencia revelaron que ambos mutantes monoacilados exhiben unión reversible a membranas, con difusión tanto dependiente como independiente de proceso de deacilación. En consecuencia, la S-acilación de cisteínas 181 y 184 proporcionan información única sobre la organización espacial y el transporte intracelular de H-Ras, como se muestra claramente en la Figura 3. La interrelación entre las actividades PAT y APT, así como la estabilidad de la proteína y otras modificaciones postraduccionales, da como resultado una distribución heterogénea de especies mono o diaciladas, lo que puede tener implicancias fisiológicas, o incluso patológicas, debido a la influencia en la conexión de las proteínas GTPasa pequeñas con efectores particulares en diversos entornos subcelulares.

Aunque las actividades relativas de PAT y APT son los factores principales que regulan la estequiometría de S-acilación y, por lo tanto, la distribución subcelular de las diversas versiones S-aciladas de H-Ras, las modificaciones químicas adicionales tienen consecuencias importantes en su estado de acilación, distribución subcelular y segregación lateral en biomembranas. FKBP12, el miembro mejor caracterizado de la familia de prolil isomerasas de proteína de unión al fármaco inmunosupresor FK506 (FKBP), se une a H-Ras diacilada y promueve la depalmitoilación de una manera dependiente de la prolina 179. Además, se ha demostrado que H- y N-Ras, pero no K-Ras, están modificados por cadenas de di-ubiquitina unidas a lisina 63. La modificación de H-Ras mediada por CAAX (farnesilación y palmitoilación) es necesaria para su ubiquitinación y asociación con las membranas de la vía endosomal.

