

**UNIVERZITA KARLOVA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Michaela Grobarčíková

Role modifikace mastnou kyselinou v aktivitě proteinů

The role of fatty acylation in activity of proteins

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Mašín, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 2. 5. 2021

Michaela Grobarčíková

Poděkování

Mám kolem sebe řadu lidí, za něž jsem vděčná, vážím si jich a patří jim mé poděkování. V první řadě jsou to moji rodiče, kteří mi studium biologie umožnili a na mé životní cestě stojí vždy při mně. Veliké poděkování patří vedoucímu mé práce RNDr. Jiřímu Mašínovi za vždy pozitivní přístup, cenné rady, věcné připomínky a nejvíce za čas, který mi věnoval. Dále bych chtěla poděkovat prof. Ing. Peterovi Šebovi, CSc. za možnost pracovat v jeho laboratoři molekulární biologie bakteriálních patogenů. Velký dík patří též Vítu Burešovi za jeho trpělivost, neutuchající podporu a dodávání motivace, když občas scházela. Závěrem bych ještě ráda poděkovala svým přátelům Kateřině Vobořilové, Anně Jandjukové, Ondřejovi Vosálovi, Janu Procházkovi, Šárce Knoblochové, Janu Kytkovi, Janu Věckovi a Tereze Fraňkové, bez kterých si svá vysokoškolské roky neumím představit.

Abstrakt

Posttranslační modifikace představují kovalentní a obvykle enzymem-zprostředkované úpravy proteinů. Tyto modifikace slouží ke vzniku aktivních forem proteinů a také rozšiřují buněčný repertoár proteinů vzniklých ze standardních aminokyselin. Mezi známé posttranslační úpravy patří například fosforylace, glykosylace, ubikvitinace, proteolýza a také acylace, které se v práci věnuji podrobněji. Acylace proteinů, kovalentní připojení acylové skupiny, je velmi hojnou proteinovou modifikací. Tato reakce je obecně zprostředkována specifickými acyl-transferázami a zahrnuje transport acylové skupiny z donoru na aminokyselinový zbytek. Rozmanité spektrum buněčných proteinů je posttranslačně acylováno a stávají se tím biologicky aktivní. K tomuto jevu dochází u bakteriálních toxinů, jež jsou důležitými faktory virulence patogenních bakterií. Proteinová lipidace reguluje celou řadu biologických drah, jako je cílení do membrán, proteinová sekrece, buněčná signalizace a apoptóza. Posttranslační acylace je též nezbytná pro aktivitu Ras a mnoha dalších proteinů způsobujících rakovinné bujení. Z toho důvodu jsou inhibitory acyltransferáz těchto proteinů testovány jako cíle protinádorových léků. V práci shrnuji poznatky o jednotlivých typech lipidace včetně popisu konkrétních acylovaných proteinů.

Klíčová slova

Posttranslační modifikace proteinů, lipidace, acyltransferáza, toxin

Abstract

Post-translational modifications are covalent and generally enzyme-mediated modifications of proteins. These modifications can serve to create active forms of proteins and they can also expand the cellular repertoire of proteins derived from standard amino acids. Known post-translational modifications include for example phosphorylation, glycosylation, ubiquitination, proteolysis and also acylation discussed in more detail in this thesis. Acylation of proteins, the covalent attachment of an acyl group, is a very frequent protein modification. This reaction is typically mediated by specific acyl transferases and involves transport of an acyl group from a donor to an amino acid residue. A diverse spectrum of cellular proteins is post-translationally acylated and therefore become biologically active. This phenomenon occurs in bacterial toxins, which are important factors of the virulence of pathogenic bacteria. Protein lipidation regulates numerous biological pathways such as membrane targeting, protein secretion, cell signaling, and apoptosis. Posttranslational acylation is also required for Ras activity and many other cancer-causing proteins. Therefore, inhibitors of acyltransferases of these proteins are being tested as targets for antitumor drugs. In this work, findings about individual types of lipidation, including a description of specific acylated proteins are summarised.

Key words

Posttraslational modification of proteins, lipidation, acyltransferase, toxin

Seznam použitých zkratek

ACP	protein přenášející acyly (acyl carrier protein)
Akr1	palmitoyl transferáza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
AMPA receptor	receptor α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionové kyseliny, transmembránový receptor pro glutamát
Apo-ACP	neaktivní forma ACP
APT1, APT2	acyl protein thioesteráza 1 a 2
ARF	ADP-ribosylační faktor
BID	pro-apoptický protein
C15	řetězec s 15 uhlíky
C20	řetězec s 20 uhlíky
CAAX motiv	motiv cystein-alifatická aminokyselina-alifatická aminokyselina-nedefinovaná aminokyselina
c-Abl	nerceptorová tyrosin-kináza (Tyrosine-protein kinase ABL1)
CAP-23/NAP-22	substrát protein kinázy C, vyskytuje se v mozku
CC motiv	motiv cystein-cystein
CCR5	C-C chemokinový receptor typu 5, protein na povrchu bílých krvinek
CD14	protein vytvářený makrofágy a detekující lipopolysacharid (cluster of differentiation 14)
Cdc42	G-protein z Rho rodiny proteinů (cluster of differentiation 14)
C-konec proteinu	konec proteinu s -COOH (karboxylovou) skupinou
CoA	koenzym A
CRD	doména bohatá na cystein (cysteine rich domain)
c-Src	protoonkogen obsahující v kinázové doméně tyrosin
CXC motiv	motiv cystein-nedefinovaná aminokyselina-cystein
CyaA	adenylát cyklázový toxin z bakterie <i>Bordetella pertussis</i>
CyaC	acyl transferáza modifikující CyaA
Cys	aminokyselina cystein
DHHC doména	konzervovaná doména aspartát-histidin-histidin-cystein
EGF	epidermální růstový faktor
ER	endoplazmatické retikulum
Erf2, Erf4	u kvasinek vytváří společně komplex palmitoyl transferázy (Ethylene-responsive transcription factor 2 and 4)
FT	farnesyl transferáza
Fyn	tyrosin-protein kináza z rodiny Src
G protein	protein vážící GTP (guanine nucleotide-binding protein)
Gag	strukturní protein viru HIV
GAP	protein stimulující aktivitu G proteinů (GTPase-activating protein)
GCP16	protein nutný pro funkci DHHC9 (Golgi complex-associated protein of 16 kDa)
GDP	guanosindifosfát
GEF	faktor pro výměnu guaninových nukleotidů (guanine nucleotide exchange factor)
GGT-I	geranygeranyl transferáza typu I
GGT-II	geranylgeranyl transferáza typu II
Gly	aminokyselina glycin
GPI	glykofosfatidylinositol, kotva spojující protein s fosfolipidem
GRASP	protein odpovídající za strukturu Golgiho aparátu (Golgi reassembly stacking protein)
GTP	guanosintrifosfát
G α	α podjednotka G proteinu
G γ	γ podjednotka G-proteinu, většinou v komplexu s β podjednotkou
Hhat	Hedgehog acyl transferáza
HIV	RNA virus patřící mezi retroviry (Human immunodeficiency virus)
HIV-1	1. typ viru HIV, typy se navzájem liší povrchovými strukturami
HlyA	alfa hemolysin z bakterie <i>Escherichia coli</i>

<i>hlyCABD</i>	hemolysinový operon
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A
H-Ras	GTPáza zapojená do Ras signální kaskády
K-Ras	proonkogen kódující G-protein
Lck	protein z rodiny SRC kináz hrající roli v aktivaci T-lymfocytů (lymphocyte-specific tyrosine kinase)
Lgt	prolipoprotein diacylglycerol transferáza
LktA	leukotoxin <i>Pasteurella haemolytica</i>
Lnt	lipoprotein N-acyl transferáza
Lpcat1	lysofosfatidylcholin acyl transferáza 1
LPS	lipopolysacharid
Lsp	lipoprotein signální peptidáza
Lys	aminokyselina lysin
MARCKS	myristoylovaný substrát C-kinázy bohatý na alanin
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
N-konec proteinu	konec proteinu s -NH ₂ (aminovou) skupinou
NMT	N-myristoyl transferáza
PATs	palmitoyl acyl transferázy
Pfa4	palmitoyl transferáza
PORCN	gen kódující Porcupine O-acyl transferázu
PPT1	palmitoyl-protein thioesteráza 1
proRTXA	neacylovaný protoxin
PSD-95	postsynaptic density protein 95
Rab	proteiny řadící se do nadrodiny Ras proteinů
Rac	signalizační G-proteiny z Rho rodiny proteinů
Ras	skupina protoonkogenů kódující GTP vazebné proteiny
REP	protein nutný k funkci geranygeranyl transferázy typu II (Rab escort protein)
Rheb	G-protein v mozku (Ras homolog enriched in brain)
RhoB	GTP-vazebný protein (Ras homolog family member B)
R-Ras	protein regulující organizaci aktinového cytoskeletu (Ras-related protein)
RTX	repeat-in-toxin
RTXC	acyl transferáza RTX toxinu
Ser	aminokyselina serin
SNAP-25, SNAP-23	synaptosomal-associated protein 25 and 23
Src	nerceptorová tyrosin-kináza
Swf1	palmitoyl transferáza s DHHC-CRD motivem (Spore wall formation)
Tlg1	protein zajišťující fúzi váčků s Golgiho aparátem (T-SNARE affecting a Late Golgi compartment)
TLR4	transmembránový protein, jehož aktivace vede k produkci prozánětlivých cytokinů (Toll-like receptor 4)
TMD	transmembránová doména
Wnt proteiny	sekretované acylované glykoproteiny zajišťující buněčnou komunikaci
Yck2	membránově vázaná kasein kináza <i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Obsah

Seznam použitých zkratk	VI
1. Úvod.....	1
2. Palmitoylace.....	2
2.1. Mechanismus S-palmitoylace.....	4
2.1.1. DHHC proteiny.....	4
2.2. Regulace S-palmitoylace.....	6
2.3. Funkce S-palmitoylace.....	8
2.3.1. Biologické funkce DHHC proteinů.....	8
2.4. Palmitoylace u virů a bakterií.....	9
3. Prenylace.....	12
3.1. Mechanismus prenylace.....	14
3.1.1. Farnesyl transferáza a geranylgeranyl transferáza typu I.....	14
3.1.2. Geranylgeranyl transferáza typu II.....	15
3.2. Funkce prenylace.....	15
4. Myristoylace.....	16
4.1. N-myristoyl transferáza.....	17
4.2. Mechanismus myristoylace.....	18
4.3. Funkce myristoylace.....	18
4.3.1. Buněčná lokalizace a cílení do membrán.....	18
4.3.2. Regulace proteinových interakcí a enzymové aktivity.....	19
4.4. Myristoylace u bakterií a virů.....	20
5. Lipidové skupiny připojené nepřímo k proteinové kostře.....	21
5.1. Bakteriální fosfopanteteinylované proteiny.....	21
5.2. Glypiace.....	22
6. Závěr.....	22
7. Literatura.....	24