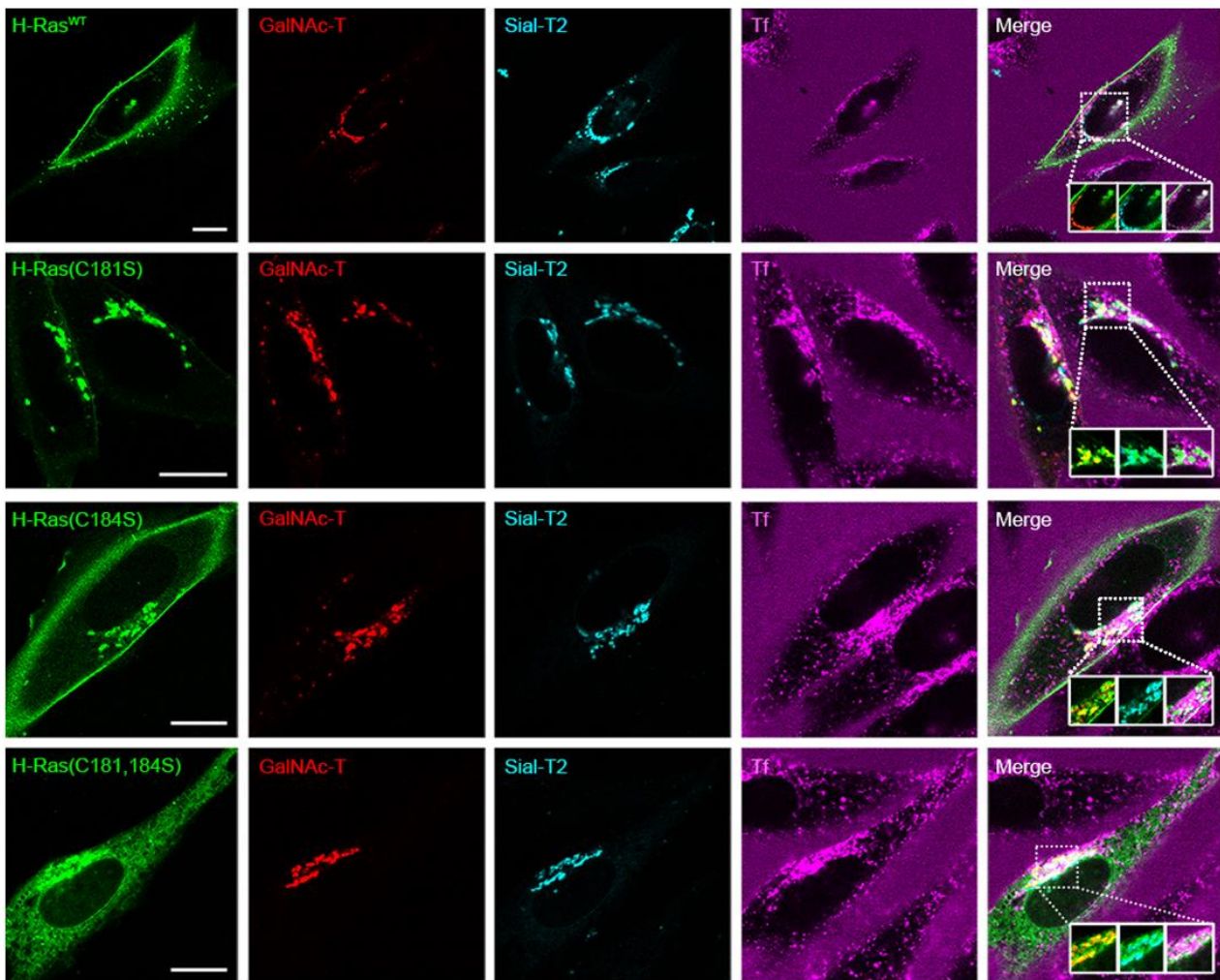


Figura 3. Análisis de la localización subcelular de las variantes de S-acilación de H-Ras en células CHO-K1. Células CHO-K1 fueron transfectadas con vectores apropiados para la expresión de las proteínas H-Ras, H-Ras(C181S), H-Ras(C184S) o H-Ras(C181,184S)-YFP (YFP, Yellow Fluorescent Protein, pseudocoloreadas en verde) y los marcadores de complejo de Golgi GalNAc-T-Cherry (pseudocoloreada en rojo) y Sial-T2-CFP (CFP, Cyan Fluorescent Protein, pseudocoloreada en cian). Posteriormente fueron incubadas con Transferrina-Alexa Fluor 647, marcador de la vía endosomal (pseudocoloreada en magenta) y analizadas por microscopía de fluorescencia confocal. La columna última de la derecha representa la superposición de las primeras 4 columnas (Merge). Los recuadros muestran ampliaciones de la región marcada, para evidenciar la colocalización de H-Ras con los marcadores de organelas. Las barras de escala representan 10 μm . Note las diferentes localizaciones subcelulares de las diversas versiones de H-Ras. [Tesis doctoral de la Dra. M.P. Pedro, Universidad Nacional de Córdoba, 2016, (15)].

El estado de activación de H-Ras también tiene notorias consecuencias en su distribución en microdominios de membrana y su cinética de deacilación. Se conoce que cuando H-Ras está en el estado unido a guanosín trifosfato (GTP, estado activo), segrega lateralmente en membrana a dominios líquido desordenados, mientras que H-Ras inactivo, unido a guanosín difosfato (GDP), reside en nanodominios de fase líquido ordenado. Sin embargo, la distribución de H-Ras en los microdominios de la membrana plasmática varía según el tipo de célula y está determinada por el equilibrio entre la palmitoilación y la

depalmitoilación. Sorprendentemente, la versión oncogénica de H-Ras unida a GTP es más accesible para APT(s) que la inactiva, lo que sugiere que la depalmitoilación de H-Ras se lleva a cabo principalmente en microdominios de membrana especializados que contienen H-Ras activo.

Las caveolas son microdominios de membrana plasmática, presentes como invaginaciones en diversos tipos de células de vertebrados, especialmente en células endoteliales y adipocitos. Las caveolas representan nanodominios de entre 50 y 100 nanómetros enriquecidos en colesterol y glicoesfingolípidos. Las investigaciones realizadas en el laboratorio de Robert Parton (Universidad de Queensland, Brisbane, Australia) han demostrado que las caveolas regulan la nanodistribución de las proteínas Ras en la membrana plasmática y, por consiguiente, la transducción de señales en las cuales están involucradas. La deficiencia de caveolin-1, proteína de 21 kDa que participa en la formación y mantenimiento de caveolas, afecta la composición de los lípidos celulares así como la dinámica de la membrana plasmática. Este fenómeno correlaciona con un aumento del nano reclutamiento de K-Ras, pero una reducción en la segregación lateral de H-Ras unido a GTP, lo que resulta en una pérdida de señal dependiente de nanodominios de H-Ras (11). En su conjunto, estos resultados ilustran la interrelación existente entre los dominios caveola, el metabolismo de los lípidos y vías de transducción de señales.