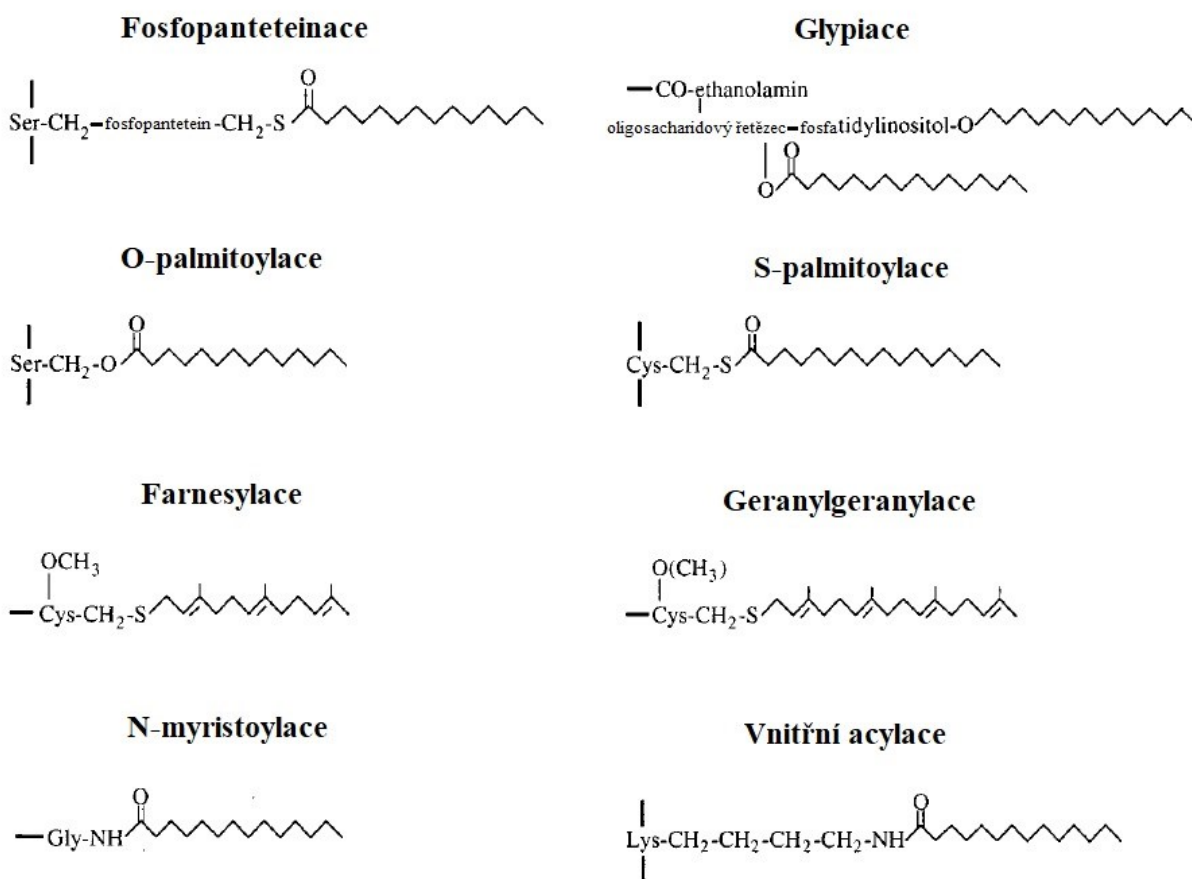
1. Úvod

Biosyntéza polypeptidového řetězce na ribozomu velice často neprodukuje zcela funkční protein. Nově vznikající řetězec musí podstoupit řadu chemických úprav. Tyto modifikace jsou nejčastěji řízeny enzymaticky a dochází k nim po překladu templátové mRNA, tedy po translaci. Proto jsou tyto dodatečné procesy označovány jako posttranslační modifikace. K těmto změnám může také docházet již během samotné syntézy proteinu, tento jev je poté označován jako modifikace spřažená s translací. Existuje řada proteinových funkcí, které vyžadují posttranslační modifikaci aminokyselinových zbytků. Příkladem může být přeměna inaktivního apoproteinu na funkční enzym, ke které dochází kovalentním připojením prostetické skupiny na peptidový řetězec. Dalším důsledkem posttranslačních modifikací může být regulace biochemických procesů změnou enzymatické aktivity proteinu. Také označení proteinů pomocí těchto modifikací je klíčové a zajišťuje vnitrobuněčnou lokalizaci, včetně transportu do proteazomu. V neposlední řadě některé posttranslační úpravy přímo či nepřímo ovlivňují konformaci a strukturu nově vznikajícího proteinu.

Termín posttranslační modifikace označuje úpravy v polypeptidovém řetězci a tyto úpravy lze rozdělit do dvou skupin. První skupinou jsou procesy, u kterých dochází k proteolytickému štěpení peptidových vazeb, což má za následek vznik polypeptidových fragmentů. Druhá skupina se skládá z úprav, které modifikují polypeptidový řetězec přidáním různých chemických skupin k aminokyselinovým zbytkům, ale obvykle při tom nenarušují kostru polypeptidu. Chemická povaha a funkce těchto modifikací je odlišná, navíc každý typ modifikace je typický pro určitý aminokyselinový zbytek. Výsledkem těchto procesů je buněčný proteom, který se skládá z více komponent, než je původně geny kódováno v genomu. Jako příklad nejčastějších posttranslačních modifikací lze uvést fosforylaci, glykosylaci, ubikvitinaci, metylaci, acetylaci a mnohé další, na které není tato práce zaměřena.

Lipidace neboli acylace je posttranslační modifikace proteinu přívěsky lipidové povahy. Podílí se na maturaci mnoha proteinů v organismech s prokaryotickým i eukaryotickým typem buňky. Těmito přívěsky mohou být buď samotné lipidy nebo zbytky mastných kyselin (viz obrázek 1). Existence proteinů, které nesou kovalentně navázané zbytky řetězců mastných kyselin je známa již od počátku 70. let (Braun a Radin, 1969; Gagnon et al., 1971). Takto modifikované proteiny jsou klasifikovány buď na základě typu připojované mastné kyseliny nebo lipidu, nebo podle modifikované aminokyseliny či donoru dané skupiny. Jednotlivé typy lipidů a mastných kyselin, využívaných k posttranslačním úpravám proteinů, mají odlišný chemický charakter. To vede k tomu, že dodávají cílovým proteinům jiné funkční rysy. (Casey, 1995). Nejčastěji připojovanými mastnými kyselinami jsou zbytky kyseliny myristové a palmitové (Stanley et al., 1998). Lipidace u proteinů zvyšuje hydrofobicitu a hraje klíčovou roli v regulaci proteinových struktur a funkcí. Bylo též prokázáno, že chyby v regulaci lipidace jsou spjaty s mnoha onemocněními, jako jsou například poruchy nervového systému či různé typy zhoubného bujení. Z tohoto důvodu byly enzymy, které jsou odpovědné za připojování a odstraňování přívěsků lipidové povahy označeny jako potenciální cíle léků u široké škály chorob (Resh, 2012).

Cílem této bakalářské práce je shrnout nejnovější poznatky o modifikacích proteinů látkou lipidového charakteru. Jsou zde popsány mechanismy vedoucí k lipidaci, dále funkce této modifikace v aktivitě a cílení proteinů a na konkrétních příkladech proteinů je ukázán význam této modifikace. Každá kapitola je věnována jednomu typu lipidové modifikace.



Obrázek 1: Hlavní třídy proteinových acylací u organismů s prokaryotním a eukaryotním typem buňky. Je znázorněna struktura lipidů a jeho připojení na proteinovou kostru (kromě příkladů nepřímého připojení u fosfopanteteinylovaných a glypiovaných proteinů). Závorky kolem methylové skupiny u geranylgeranylace znázorňují, že karboxymethylace není univerzální pro všechny takto modifikované proteiny. (Upraveno podle Stanley et al., 1998.).

2. Palmitoylace

Palmitoylace je forma modifikace proteinu, ke které dochází navázáním kyseliny palmitové (mastná kyselina s řetězcem nesoucím 16 uhlíků). Ta se připojuje pomocí esterové nebo thioesterové vazby k aminokyselinovým zbytkům (Bolanowski et al., 1984; Magee a Schlesinger, 1982). Tento typ modifikace byl poprvé pozorován na počátku 70. let minulého století u strukturního proteinu v myelinu hovězího mozku (Braun a Radin, 1969). Esterový charakter vazby byl poté prokázán u virového glykoproteinu (Schmidt a Schlesinger, 1979). Podle toho, jaký aminokyselinový zbytek je palmitátem modifikován, jsou

rozlišovány tři typy palmitoylace. První z nich je tzv. S-palmitoylace vyskytující se u proteinů, u kterých je palmitát připojen thioesterovou vazbou na cysteinový zbytek. Označována je podle vazby přes thiolovou skupinu (Casey, 1995). Totožně připojena k proteinu nemusí být pouze kyselina palmitová, ale rovněž také 18 uhlíků dlouhá kyselina stearová a jiné vyšší nasycené mastné kyseliny. Obecnější označení této proteinové modifikace je tedy S-acylace (Chen et al., 2018). Labilní povaha thioesterové vazby umožňuje vysokou reverzibilitu acylace a enzymy mohou katalyzovat přidání nebo odstranění lipidu, což reguluje aktivitu proteinu (Jiang et al., 2018). Mezi S-palmitoylované proteiny patří například receptory spřažené s G proteiny (O'Brien a Zatz, 1984) nebo Ras proteiny (Chen et al., 1985).

Oproti tomu N-palmitoylace a O-palmitoylace patří mezi modifikace trvalé a nebyly zatím pozorovány u mnoha proteinů (Chen et al., 2018). U O-palmitoylace dochází k vazbě palmitátu na serinové nebo threoninové aminokyselinové zbytky esterovou vazbou (Chen et al., 2018). O-palmitoylace se nachází například na konzervovaných serinových zbytcích u Wnt proteinů. Wnt proteiny jsou sekretované signální proteiny hrající důležitou roli během vývoje i v dospělosti. Dochází zde k vazbě monosaturované mastné kyseliny palmitoolejové pomocí O-acyl transferázy nazývané Porcupine (Hofmann, 2000; Kadowaki et al., 1996). Palmitoylace Wnt proteinů je nezbytná pro jejich signalizaci (Franch-Marro et al., 2008; Willert et al., 2003). Lidský gen této acyl transferázy (PORCN) je lokalizovaný na X chromozomu a mutace v něm vedou k vzácnému genetickému onemocnění fokální dermální hypoplazie neboli Goltzově syndromu (Grzeschik et al., 2007). Toto onemocnění je charakteristické vadami kůže, kostry, očí a vývojovými defekty (Goltz, 1992). O-palmitoylace byla také pozorována na serinovém zbytku histonu H4 a dochází k ní pomocí lysofosfatidylcholin acyl transferázy I (Lpcat1). Tato epigenetická modifikace reguluje globální transkripční aktivitu, protože utlumení Lpcat1 či mutace v N-koncovém serinu vedly ke snížené syntéze mRNA (Zou et al., 2011).

N-palmitoylace je modifikace, během které dochází k připojení palmitátu amidovou vazbou na N-koncové cysteinové zbytky proteinu. Byla prokázána u sekretovaných signálních Hedgehog a Spitz proteinů. Rodina Hedgehog proteinů, což jsou sekretované morfogeny regulující růst a diferenciaci, podstupuje během svého zrání více lipidových modifikací. Maturovaný Hedgehog signální protein vzniká autokatalytickým štěpením prekurzorového polypeptidu. Následně je na C- konec maturovaného proteinu kovalentně připojen cholesterol a N-koncový cysteinový zbytek podléhá N-palmitoylaci (Mann a Beachy, 2004; Pepinsky et al., 1998). Obě tyto úpravy jsou nezbytné pro dlouhodobou účinnost signalizace (Chen et al., 2004; Gallet et al., 2006; Lee et al., 2001). Tento typ modifikace se ukázal být esenciální i u signalizace Sonic Hedgehog proteinů v lidských karcinomových buňkách (Konitsiotis et al., 2014). Bylo pozorováno, že abnormální Sonic Hedgehog signalizace má za následek proliferaci četných linií rakovinných buněk. Zajímavé je, že snížení palmitoylace katalyzované Hedgehog acyl transferázami (Hhat) (Buglino a Resh, 2008) vede ke snížení signalizace, proliferace a invazivity lidských rakovinných buněk (Thinon a Hang, 2015). Toto zjištění dělá z inhibice Hhat cíl k potlačení růstu tumoru (Konitsiotis et al., 2014).

Spitz protein, nacházející se u *Drosophila melanogaster*, je hlavním aktivátorem receptoru epidermálního růstového faktoru (EGF) a také podléhá N-palmitoylaci (Resh, 2006). Tato modifikace je nezbytná pro signalizaci zprostředkovanou EGF receptorem a podporuje asociaci Spitz proteinu s plazmatickou membránou. Snižuje také jeho sekreci z buňky, což může vést ke zvýšení lokální koncentrace tohoto proteinu a následné efektivní signalizaci a aktivaci EGF receptoru (Miura et al., 2006).

2.1. Mechanismus S-palmitoylace

Mechanismus zodpovědný za připojení palmitátu na protein byl objasněn až 30 let po objevení této posttranslační modifikace (Linder a Deschenes, 2003). Nyní je známo, že většinu proteinových palmitoylací mají na svědomí enzymatické reakce katalyzované evolučně konzervovanou rodinou proteinových acyl transferáz (PATs). Tyto enzymy katalyzující připojení palmitátu na cysteinové zbytky byly objeveny na počátku tohoto století (Jiang et al., 2018; Lobo et al., 2002; Roth et al., 2002).

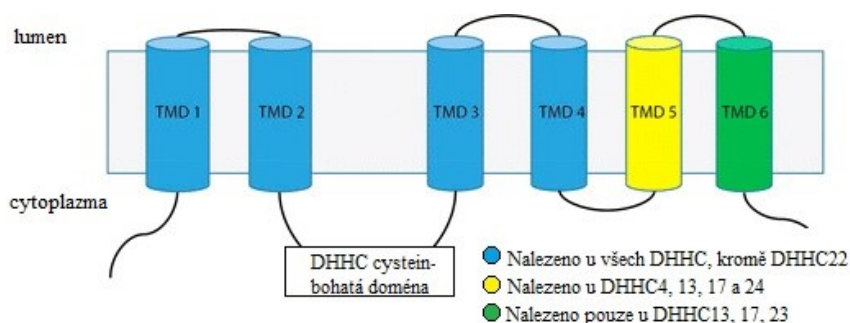
In vitro bylo ovšem prokázáno, že palmitoylace se může objevit i za nepřítomnosti specifické acyl transferázy. Jako donor acylové skupiny funguje palmitoyl-koenzym A (CoA) (Duncan a Gilman, 1996). Tento typ reakce se označuje jako neenzymatická či autokatalytická palmitoylace a *in vitro* byla pozorována u řady proteinů jako je SNAP-25 nebo u G α podjednotky (Chen et al., 2004; Ross a Braun, 1988; Tu et al., 1997).

Kromě autokatalytické palmitoylace byla u proteinu Ras2 ze *Saccharomyces cerevisiae* objevena také acyl transferáza provádějící acylaci Ras proteinů. Ta je kódována geny *erf2* a *erf4* (Lobo et al., 2002). Enzymový komplex Erf2-Erf4 byl shledán jako esenciální pro palmitoylaci Ras2 proteinu u *S. cerevisiae*. Katalytická aktivita se nachází pouze na Erf2, ale Erf4 je nezbytný pro stabilní expresi Erf2. Ve stejnou dobu byl protein Akr1 identifikován jako PAT u kvasinkové kaseinové kinázy Yck2 (Roth et al., 2002). Erf2 a Akr1 jsou homologní v jediné doméně a tou je tzv. DHHC (název domény odvozen od konzervované sekvence Asp-His-His-Cys) cystein-bohatá konzervovaná doména (DHHC-CRD), která je charakteristická pro palmitoyl transferázy (Jiang et al., 2018). V roce 2004 byl identifikován první savčí protein s palmitoyl transferázovou aktivitou modifikující cystein (Keller et al., 2004). Tento protein se nazývá GODZ nebo také DHHC3, ke kterému bylo v lidském genomu objeveno 23 homologních proteinů. U mnoha z nich již byla identifikována PAT aktivita a to napovídá, že DHHC proteiny by mohly obecně působit jako palmitoyltransferázy (Fukata et al., 2004; Jiang et al., 2018).

2.1.1. DHHC proteiny

Tyto proteiny mají několik transmembránových domén a konzervovanou DHHC-CRD směřující do cytoplazmy. Počet transmembránových domén se pohybuje od 4 (DHHC1, DHHC2) do 6 (DHHC13, DHHC17). Konzervovaná DHHC-CRD je umístěna uprostřed enzymu mezi transmembránovou doménou 2 a 3 (Jiang et al., 2018). N- a C- konce těchto domén odhalené do cytoplazmy zajišťují diverzitu DHHC proteinů. Ta umožňuje, aby konkrétní DHHC proteiny zajišťovaly

specifické funkce (Gottlieb a Linder, 2017). Tyto variabilní domény a sekvence na N- a C- konci zprostředkovávají interakci, která je klíčovým mechanismem interakce substrátu a PAT (viz obrázek 2).



Obrázek 2: Předpokládaná struktura domén DHHC proteinů.

TMD = transmembránová doména, DHHC = konzervovaná sekvence aspartát-histidin-histidin-cystein. (Upraveno podle Jiang et al., 2018).

Bylo prokázáno, že povaha aminokyselinových zbytků obklopujících palmitoylované místo je pro palmitoylaci klíčová. Bazické zbytky jsou pro ni nezbytné, hydrofobní ji podporují a kyselé zbytky aminokyselin tuto reakci inhibují (Bélanger et al., 2001). Přítomnost bazických aminokyselin může také podporovat interakci palmitátového donoru, protože jejich pozitivní náboje mohou reagovat se čtyřmi negativními náboji skupiny CoA (Bélanger et al., 2001; Duncan a Gilman, 1996). Důležitost charakteru okolních aminokyselinových zbytků potvrdilo i to, že například negativně nabitě fosfátové skupiny navázané na serin, který byl lokalizovaný nedaleko palmitoylované části β 2-adrenergního receptoru, inhibovaly inkorporaci palmitátu (Moffett et al., 1996). U palmitoylace proteinu PSD-95 záleží na povaze prvních 13 aminokyselin. Dva modifikované cysteiny jsou obklopeny hydrofobními zbytky a mutace těchto aminokyselin za hydrofilní vede k slabší modifikaci. Dalším takovým příkladem je palmitoylace SNAP23 pomocí DHHC15, i když SNAP23 není substrátem této acyltransferázy. K palmitoylaci zde dochází, pokud je cystein v pozici 79 v blízkosti palmitoylovaného cysteinu mutován na fenylalanin. Takto vzniklá mutanta Cys79Phe je vysoce podobná SNAP25b, který je běžným substrátem DHHC15 (Greaves et al., 2010).

Studie kvasinkových Erf2/Erf4 a savčích DHHC2 a DHHC3 odhalily, že DHHC proteiny sdílí tzv. dvoukrokový ping-pongový mechanismus acylace (Jennings a Linder, 2012; Mitchell et al., 2010). V prvním kroku se enzym rychle sám acyluje (palmitoyl-CoA využívá jako donor) a vytváří tzv. acyl-enzymový intermediát. Formování intermediátu záleží na konzervované DHHC doméně. Pokud je cystein zaměněn za serin, tak tato mutanta nemůže být acylována a napovídá to, že cystein je tou částí proteinu, kde dochází k palmitoylaci. Ve druhém kroku, který je pomalejší, je palmitát přesunut na cílový protein. Mutace prvního histidinu v doméně blokuje pouze druhý krok (Mitchell et al., 2010) a naznačuje to, že histidin je zapojen do přenesení acylové skupiny na substrát, ale není nezbytný pro tvorbu intermediátu acyl-enzym, zatímco mutace cysteinu blokuje autoacylaci v prvním kroku (Lobo et al., 2002). Tento

dvoukrokový kinetický mechanismus je obecně aplikovatelný u DHHC proteinů, nicméně González Montoro et al., 2015 poukázal na to, že minimálně dva kvasinkové DHHC proteiny, Swf1 a Pfa4, jsou schopny palmitoylace substrátu i za nepřítomnosti cysteinu v DHHC doméně. Celá tato reakce je energeticky neutrální a není zde potřeba žádný zdroj energie (Lobo et al., 2002).

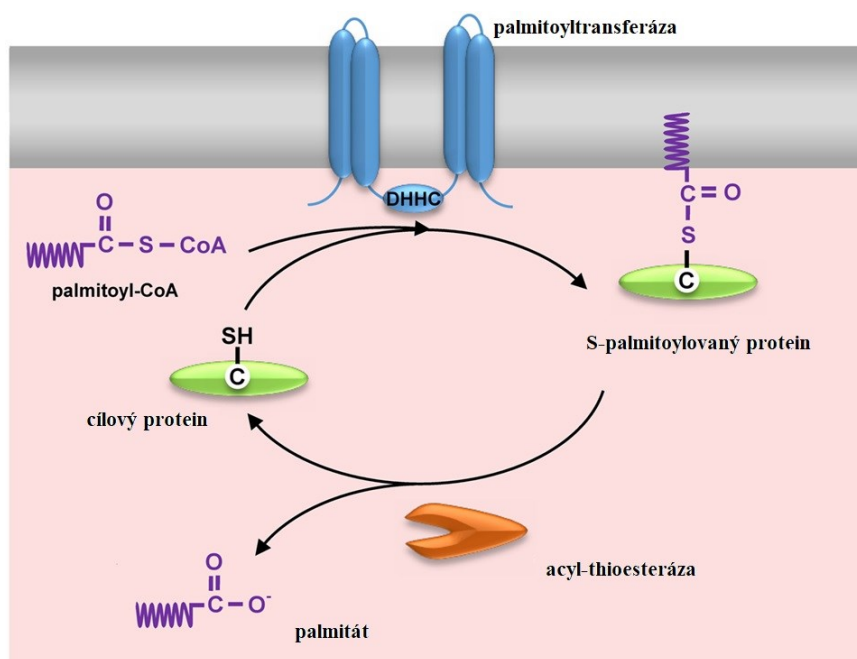
Je mnoho faktorů, které ovlivňují specifitu PATs. Jedná se o proteinové interakce domén, aminokyselinové složení nebo buněčnou lokalizaci. Obecně se dá říct, že DHHC proteiny mají překrývající se substrátovou specifitu, protože dojde-li k inaktivaci konkrétní PAT, ztráta palmitoylace se projeví na více kvasinkových proteinech (Roth et al., 2006). Již zmíněný kvasinkový Erf2 protein může palmitoylovat i jiné substráty než Ras, ale palmitoylace je mnohonásobně slabší. To ukazuje, že PATs mají vysokou preferenci pro určitý typ substrátu. Příkladem je tyrosin kináza Lck modifikována DHHC17 a DHHC18, případně PSD-95 modifikovaný DHHC2 a DHHC15. Dá se říct, že protein může být palmitoylován více než jedním DHHC proteinem, ale také existují příklady vysoké substrátové specifity jako je tomu u DHHC19 a jeho jediného substrátu R-Ras. Až krystalické struktury vnesou přesný pohled na interakce DHHC proteinů se substráty. Zatím bylo krystalizováno jen několik nekatalytických domén DHHC proteinů (Jiang et al., 2018). PATs nemají široké pole specifity jen u proteinových substrátů, ale také u acyl-CoA substrátů. Nejvíce preferovaným substrátem je palmitoyl-CoA, myristoyl-CoA a steroyl-CoA (Jiang et al., 2018). Nedostatek dat z hmotnostní spektrometrie určující identitu modifikace katalyzované DHHC proteiny, zanechává možnost, že i ostatní acylové skupiny mohou být připojovány touto rodinou PATs. Tato myšlenka je podpořena pozorováním, že i ostatní mastné kyseliny jako kyseliny arachidonová, stearová nebo palmitoolejová jsou k substrátům připojovány thioesterovou vazbou (Casey et al., 1994; Fujimoto et al., 1993; Hallak et al., 1994).

DHHC proteiny jsou lokalizovány v plazmatické membráně, endoplazmatickém retikulu (ER), Golgiho aparátu a v endozomálních membránách. Přesný mechanismus, podle kterého jsou DHHC proteiny takto rozmístěny, není dosud znám. Vnější stimuly mohou měnit lokalizaci DHHC enzymů. V dendritických buňkách se v dendritických trnech nachází protein PSD-95, který se po odstranění palmitoylace přesouvá zpět do těla neuronu, aby mohl být pomocí DHHC2 znovu palmitoylován a poslán znovu do trnu dendritu. Pokud je zablokována synaptická aktivita, DHHC2 váčky se přesouvají do blízkosti postsynaptické membrány a zvyšují hladinu palmitoylace u PSD-95, což vede k obnovení aktivity AMPA glutamátového receptoru a nastolení homeostázy (Noritake et al., 2009).