La regulación de muchas otras proteínas periféricas a través de ciclos de acilación-deacilación ha sido descrita en numerosos artículos originales de investigación y resumida en excelentes artículos de revisión (12, 13, 14). En resumen, las evidencias demuestran claramente que el ciclo de S-acilación dinámica actúa como un interruptor molecular que regula la distribución espacial de las proteínas en las dimensiones en escala micro (transporte inter organelar) y nano (segregación o agrupamiento de proteínas en nanodominios de membrana).

Referencias

1. van Meer G. Lipid traffic in animal cells. *Annu Rev Cell Biol.* 1989;5:247-275.
2. Sprong H, van der Sluijs P, van Meer G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001; 2:504-513.
3. Daniotti JL, Pedro MP, Valdez Taubas J. The role of S-acylation in protein trafficking. *Traffic.* 2017; 18:699-710.
4. Salaun C, Ritchie L, Greaves J, Bushell TJ, Chamberlain LH. The C-terminal domain of zDHHC2 contains distinct sorting signals that regulate intracellular localisation in neurons and neuroendocrine cells. *Mol Cell Neurosci.* 2017; 85:235-246.

5. Noritake J, Fukata Y, Iwanaga T, Hosomi N, Tsutsumi R, Matsuda N, Tani H, Iwanari H, Mochizuki Y, Kodama T, Matsuura Y, Brecht DS, Hamakubo T, Fukata M. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J Cell Biol.* 2009; 186:147-160.
6. Tomatis VM, Trenchi A, Gomez GA, Daniotti JL. Acyl-protein thioesterase 2 catalyzes the deacylation of peripheral membrane-associated GAP-43. *PLoS One.* 2010; 5(11):e15045.
7. Hernandez JL, Davda D, Cheung See Kit M, Majmudar JD, Won SJ, Gang M, Pasupuleti SC, Choi AI, Bartkowiak CM, Martin BR. APT2 Inhibition Restores Scribble Localization and S-Palmitoylation in Snail-Transformed Cells. *Cell Chem Biol.* 2017; 24:87-97.
8. Gomez GA, Daniotti JL. H-Ras dynamically interacts with recycling endosomes in CHO-K1 cells: involvement of Rab5 and Rab11 in the trafficking of H-Ras to this pericentriolar endocytic compartment. *J Biol Chem.* 2005; 280:34997-35010.
9. Roy S, Plowman S, Rotblat B, Prior IA, Muncke C, Grainger S, Parton RG, Henis YI, Kloog Y, Hancock JF. Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization, and signaling. *Mol Cell Biol.* 2005; 25:6722-6733.
10. 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.* 2017; 28:962-974.
11. Ariotti N, Fernandez-Rojo MA, Zhou Y, Hill MM, Rodkey TL, Inder KL, Tanner LB, Wenk MR, Hancock JF, Parton RG. Caveolae regulate the nanoscale organization of the plasma membrane to remotely control Ras signaling. *J Cell Biol.* 2014; 204:777-792.
12. Chamberlain LH, Lemonidis K, Sanchez-Perez M, Werno MW, Gorleku OA, Greaves J. Palmitoylation and the trafficking of peripheral membrane proteins. *Biochem Soc Trans.* 2013; 41:62-66.
13. Fukata Y, Murakami T, Yokoi N, Fukata M. Local Palmitoylation Cycles and Specialized Membrane Domain Organization. *Curr Top Membr.* 2016; 77:97-141.
14. Chamberlain LH, Shipston MJ. The physiology of protein S-acylation. *Physiol Rev.* 2015; 95:341-376.
15. Tesis doctoral de la Dra. Maria del Pilar Pedro. Estudio sobre los mecanismos de acilación y transporte intracelular de proteínas periféricas aciladas. Director: Dr. José Luis Daniotti. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. Septiembre de 2016.