2.2. Regulace S-palmitoylace

Palmitoylace je vratná reakce, což naznačuje, že regulace proteinů je řízena po sobě jdoucími cykly palmitoylace a odstranění palmitoylu (viz obrázek 3). Za odstranění palmitoylu je zodpovědný enzym acyl-thioesteráza (Camp a Hofmann, 1993). Prvním izolovaným proteinem s touto aktivitou byla palmitoyl-protein thioesteráza (PPT1), což je lysozomální hydroláza štěpící acylové skupiny z modifikovaného cysteinu. Mutace v tomto proteinu způsobuje onemocnění zvané dětská neuronální ceroidní lipofuscinóza (Santavuori, 1988), což je progresivní encefalopatie způsobená akumulací

lipofuscinu ve tkáních. Toto onemocnění vede k oslepnutí, záchvatům a mozkové smrti v nízkém věku (Vesa et al., 1995). Studie prokázaly, že PPT1 je zodpovědná za správnou degradaci thioesterů u S-acylovaných proteinů (Lu et al., 1996). Dalšími dvěma známými cytosolickými acyl-thioesterázami, zodpovědnými za odstranění palmitoylu u mnoha S-acylovaných proteinů, jsou APT1 a APT2 (Jiang et al., 2018). Je pozoruhodné, že samy APT1 i APT2 podléhají palmitoylaci. Tato modifikace je cílí do plazmatické membrány, kde mohou odstraňovat acyly ze substrátových proteinů (Kong et al., 2013). Palmitoylace může být také trvalá modifikace, je tomu tak například u hemagglutininu viru žloutenky A, virového membránového glykoproteinu (Veit a Schmidt, 1993).



Obrázek 3: Dynamický proces S-palmitoylace. Palmitát z palmitoyl-CoA je pomocí palmitoyl transferázy z rodiny DHHC proteinů přenesen na thiolovou skupinu na cysteinovém zbytku. S-palmitoylované proteiny se stávají hydrofobní, což umožňuje jejich zakotvení do membrány. Acyl-thioesterázy odstraňují palmitoylovou skupinu a proteiny jsou přemístěny do cytoplazmy. (Upraveno podle Sobocińska et al., 2018).

Konzervovaná CRD u DHHC proteinů obsahuje mnoho palmitoylovaných cysteinových zbytků, které jsou odlišné od katalytického cysteinu. Tyto cysteiny se nachází mimo DHHC doménu a vytváří unikátní motiv, který byl nalezen u několika DHHC proteinů (Yang et al., 2010). Funkce modifikace těchto cysteinových zbytků a přesný mechanismus vyžadují větší prozkoumání. Může se jednat o důsledek autokatalytické aktivity nebo aktivity jiného DHHC proteinu (Abrami et al., 2017).

DHHC2 a DHHC3 proteiny vytváří homodimery, což snižuje jejich enzymovou aktivitu. Naznačuje to, že oligomerizace může být prostředkem regulace DHHC PAT aktivity u DHHC proteinů (Lai a Linder, 2013). Dalším možným regulačním mechanismem je fosforylace DHHC proteinů (Lievens et al., 2016), případně také interakce DHHC s dalšími proteiny. Příkladem je protein DHHC9, který vyžaduje pro svou správnou funkci protein GCP16 (Golgi complex-associated protein of 16 kDa). DHHC proteiny váží

v CRD oblasti ionty zinku. Zajímavostí je, že tyto cysteiny mohou podléhat také palmitoylaci. Vztah mezi navázáním zinku a palmitoylací cysteinových zbytků nacházejících se v této oblasti je nejasný, ale mohl by to být další regulační mechanismus.

2.3. Funkce S-palmitoylace

H-Ras, N-Ras a K-Ras jsou nejznámějšími lidskými Ras proteiny (Barbacid, 1987). Ras je malý GTP vazebný protein, který existuje v aktivním stavu s navázaným GTP a v neaktivním stavu s navázaným GDP. GEF (guanine nucleotide exchange factor) aktivuje Ras protein výměnou GTP za GDP (Chardin et al., 1993), kdežto GAP (GTPase-activating protein) inaktivuje Ras spouštěním hydrolyzy GTP na GDP (Mittal et al., 1996). Mnoho posttranslačních úprav reguluje aktivitu Ras (Ahearn et al., 2012). Ras proteiny jsou prenylovány na C-konci, nicméně to nestačí pro vytvoření dostatečné vazebné afinity k plazmatické membráně (Silvius a l'Heureux, 1994). Proto jsou potřeba další modifikace jako například palmitoylace cysteinu u H-Ras, N-Ras a K-Ras4A proteinů. H-Ras je palmitoylován na dvou místech (Chandra et al., 2012). Poté, co je Ras protein farnesylován i palmitoylován, dochází k jeho sortování do váčků a transportu do plazmatické membrány (Rocks et al., 2005). Poté dochází k odstranění palmitoylu pomocí acyl-thioesteráz (Dekker et al., 2010). Slabá vazebná afinita vede ke směřování Ras proteinů do Golgiho aparátu (Chandra et al., 2012), kde jsou znovu acylovány a poslány zpět na plazmatickou membránu. Tento dynamický cyklus acylace a následné odstraňování acylu pomáhá udržet Ras proteiny lokalizované na plazmatické membráně (Rocks et al., 2010).

S-palmitoylace může také regulovat stabilitu proteinu. To bylo ukázáno na proteinu Tlg1 u kvasinek, který hraje klíčovou roli v transportu proteinů Golgiho aparátem (Coe et al., 1999; Siniosoglou a Pelham, 2001). Tlg1 je palmitoylován acyl transferázou Swf1 (Valdez-Taubas a Pelham, 2005). Tato modifikace stabilizuje Tlg1 a zabraňuje jeho degradaci. Pokud k palmitoylaci nedochází z důvodu inaktivace Swf1 nebo mutace palmitoylovaného místa, dochází k ubikvitinaci Tlg1 a jeho degradaci (Valdez-Taubas a Pelham, 2005). S-palmitoylací je regulována stabilita i dalších proteinů. Palmitoylace receptoru CCR5 pro HIV stabilizuje membránovou lokalizaci tohoto receptoru (Percherancier et al., 2001). Další funkcí palmitoylace je zabránění agregace proteinu. Do povědomí přišla tato funkce palmitoylace ze studií Huntingtonovy choroby, která je způsobena mutací v genu pro huntingtin. Zdravý jedinec má v N-koncové oblasti tohoto proteinu 6-35 opakujících se glutaminových zbytků. Pacient s Huntingtonovou chorobou má v této oblasti více než 40 glutaminových zbytků. Tyto přebytečné glutaminy způsobují agregaci huntingtinu, který je primárním ukazatelem tohoto onemocnění (Landles a Bates, 2004). Nadměrná exprese DHHC17 účinně redukuje agregaci huntingtinu, proto by palmitoylace prováděná DHHC17 mohla přinést nové cíle léčby proti Huntingtonově chorobě (Yanai et al., 2006).

2.3.1. Biologické funkce DHHC proteinů

V objasnění funkční role palmitoylace byl zaznamenán velký pokrok, ale role DHHC enzymů zůstává málo pochopena. Mutace v těchto proteinech jsou spojovány s neurodegenerativními onemocněními jako je Huntingtonova choroba, Alzheimerova choroba nebo schizofrenie, s některými typy rakovinného

bujení, případně s některými vývojovými vadami. Funkce DHHC proteinů je spjata s proteinovými substráty, které modifikují a tím také regulují. Jelikož tyto substráty ještě nebyly ve většině případů kompletně identifikovány, je celkové pochopení biologických funkcí DHHC proteinů omezené (Jiang et al., 2018).

Jedním z nejstudovanějších případů je role DHHC17 v Huntingtonově chorobě. Ukázalo se, že protein huntingtin moduluje palmitoylaci samotného DHHC17 a ovlivňuje jeho enzymatickou aktivitu. Ztráta normální funkce huntingtinu, který nemůže regulovat palmitoylaci DHHC17, může přispívat k patogenezi v Huntingtonově chorobě (Huang et al., 2011). Protože většina substrátů DHHC17 je zapojena do neurologických procesů, ztráta huntingtinu nebo funkce DHHC17 vede k neurologickým defektům. Myši deficientní v DHHC17 vykazují stejné chování i neurologický fenotyp jako pacienti s Huntingtonovou chorobou (Sutton et al., 2013).

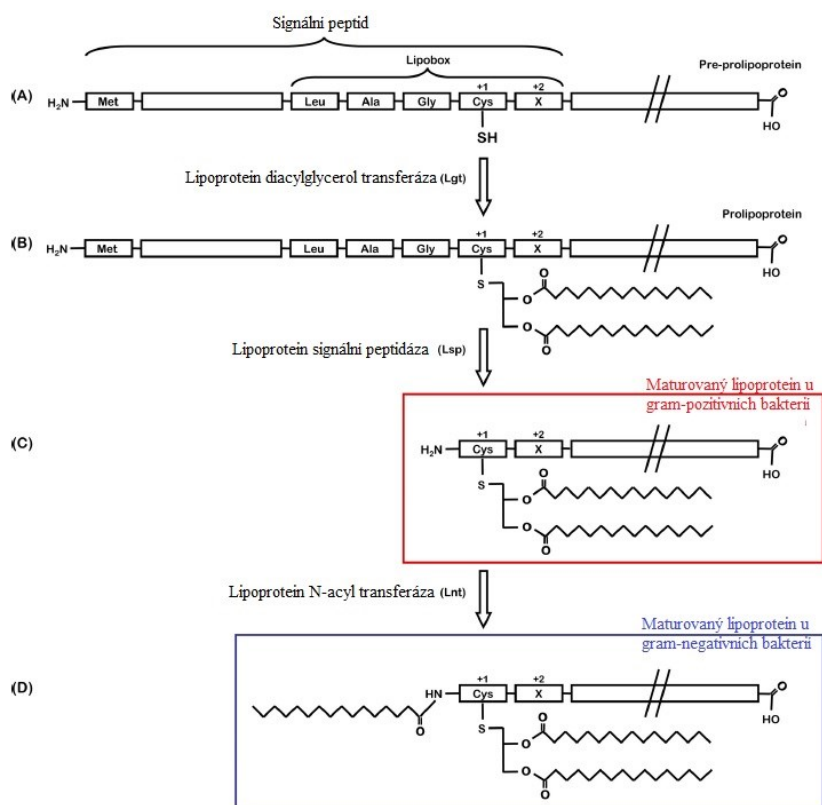
2.4. Palmitoylace u virů a bakterií

Viry nekódují palmitoyl transferázy, ale využívají mechanismy hostitelské palmitoylace pro modifikaci svých proteinů. S-palmitoylace byla u virového glykoproteinu objevena v roce 1979 (Schmidt et al., 1979). Nejvíce prostudovaná skupina virových palmitoylovaných proteinů se nachází mezi obalenými viry. Tyto viry mají na svém povrchu kromě kapsidy i dvouvrstevný obal z lipidů a glykoproteinů. Příkladem S-acylovaných transmembránových glykoproteinů jsou proteiny hemagglutinin a tzv. matrixový protein, přítomné v obalu viru chřipky. Matrixový protein na sebe váže také cholesterol (Kordyukova et al., 2008; Thaa et al., 2011).

Bakterie postrádají palmitoyl transferázy z rodiny DHHC a v podstatě se u nich nevyskytují S-palmitoylované proteiny. Naopak se u nich vyvinuly unikátní mechanismy využívající mastné kyseliny, jako kyselinu palmitovou, pro modifikace glykolipidů a proteinů. Tyto modifikace posilují infekčnost a pomáhají bakterii vyhnout se rozpoznání vrozeným imunitním systémem. Drtivá většina gram-negativních bakterií produkuje lipopolysacharid (LPS) jako část své vnější membrány. LPS se skládá z variabilního polysacharidového O-antigenu a více konzervovaného lipidu A obsahujícího dva glukosaminové zbytky. Lipid A je na plazmatické membráně hostitelských imunitních buněk rozpoznáván proteinem CD14 a TLR4 receptorem. Tato aktivace TLR4 vede k silné prozánětlivé odpovědi a může skončit až sepsí (Iwasaki a Medzhitov, 2004; Sobocińska et al., 2018). Začlenění řetězce palmitové kyseliny do lipidu A radikálně snižuje schopnost lipidu A aktivovat TLR4, indukovat prozánětlivou odpověď a zvyšuje tak šanci na přežívání bakterie v hostiteli. Tato strategie se vyskytuje například u *Salmonella typhimurium* a *Bordetella bronchiseptica* (Kawasaki et al., 2004; Preston et al., 2003). Reakce je katalyzovaná palmitoyl transferázou lokalizovanou na vnější membráně patogenů (Bishop, 2005; Bishop et al., 2000).

Bakterie produkují široké spektrum membránově vázaných proteinů modifikovaných N-koncovými lipidacemi, například palmitátem (Belisle et al., 1994). Bakteriální lipoproteiny jsou syntetizovány

vícetupňovými procesy, které katalyzuje unikátní skupina lipoproteinových enzymů Lgt (lipoprotein diacylglycerol transferáza), Lsp (lipoprotein signální peptidáza) a Lnt (lipoprotein N-acyl transferáza). Formování lipoproteinů začíná připojením diacylglycerolu thioesterovou vazbou na cysteinový zbytek. Tento cysteinový zbytek se nachází v tzv. lipoboxovém motivu v signální sekvenci v transmembránovém lipoproteinovém prekurzoru. Signální sekvence je následně sestřižena vedle modifikovaného cysteinu, který se stává N-koncem zralého proteinu (Kovacs-Simon et al., 2011). U gram-negativních bakterií často dochází ještě k připojení třetího řetězce mastné kyseliny, a to amidovou vazbou na aminoskupinu cysteinu (viz obrázek 4). Obdobná reakce probíhá u eukaryotních hedgehog proteinů. Takto dokončená lipidace u lipoproteinů zajišťuje kotvení k cytoplazmatické membráně. Gram-pozitivní bakterie produkující lipoproteiny jsou například *Streptococcus pneumoniae* a *Mycobacterium tuberculosis*. Z gram-negativních jsou to například *Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi* a *Treponema pallidum*. Lipoproteiny jsou klíčové pro virulenci těchto bakterií. Kontrolují adhezi a vstup bakterie do hostitelských buněk, případně chrání před proteolýzou a oxidativním stresem v hostitelské buňce (Houston et al., 2011; Kovacs-Simon et al., 2011).



Obrázek 4: Biosyntéza bakteriálních lipoproteinů. (A-C) Dvoukroková dráha u gram-pozitivních bakterií. (A-D) tříkroková dráha u gram-negativních bakterií. (A) Prekurzorem lipoproteinů je preprolipoprotein s N-koncovým signálním peptidem obsahujícím lipobox. (B) V průběhu zrání lipoproteinů je cysteinový zbytek v lipoboxu modifikován diacylglycerolem pomocí lipoprotein diacylglycerol transferázy (Lgt). Diacylglycerol slouží jako membránová kotva. (C) Po acylaci dochází k odštěpení signálního peptidu pomocí lipoprotein signální peptidázy (Lsp). U gram-pozitivních bakterií se z cysteinového zbytku stává nový N-konec a vzniká zralý lipoprotein. (D) U gram-negativních a některých gram-pozitivních bakterií se pomocí N-acyl transferázy (Lnt) ještě na N-koncový cystein připojuje amidovou vazbou mastná kyselina. (Upraveno podle Kovacs-Simon et al., 2011)

Bakteriální RTX (z anglického *repeats in toxin*) cytolysiny jsou důležitou skupinou proteinů, které jsou syntetizovány jako inaktivní protoxiny. Ty podléhají posttranslační acylaci pomocí toxin-aktivační acyl transferázy na ϵ -aminoskupině dvou konzervovaných lysinových zbytků. Pórtvorné RTX toxiny jsou důležitými faktory virulence některých gram-negativních patogenních bakterií. Vyskytují se například u bakteriálních rodů *Escherichia*, *Bordetella*, *Proteus*, *Morganella*, *Vibrio* a *Kingella* (Linhartová et al., 2010). RTX toxiny sdílí několik charakteristických vlastností. Mezi ně patří C-koncový sekreční signál rozeznávaný sekrečním systémem typu I. Ten umožňuje translokaci toxinu z bakteriálního cytosolu do okolního prostředí. Další společnou vlastností těchto toxinů jsou C-koncové domény bohaté na glycin a aspartát, které po navázání vápenatých iontů vytváří β -barelovou strukturu (Welch, 2001). RTX toxiny dále obsahují hydrofobní doménu vytvářející pór a také acylovanou doménu. Na ní dochází k posttranslační modifikaci lysinových zbytků kovalentním připojením řetězců mastných kyselin (Linhartová et al., 2010).

U adenylát cyklázového toxinu (CyaA) bakterie *Bordetella pertussis* byla nejdříve identifikována palmitoylace pouze na aminokyselinovém zbytku Lys-983 (Hackett et al., 1994). Tato acylace Lys-983 se ukázala jako nezbytná pro aktivaci CyaA (Basar et al., 2001). Po nadprodukci v *B. pertussis* byla tato modifikace detekována také na zbytku Lys-860 (Hackett et al., 1995). Pokud byl tento protoxin nadprodukován v *E. coli* společně s jeho aktivační acyl transferázou CyaC, byla pozorována jeho acylace převážně řetězci kyseliny palmitové a palmitoolejové. V malém množství byla pozorována také myristoylace (Basar et al., 2001, 1999; Osickova et al., 2020).

Acylace RTX toxinů je klíčová pro jejich veškeré známé cytotoxické aktivity (Barry et al., 1991; Osickova et al., 2018; Stanley et al., 1994). Nicméně přesný mechanismus, jakým se řetězce mastných kyselin podílejí na tvorbě pórů nebo na inzerci toxinu do membrány, zůstává prozatím neobjasněn (Osickova et al., 2020). Přítomnost řetězců mastných kyselin hraje roli při sbalování CyaA do biologicky aktivní konformace (O'Brien et al., 2019) a také při nevratné interakci CyaA s buněčným komplementovým receptorem 3 (CR3, také nazývaný CD11b/CD18, integrin $\alpha_M\beta_2$ nebo Mac-1) (El-Azami-El-Idrissi et al., 2003; Masin et al., 2005). Geny acyl transferáz aktivujících toxiny jsou mezi bakteriálními druhy vysoce konzervované a u některých acyl transferáz byla dokonce zaznamenána aktivace heterologních protoxinů. Příkladem může být aktivace leukotoxinu LktA *Pasteurella hemolytica* heterologními acyl transferázami HlyC a CyaC. Tento toxin, běžně aktivovaný acyl transferázou LktC, vykazoval stejnou aktivitu a specifitu jako po aktivaci příbuznou acyl transferázou. Tato reakce ale nefunguje recipročně. HlyA a CyaA aktivované acyl transferázou LktC nevykazovaly hemolytickou ani cytotoxickou aktivitu (Forestier a Welch, 1990; Westrop et al., 1997). Zatím ale nebylo určeno, proč jsou některé RTX protoxiny účinně aktivovány heterologními acyl transferázami a některé ne (Osickova et al., 2020). Tato studie prokázala, že příslušná RTX acyl transferáza je tím enzymem, který vybírá typ řetězce mastné kyseliny připojovaný na proRTXA protein. Příslušná acyl transferáza také rozhoduje o tom, zda u proRTXA bude modifikován pouze jeden lysinový zbytek nebo oba (Osickova et al., 2020). Tato tvrzení byla prokázána experimentem, ve kterém CyaA toxin aktivovaný acyl transferázou CyaC prokazoval acylaci především řetězci kyseliny

palmitové a palmitoolejové na Lys-860 a Lys-983. Zhruba 31% Lys-860 zůstalo pomocí CyaA nemodifikováno, Lys-983 byl acylován téměř kompletně (z 99%). V kontrastu s tím bylo měření, při kterém byl proCyaA produkován v přítomnosti acyl transferázy HlyC z *Escherichia coli* a následně RtxC z *Kingella kingae*. Pozorována byla pouze minimální acylace (0-1%) na Lys-860, kdežto druhé acylační místo na Lys-983 bylo těmito dvěma acyl transferázami acylováno kompletně. HlyC a RtxC ovšem modifikovaly Lys-983 kratšími řetězci mastných kyselin, a to kyselinou myristovou (C14) a hydroxymyristovou (C14-OH). Z toho vyplývá, že různé RTX acyl transferázy vykazují odlišnou selektivitu pro acylové zbytky rozmanitých délek, neboť CyaC preferovala pro acylaci téměř výhradně řetězce kyseliny palmitové a palmitoolejové. Data také ukazují, že RTX acyl transferázy lépe rozpoznávají a modifikují druhé, více konzervované, acylační místo (Osickova et al., 2020).

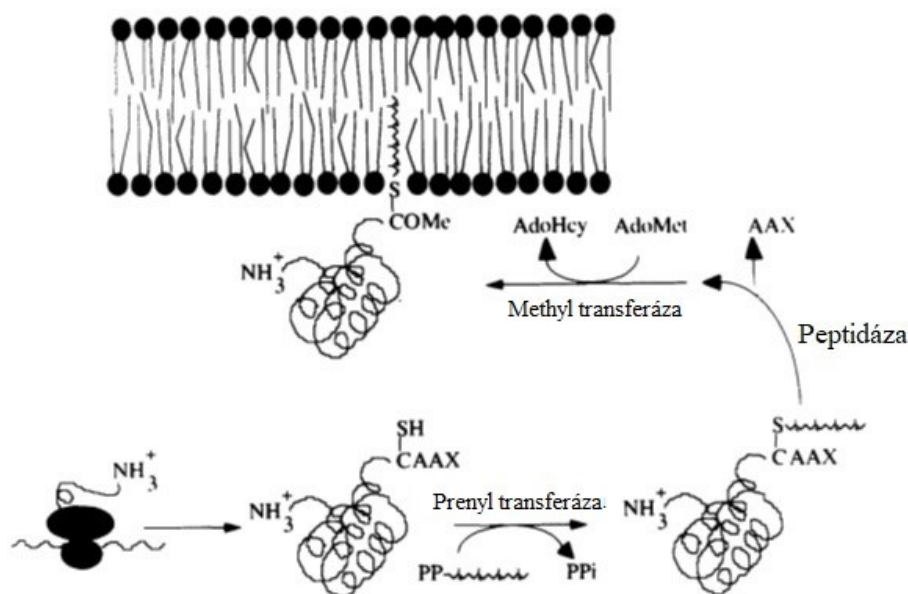
3. Prenylace

Prenylace je jedním z typů lipidových modifikací zahrnující kovalentní připojení izoprenoidních sloučenin farnesyly (C15) nebo geranylgeranyly (C20) na konzervované cysteinové zbytky na C-konci proteinu nebo blízko něj. Modifikace pomocí geranylgeranyly se vyskytuje častěji (Epstein et al., 1991; Rilling et al., 1990). Prenylaci podléhají více než 2% savčích proteinů (Epstein et al., 1991). Izoprenoidy představují skupinu sloučenin vytvořených z isopentenyl pyrofosfátu, který obsahuje pětiuhlíkatou izoprenoidní jednotku, stavební blok všech izoprenoidů (Zhang a Casey, 1996). První zmínky o tom, že izoprenoidy mohou modifikovat polypeptidy se začaly objevovat ve studiích na konci 70. a začátkem 80. let minulého století, a to na strukturách označovaných jako tzv. mating faktory u hub. První mating faktor obsahující prenylovou skupinu byl objeven u kvasinky *Rhodospiridium toruloides*, u které bylo prokázáno navázání farnesylové skupiny na cysteinový zbytek na C-konci proteinu (Clarke, 1992; Kamiya et al., 1978). Tato modifikace spočívá v připojení izoprenoidové sloučeniny pomocí thioetherové vazby. Tento typ vazby je pevnější než vazba thioesterová nebo esterová, proto se předpokládalo, že tato modifikace je nevratná. Ovšem v lysosomech byla popsána přítomnost prenylcystein lyáz, které mohou tento typ vazby štěpit a degradovat prenylované proteiny (Tschantz et al., 1999; L. Zhang et al., 1997).

Až objasnění biosyntézy cholesterolu položilo základní kámen pro odhalení prenylovaných proteinů u savců. Syntéza mevalonátu pomocí enzymu HMG-CoA (3-hydroxy-3-methylglutaryl-koenzym A) reduktázy je klíčový krok pro vznik cholesterolu. Mevalonová kyselina je prekurzorem sterolů, dolicholu, ubiquinonu a dalších izoprenoidových derivátů (Schroepfer Jr, 1981), ale také hraje roli v posttranslačních modifikacích proteinů (Schmidt et al., 1984). Objevení mevastatinu (compactinu) jako inhibitoru HMG-CoA reduktázy umožnilo studium metabolismu mevalonátu v buňkách (Endo, 1992). Bylo též odhaleno, že buňky kultivované v přítomnosti compactinu, ke kterým byla následně přidána exogenní radioaktivní kyselina mevalonová, mají do svých proteinů inkorporované metabolity této kyseliny (Schmidt et al., 1984). Jeden z takto prenylovaných proteinů byl identifikován jako jaderný lamin B (Beck et al., 1988), který je komponentou jaderné laminy. Lidský lamin B může být také modifikovaný farnesylem na cysteinových zbytcích pomocí thioetherové vazby (Farnsworth et al., 1989; Hancock et al., 1989).

Farnesylace byla popsána také u Ras proteinů (Hancock et al., 1989; Schafer et al., 1989), u kterých je nezbytná pro vznik onkogenních forem těchto proteinů (Casey et al., 1989; Schafer et al., 1989). Tyto objevy dramaticky zvýšily zájem o studium prenylace (Gibbs, 1991).

Kódující sekvence laminu B a Ras proteinů ukázala, že na C-konci těchto proteinů se vyskytuje motiv CAAX. Písmeno "C" zde představuje cysteinový zbytek, na který je připojován izoprenoid. "A" znamená alifatickou aminokyselinu a písmenem "X" byla označena nedefinovaná aminokyselina (Farnsworth et al., 1989; Powers et al., 1986). Tento motiv předpovídající prenylaci byl odhalen v proteinech od nižších eukaryot až po savce (Clarke, 1992; Schafer and Rine, 1992). Vyhledávání v databázích proteinových sekvencí odhalila mnoho dalších kandidátů, většinou z řad GTP-vazebných proteinů souvisejících s Ras proteiny (Hancock et al., 1989; Schafer et al., 1989), u kterých byla následně prenylace potvrzena experimentálně (Casey, 1992). Prenylace není jedinou posttranslační modifikací objevující se na CAAX motivu. Konkrétně, maturované formy prenylovaných proteinů po působení peptidázy v ER již neobsahují tři C-koncové aminokyseliny ("AAX") (Boyartchuk et al., 1997). Navíc mají na prenylcysteinu připojenou karboxymethylovou skupinu (Clarke, 1992; Dai et al., 1998). Výsledkem těchto tří kroků je produkce maturovaných proteinů s vysoce hydrofobním C-koncem (viz obrázek 5) (Casey, 1992).



Obrázek 5: C-koncová úprava prenylovaných proteinů.

Syntetizované proteiny obsahují CAAX motiv s cysteinem na čtvrtém místě od C-konce. Prenylace je katalyzována prenyl transferázou využívající jako donor prenyl difosfát. Podle toho, jaký aminokyselinový zbytek je na pozici "X" v motivu CAAX, je připojen farnesyl nebo geranylgeranyl. Po prenylaci jsou tři zbytky na C-konci odstraněny peptidázou a volná COOH skupina modifikovaného cysteinového zbytku je methylována pomocí S-adenosylmethioninu. AdoHcy = A-adenosylhomocystein, AdoMet = S-adenosylmethionin (Upraveno podle Casey, 1992).

3.1. Mechanismus prenylace

Prenylované proteiny lze podle modifikovaných substrátů rozdělit do dvou skupin (Glomset a Farnsworth, 1994). V první skupině jsou ty, které obsahují CAAX motiv (Clarke, 1992). Ty ze druhé skupiny se označují jako proteiny obsahující CC nebo CXC motiv a patří sem téměř výhradně proteiny z rodiny Rab, které se účastní vnitrobuněčného transportu vesikul (Novick a Brennwald, 1993). Jsou popsány tři enzymy katalyzující připojení izoprenoidu k proteinu. Prvním z nich je farnesyl transferáza (FT), druhým je geranylgeranyl transferáza typu I (GGT-I) a posledním je geranylgeranyl transferáza typu II (GGT-II).

3.1.1. Farnesyl transferáza a geranylgeranyl transferáza typu I

Farnesyl transferáza a geranylgeranyl transferáza typu I jsou si blízce příbuzné enzymy přenášející farnesylovou a geranylgeranylovou skupinu z farnesyldifosfátu a geranylgeranyldifosfátu na cysteinové zbytky u proteinů obsahující CAAX motiv (Yokoyama et al., 1991). Karboxylový konec v tomto motivu ("X") určuje, který izoprenoid bude k proteinu připojen (Casey et al., 1991). Pokud je "X" serin, methionin nebo glutamin, protein je rozpoznán FT. Leucin je na této pozici rozpoznáván GGT-I (Casey et al., 1991; Yokoyama et al., 1991).

Z řady kinetických a strukturních studií bylo vytvořeno schéma farnesylace. Reakce začíná vytvořením komplexu enzym-substrát, když dojde k navázání farnesyldifosfátu na β podjednotku FT. Následně dojde k navázání substrátu s CAAX motivem. Po dokončení reakce zůstává farnesylovaný produkt navázán tak dlouho, dokud ho nenahradí nový farnesyldifosfát. Tento krok omezuje rychlost reakce (Furfine et al., 1995; Tschantz et al., 1997). Komplex FT-farnesyldifosfát následně vstupuje do dalšího kola reakce (Furfine et al., 1995; Huang et al., 1997; Long et al., 2002; Pompliano et al., 1992). Geranylgeranylace katalyzovaná GGT-I probíhá obdobně (Stirtan a Poulter, 1997).

Farnesyl transferáza a geranylgeranyl transferáza typu I mají řadu velice podobných vlastností. Jsou to metaloenzymy, které vyžadují zinek pro navázání na protein (Reiss et al., 1992; Zhang et al., 1994), ale nikoli k navázání substrátu. Každý z těchto enzymů rozeznává jinou formu proteinu a váže jiný typ substrátu, FT také vyžaduje pro svou aktivitu Mg^{2+} , kdežto GGT-I nikoli (Reiss et al., 1992; Zhang a Casey, 1996).

Proces prenylace u proteinů s CAAX motivem zahrnuje tři kroky: prenylaci, proteolýzu a karboxymethylaci. Studie *in vitro* prokázala, že pouze 20% K-Ras proteinů asociovalo s membránou, pokud byly tyto proteiny farnesylovány, ale již u nich neproběhla proteolýza a karboxymethylace. Kdežto 60 - 80% K-Ras proteinů asociovalo s membránou, pokud u nich tyto dva kroky proběhly. Z toho vyplývá, že karboxylace u farnesylovaných proteinů zvyšuje jejich hydrofobicitu a podporuje asociaci s membránou (Hancock et al., 1991).

3.1.2. Geranylgeranyl transferáza typu II

Objev, že Rab proteiny, které ve většině případů neobsahují CAAX motiv a jsou i přes to modifikované geranylgeranyl izoprenoidem, přinesl možnost existence další prenyl transferázy (Kinsella et al., 1991). Enzym zodpovědný za tyto modifikace a využívající jako substrát Rab proteiny se nazývá geranylgeranyl transferáza typu II (Horiuchi et al., 1991; Moores et al., 1991). GGT-II přenáší dvě geranylgeranylové skupiny z geranygeranyldifosfátu na cysteinové zbytky na Rab proteiny s CC nebo CXC motivy procesem značně odlišným od těch s CAAX motivem (Seabra et al., 1992). Kromě toho proteiny s CXC motivem jsou methylovány na C-konci prenylcysteinu, kdežto proteiny s CC motivem methylovány nejsou (Smeland et al., 1994).

GGT-II vyžaduje pro svou funkci a navázání na substrát tzv. Rab escort proteiny (REP). U savců byly nalezeny dva REP proteiny, REP1 a REP2. Mutace v REP-1 genu je zodpovědná za choroideremii, což je dědičná degenerace sítnice způsobující ztrátu zraku (Andres et al., 1993; Seabra et al., 1993). Extrakt lymfoblastů od pacientů s choroideremií prokázal, že je u nich nefunkční GGT-II a nedochází tak k modifikaci proteinu Rab27a.

3.2. Funkce prenylace

Většina identifikovaných prenylovaných proteinů patří mezi proteiny eukaryotické. Mezi substrátové proteiny FT patří například Ras proteiny, jaderné laminy a Rheb proteiny. GGT-I katalyzuje modifikaci u Rac, Cdc42 a γ podjednotky heterotrimerních G proteinů. Většina Rab proteinů je dvojitě prenylována GGT-II (Seabra et al., 1992). Některé proteiny jako K-Ras, N-Ras a RhoB jsou substrátem pro FT a rovněž GGT-I (Reid et al., 2004; F. L. Zhang et al., 1997). Prenylová skupina je hydrofobní, tím pádem rekrutuje rozpustné proteiny do buněčných membrán (Glomset et al., 1990). Většina prenylovaných proteinů je lokalizována v buněčné membráně alespoň část jejich života a tato modifikace je nezbytná pro jejich membránovou asociaci (Zhang et al., 1994). U prenylace je důležité rozlišovat plazmatickou membránu od vnitřních membrán. Vnitřními membránami jsou myšleny membrány organel jako je ER, Golgiho aparát, endosomy, lysosomy a jádro. Pro spojení Ras proteinů s plazmatickou membránou je prenylace nezbytná. Bylo ukázáno, že mutace prenylovaného cysteinového zbytku nebo zablokování biosyntetické dráhy isoprenoidů zastavuje prenylací Ras proteinů a tím i jejich vazbu na plazmatickou membránu (Hancock et al., 1989). Prenylace je zodpovědná především za cílení proteinů do vnitřních membrán. Konkrétně proteiny s CAAX motivem jsou nejdříve směřovány do ER a Golgiho aparátu (Choy et al., 1999). Tato funkce prenylace vysvětluje, proč proteiny s CAAX motivem vyžadují pro lokalizaci na plazmatickou membránu ještě další úpravu nebo motiv membránového zacílení. Takovouto další úpravou může být palmitoylace poskytující větší hydrofobní afinitu k membránám nebo doména s bazickými aminokyselinami, která elektrostaticky interaguje s negativně nabitými hlavičkami fosfolipidů ve vnitřní vrstvě cytoplazmatické membrány. Jako příklad lze uvést protein H-Ras, který na C-konci podstupuje jak cysteinovou prenylací, tak i cysteinovou palmitoylací. Téměř 90 % H-Ras proteinu divokého typu asociuje s cytoplazmatickou membránou. U nemodifikovaného H-Ras proteinu asociuje

s cytoplazmatickou membránou pouze 8% proteinu. Z tohoto vyplývá, že obě modifikace jsou nezbytné pro uchycení tohoto proteinu do cytoplazmatické membrány (Hancock et al., 1990).

3.3. Prenylace u virů a bakterií

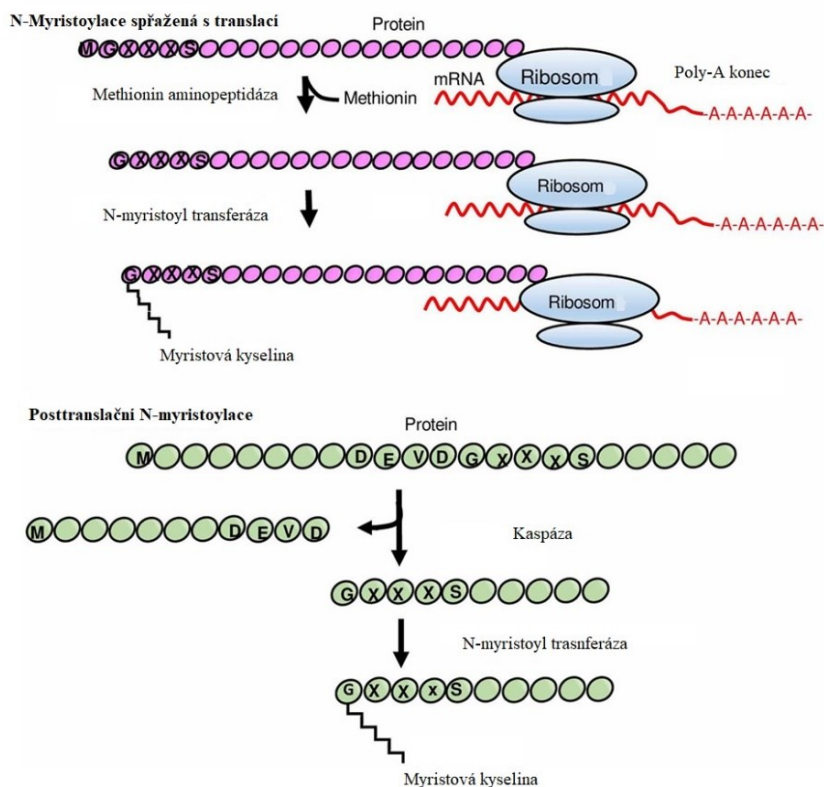
K prenylaci hostitelskými prenyl transferázami dochází také u virových proteinů obsahujících C-koncový motiv CAAX. Příkladem může být prenylace tzv. velkého antigenu viru hepatitidy D, u kterého je tato modifikace klíčová pro správné skládání viru (Lee et al., 1994). Ukázalo se, že inhibitory prenylace zabraňují formování virových partikulí a snižují množství viru hepatitidy D u člověka (Bordier et al., 2002).

Bakteriální efektorové proteiny s C-koncovými motivy CAAX byly také shledány jako prenylované pomocí hostitelských prenyl transferáz. Filament A ze *Salmonella typhimurium* obsahuje na C-konci motiv geranylgeranylovaný hostitelovou GGT-I (Reinicke et al., 2005). Farnesylovaný C-koncový motiv ankyrinu B z *Legionella pneumophila* probíhá pomocí hostitelovy FT. Tato modifikace upevňuje ankyrin B do membrán vakuol nutných pro rozmnožování této bakterie (Price et al., 2010). Také další efektorové proteiny bakterie *Legionella pneumophila* s CAAX motivem jsou v hostiteli prenylovány, což jim usnadňuje cílení do hostitelských organelových membrán v procesu vnitrobuněčné infekce (Ivanov et al., 2010).

4. Myristoylace

Dalším typem posttranslační acylace je N-koncová myristoylace. Takto modifikované proteiny mají na N-koncových glycinových zbytcích amidovou vazbou připojený řetězec kyseliny myristové (mastná kyselina s řetězcem nesoucím 14 uhlíků) (Farazi et al., 2001a; Jiang et al., 2018). Obecně je myristoylace nevratnou modifikací, která probíhá společně s translací (Deichaite et al., 1988) po odstranění iniciačního methioninového zbytku (Johnson et al., 1994). Tato modifikace se na proteinech vyskytuje také posttranslačně (viz obrázek 6) jako například v případě proapoptického proteinu BID, u kterého proteolytické štěpení kaspázou-8 odhalilo dosud skrytý motiv myristoylace. Odhalený N-koncový glycinový zbytek BID proteinu je myristoylován, čímž dochází k cílení proteinu do vnější mitochondriální membrány. Následně dojde k uvolnění cytochromu C a buněčné smrti (Zha et al., 2000). Myristoylace podporuje pouze slabé a vratné interakce proteinu s membránou nebo s dalším proteinem (Murray et al., 1997; Peitzsch a McLaughlin, 1993). Některé proteiny (například MARCKS, Src) využívají pro asociaci s membránou nejen myristát, ale také elektrostatické interakce mezi pozitivně nabitými proteinovými řetězci a negativně nabitými membránovými fosfolipidy (McLaughlin a Aderem, 1995). Dále existuje skupina proteinů, které posttranslačně podstupují myristoylaci a následně ještě kovalentní připojení jednoho nebo dvou řetězců kyseliny palmitové. Příklady těchto dvojité acylovaných proteinů jsou například členové rodiny Src tyrosinových kináz (Fyn, Lck), α podjednotky heterotrimerních G proteinů nebo syntáza oxidu dusnatého (Dunphy a Linder, 1998). Cysteinový zbytek těchto proteinů podléhá palmitoylaci, která je vratná a slouží tak jako regulační mechanismus interakcí těchto N-koncově

myristoylovaných proteinů s buněčnými membránami a dalšími proteiny (Resh, 1999). Dvojitá acylace nejenom umožní pevnou interakci s membránou, ale také ovlivňuje umístění proteinů do mikrodomén (Oh a Schnitzer, 2001), jako například dvojitá acylace tyrosinkináz Fyn a Lck v lymfocytech (Kabouridis et al., 1997; Webb et al., 2000).



Obrázek 6: **Schématické znázornění N-myristoylace proteinů.** Na prvním obrázku je znázorněna N-myristoylace spřažená s translací. Po odstranění iniciačního methioninu methionin aminopeptidázou, je připojen myristát na N-koncový glycinový zbytek pomocí N-myristoyl transferázy. Na druhém obrázku je znázorněna posttranslační N-myristoylace. Proteiny po translaci nejdříve podléhají sestřížení proteázou, dochází k odhalení glycinového zbytku, na který je kovalentně připojen myristát pomocí N-myristoyl transferázy. (Upraveno podle Martin et al., 2011; Udenwobele et al., 2017).

4.1. N-myristoyl transferáza

Myristoylace na N-konci proteinů je katalyzována N-myristoyl transferázou (NMT), která využívá jako donor myristoyl-CoA (Dyda et al., 2000). Mutace alely *nmt1* u *Saccharomyces cerevisiae* způsobily letalitu (Duronio et al., 1989). Stejně se projevíly mutace NMT u *Drosophila melanogaster* a *Candida albicans* (Ntwasa et al., 2001; Weinberg et al., 1995). U savců (člověk, myš, tur domácí) byly objeveny dvě funkční NMT (NMT1 a NMT2) (Farazi et al., 2001a; Giang a Cravatt, 1998). Odlišnost N-koncových domén u NMT1 a NMT2 vede k rozdílné buněčné lokalizaci (Glover et al., 1997). Kvůli své nepostradatelnosti pro přežití některých lidských patogenů (například *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*), představují NMT atraktivní terapeutický cíl (Farazi et al., 2001; Weinberg et al., 1995).

Bylo identifikováno několik tříd inhibitorů NMT včetně analogů myristátu a myristoyl-CoA (Cordo et al., 1999; Harper et al., 1993; Paige et al., 1989).

Lidské NMT1 a NMT2 mají 76% sekvenční identitu a částečně se překrývající substrátovou selektivitu (Giang a Cravatt, 1998). N-koncový úsek lidských NMT se skládá ze sekvencí bohatých na bazické aminokyseliny (tzv. K-box). Ten je klíčový pro cílení do ribozomů, kde probíhá myristoylace spřažená s translací (Glover et al., 1997). Zatímco pro buněčnou proliferaci je důležitá funkce NMT1, buněčné přežívání je regulováno NMT1 i NMT2 (Ducker et al., 2005). Lidské NMT jsou umístěny převážně v cytoplazmě (McIlhinney a McGlone, 1996). Štěpení kaspázou reguluje v buňce lokalizaci NMT. Odstranění lysin bohatých oblastí z NMT1 kaspázou-3 nebo kaspázou-8 vede k translokaci NMT1 z ribozomů a buněčných membrán do cytosolu. Naopak štěpení NMT2 kaspázou-3 vede k přesunu tohoto enzymu z cytosolu do membrány (Perinpanayagam et al., 2013).

4.2. Mechanismus myristoylace

Myristoylace probíhá tzv. ping-pongovým mechanismem. Myristoyl-CoA se nejdříve naváže na apoNMT (část enzymu, která s koenzymem vytváří kompletní enzym) a způsobí konformační změnu, aby mohlo dojít k navázání proteinu. Vytvoří se tříčlenný komplex NMT-myristoyl-CoA-protein. N-koncový glycin nukleofilně atakuje thioesterovou vazbu myristoyl-CoA a dochází k přenesení acylu. Volný CoA je uvolněn, následován myristoylovaným proteinovým produktem (Farazi et al., 2001; Rudnick et al., 1991). Velmi hojný palmitoyl-CoA je také schopný vázat NMT, nicméně katalytická účinnost je mnohem nižší než u myristoyl-CoA (Bhatnagar et al., 1997).

4.3. Funkce myristoylace

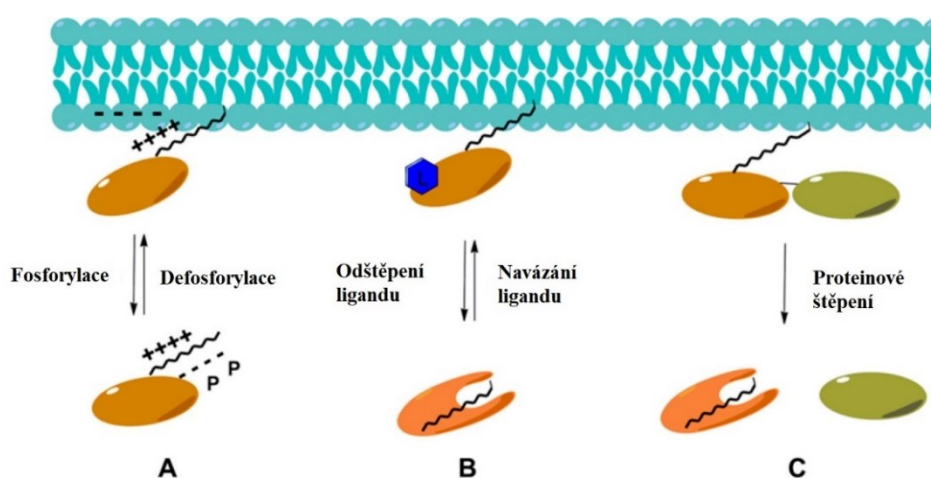
4.3.1. Buněčná lokalizace a cílení do membrán

Myristoylace N-koncového glycinu zprostředkovává cílení modifikovaných proteinů do různých membrán (plazmatické membrány, ER, Golgiho aparátu, mitochondriální membrány, jaderné membrány). Ovšem jak již bylo zmíněno, samotná myristoylace je při cílení do membrán málo účinná a je vyžadován další signál. Tímto signálem může být jiná lipidová modifikace (palmitoylace nebo prenylace cysteinového zbytku) nebo přítomnost bloků pozitivně nabitých aminokyselin (Maurer-Stroh et al., 2004). Myristoylace tedy může působit jako tzv. myristoylový vypínač ("myristoyl switch") (viz obrázek 7), kterým je membránová asociace proteinů regulována za pomoci fosforylace nebo ligandu jako jsou vápenaté ionty nebo GTP (McLaughlin a Aderem, 1995). Fosforylace může snížit elektrostatické interakce mezi proteinem a fosfolipidovou membránou, což vede k disociaci proteinu od membrány (McLaughlin a Aderem, 1995; Swierczynski a Blackshear, 1996).

GTP a vápenaté ionty mohou naopak podporovat navázání myristoylovaných proteinů do membrány (Liu et al., 2009; Tanaka et al., 1995). Tento mechanismus se objevuje např. u recoverinu, což je vápníkový senzor podílející se na vidění. Recoverin naváže vápník, což vede k odhalení myristoylové skupiny a navázání tohoto proteinu na membránu tyčinky. Absence vápenatých iontů vede k ukrytí myristoylované

části (Ames et al., 1996). Podobně to funguje u proteinu ARF (ADP-ribosylation factor), u kterého je výměna GDP za GTP regulována guanin nukleotid výměnným faktorem (GEF). Výměna indukuje konformační změnu, která zacílí GTP vazebný protein ARF na membránu (Goldberg, 1998; Liu et al., 2009).

Proteolýza může také ovlivňovat myristoylový vypínač (Hermida-Matsumoto a Resh, 1999). Gag je strukturální protein exprimovaný v pozdní fázi životního cyklu viru HIV, který zapříčiňuje pučení nově syntetizovaných HIV virionů. Tento protein je syntetizován jako prekurzor (Pr55Gag) a odhalená myristoylová skupina u něj způsobuje navázání na membránu. Po odštížení proteázou je myristoylovaná část oddělena a Gag protein je uvolněn z membrány (Hermida-Matsumoto a Resh, 1999; Tang et al., 2004).



Obrázek 7: **Mechanismus myristoylového vypínače ("myristoyl switch").** (A) Fosforylace N-myristoylovaného proteinu vede k přerušení elektrostatických interakcí mezi fosfolipidy v membráně a proteinem. Dochází k disociaci proteinu. (B) Navázání ligandu (Ca^{2+} , GTP) podporuje asociaci myristoylovaných proteinů s membránou. (C) Proteolýza vede k odštěpení myristoylovaného proteinu od membrány. L – ligand, P - fosfát. (Upraveno podle Jiang et al., 2018).

N-koncová myristoylace nefunguje pouze pro kotvení do membrán, ale také u specifické lokalizace určitých transmembránových proteinů. Například NADH-cytochrom b5 reduktáza je integrální membránový protein, jenž může být cílen do vnější mitochondriální membrány i ER. Myristoylace je nepostradatelná pro cílení tohoto proteinu do vnější mitochondriální membrány, zatímco mutanty, které nebyly modifikované byly lokalizovány pouze v ER (Borgese et al., 1996).

4.3.2. Regulace proteinových interakcí a enzymové aktivity

CAP-23/NAP-22 je substrát protein kinázy C vyskytující se v mozku. Fosforylace CAP-23/NAP-22 protein kinázou C je regulována navázáním kalmmodulinu. Myristoylová skupina a devět bazických aminokyselin na N-konci CAP-23/NAP-22 jsou nezbytné pro úspěšnou interakci tohoto proteinu s kalmmodulinem (Takasaki et al., 1999). Myristoylace na N-konci se také objevuje na proteinu

GRASP (Golgi reassembly stacking protein), který je zodpovědný za podobu Golgiho aparátu. GRASP podléhá myristoylaci, která je klíčem pro udržování struktury Golgiho aparátu, protože ovlivňuje orientaci GRASP a způsobuje správnou interakci mezi dvěma GRASP proteiny na sousedních membránách (Bachert a Linstedt, 2010; Heinrich et al., 2014).

Myristoylace negativně reguluje aktivitu tyrosinkinázy c-Abl, která je příbuzná rodině Src tyrosinkináz a obsahuje kromě kinázové domény ještě domény SH2 a SH3 (Boggon a Eck, 2004). Myristoylace N-koncového glycinu udržuje c-Abl v inaktivním stavu. Myristát se naváže do hydrofobní kapsy v kinázové doméně, což způsobí konformační změnu na C-konci kinázové domény a umožní navázání SH2 a SH3 domény na kinázovou doménu. Dochází tak ke vzniku samoinhibiční konformace tyrosinkinázy (Nagar et al., 2003). Naopak myristoylace tyrosinkinázy c-Src reguluje její aktivitu pozitivně (Patwardhan a Resh, 2010).

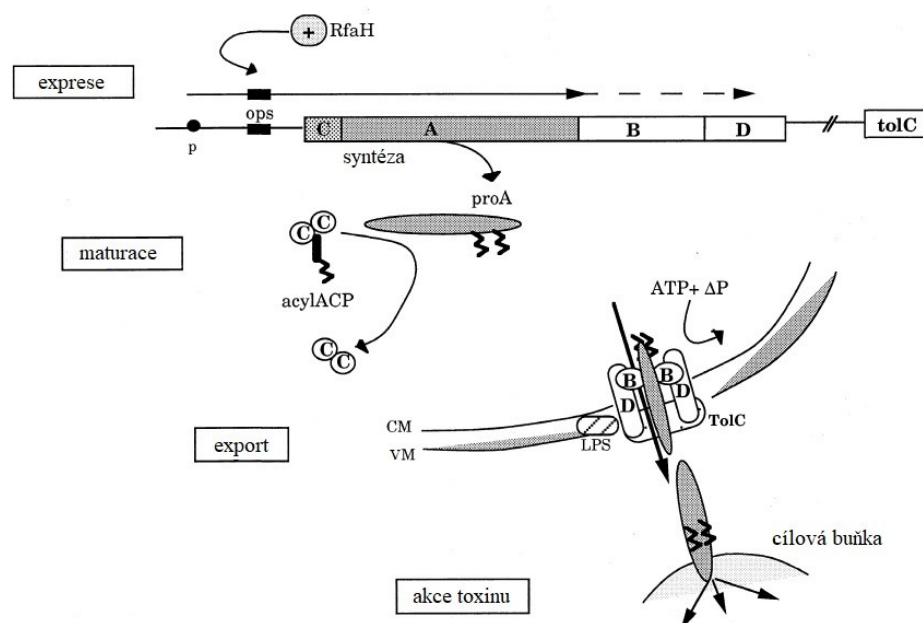
4.4. Myristoylace u bakterií a virů

Některé viry a bakterie využívají hostitelskou myristoylaci pro úspěšnou kolonizaci hostitele. Studie ukázaly, že N-myristoylace určitých virových proteinů hostitelskou NMT je klíčová pro formování virových partikulí (Bryant a Ratner, 1990; Hill a Skowronski, 2005; Rein et al., 1986). Například myristoylace strukturního proteinu Gag u HIV-1 je důležitá pro jeho asociaci s plazmatickou membránou a sbalování do partikulí (Bryant a Ratner, 1990; Rein et al., 1986, p. 65). HIV partikule, u kterých byl N-koncový glycin mutován na alanin, nebyly schopny produkovat nové virové částice. Toto zjištění ukazuje, že nemyristoylované Gag mutanty nejsou schopny vytvářet aktivní virové partikule (Li et al., 2007). Z toho důvodu by enzym NMT mohl fungovat jako cíl protivirových léků (Mousnier et al., 2018).

U invazivního plasmidového antigenu J patogenní bakterie *Shigella flexneri* byla prokázána aktivita odstraňující myristoylaci, čímž dojde ke zničení Golgiho aparátu v hostitelských buňkách. Tento plasmidový antigen J je cysteinovou proteázou, která rozpoznává a štěpí amidovou vazbu za glycinem a asparaginem na N-konci myristoylovaného proteinu. Tato proteáza štěpí řadu myristoylovaných proteinů zapojených do buněčného růstu, signalizace a funkce organel. Poskytuje tím nový mechanismus inhibice hostitelské sekrece bakteriálním patogenem (Burnaevskiy et al., 2013).

Hemylosin (HlyA) z *Escherichia coli* je RTX toxin vytvářející póry. Protoxin, proHlyA, je myristoylován na lysinových zbytcích (Lys564 a Lys690) a tato modifikace je pro aktivitu toxinu nezbytná (Stanley et al., 1998). Syntéza, maturace a sekrece HlyA je určena operonem *hlyCABD* (Felmlee et al., 1985; Koronakis a Hughes, 1996). K lipidaci proHlyA je potřeba speciální acyl transferáza HlyC využívající myristoylovou skupinu připojenou na ACP (acyl carrier protein) jako donor acylu (Hardie et al., 1991; Hughes et al., 1992). Na protoxinu HlyA byly nalezeny dvě nezávislé domény rozpoznávané HlyC. Každá z domén pokrývá jeden konzervovaný cílový lysinový zbytek v acylovaném úseku. Domény se skládají z 15-30 aminokyselinových zbytků nutných pro základní rozpoznání (cca 10%) acyltransferázou HlyC a z 50-80 zbytků sloužících pro úplnou acylaci konzervovaných lysinů (Stanley et al., 1998). HlyA je

sekretován přes obě membrány sekrečním systémem typu I a za pomoci signální sekvence na C-konci proteinu (Nicaud et al., 1986; Stanley et al., 1991). Pro úspěšnou sekreci HlyA z bakterie jsou dále zapotřebí proteiny HlyB (ATPáza na vnitřní straně membrány, HlyD (protein přes obě membrány) a TolC (protein na vnější straně membrány) (viz obrázek 8) (Nicaud et al., 1986; Schülein et al., 1992; Wandersman a Delepelaire, 1990; Wang et al., 1991).



Obrázek 8: **Syntéza, maturace a export hemolysinu u bakterie *Escherichia coli*.** Protein RfaH a sekvence ops spolupracují a umožňují transkripci operonu hly. Gen hlyA kóduje neaktivní prohemosin, který je aktivován acyltransferázou HlyC. HlyA je sekretován z buňky sekrečním systémem I. hlyCABD – operon zajišťující syntézu, maturaci a sekreci HlyA. RfaH – elongační protein, ops – operon polarity suppressor, p – promotor, proA – protoxin HlyA, CM – cytoplazmatická membrána, VM – vnější membrána, acylACP – acyl-acyl carrier protein, CC – HlyC, LPS – lipopolysacharid, B – HlyB (ATPáza na vnitřní straně membrány), D – HlyD (protein skrz obě membrány), TolC (protein na vnější straně membrány), ATP – adenosintrifosfát, ΔP – celková protonmotivní síla (Upraveno podle Koronakis and Hughes, 1996; Stanley et al., 1998).

5. Lipidové skupiny připojené nepřímo k proteinové kostře

5.1. Bakteriální fosfopanteteinylované proteiny

Jedním z nejběžnějších proteinů v *E. coli* je ACP (acyl carrier protein), který je důležitým příkladem proteinu, na který se nepřímo napojuje acylová skupina. ACP je nezbytný při syntéze mastných kyselin (Magnuson et al., 1993). Kovalentně váže mastné kyseliny a vzniklé ACP thioestery jsou enzymy rozpoznávány jako substráty. Acylové intermediáty syntézy mastných kyselin jsou thioesterovou vazbou napojené na thiolovou skupinu 4'-fosfopanteteinu, který je fosfodiesterovou vazbou připojen na serinový zbytek ACP. Sulfhydryl na fosfopanteteinu je jedinou thiolovou skupinou nacházející se na ACP a bez ní je tento apoprotein inaktivní (Magnuson et al., 1993; Rock a Cronan, 1979). Holo- ACP syntáza přenáší 4'-fosfopantetein z CoA na apo-ACP a vytváří tak holo-ACP (Lambalot a Walsh, 1997). ACP se podílí

na acylaci bakteriálních toxinů z rodiny tzv. RTX proteinových toxinů (Hughes et al., 1992), figuruje jako donor řetězců mastných kyselin při syntéze fosfolipidů (Rock a Jackowski, 1982) a lipidu A, což je komponenta lipopolysacharidu (Anderson a Raetz, 1987). Homology ACP z *E. coli* se objevují jako integrální domény velkých multifunkčních enzymů jako je například eukaryotická syntáza mastných kyselin. ACP je také nutný u syntézy polyketidů (Shen et al., 1992). U bioluminiscenční bakterie *Vibrio harveyi* je ACP zdrojem řetězců mastných kyselin pro bioluminiscenci (Byers a Meighen, 1985).

5.2. Glypiace

Poslední třídou lipidovaných proteinů jsou ty, které jsou nepřímo spojené s řetězcem mastných kyselin pomocí GPI kotvy (glykosylfosfatidylinositol). Kotva se skládá z vlastního fosfolipidu, oligosacharidového řetězce a ethanolaminu, přes který je amidovou vazbou připojen protein. GPI kotva je na C-koncový zbytek cílových proteinů vázána v endoplazmatickém retikulu pomocí GPI transamidázy (Englund, 1993). Většina takto označených proteinů končí na povrchu buňky. V mnoha případech obsahuje inositolový kruh další lipidovou modifikaci ve formě esterově vázané palmitové kyseliny. Proteiny s GPI kotvou jsou hojné na buněčných površích u nižších eukaryot, jako jsou například kvasinky. Slouží k membránové signalizaci a příjmu živin. Proteiny s GPI kotvou zahrnují například hydrolytické enzymy, receptory, adhezivní molekuly a komplementové inhibitory (Englund, 1993; Fankhauser et al., 1993; Stanley et al., 1998).

6. Závěr

Vědci se zpočátku domnívali, že velikost genomu (tzv. C-hodnota) je přímo úměrná počtu genů a organismy s větším genomem by měly mít přirozeně větší proteom a lepší morfologickou komplexitu. Nicméně v roce 1951 bylo prokázáno, že velikost genomu nekoreluje s komplexitou organismu a vznikl pojem paradox C-hodnoty (Mirsky a Ris, 1951). V posledních desetiletích je snaha pomocí biochemických a genomových metod rozřešit tento paradox a ukázalo se, že genomová velikost je úzce spjata s množstvím vysoce repetitivních a nekódujících sekvencí, které se nepřepisují do dalších generací. Proteinové komplexity u člověka a ostatních vyšších obratlovců je docíleno transkripčními a posttranslačními modifikacemi. U obratlovců se objevuje několik epigenetických mechanismů regulujících genovou expresi. Díky alternativnímu sestřihu může jediný gen kódovat řadu transkriptů a ve spojení s kotranslačními a posttranslačními modifikacemi obrovsky vzrůstá schopnost genomu reagovat na vnitřní i vnější podmínky. U lidí se odhaduje, že 20 000 genů produkuje pomocí alternativního sestřihu zhruba 100 000 proteinů, které podléhají rozsáhlým posttranslačním modifikacím jako je přidání fosfátu, methylové skupiny nebo sacharidu (Udenwobele et al., 2017). Posttranslační modifikace mění proteinovou lokalizaci, stabilitu a funkci. Proteinová acylace neboli lipidace představuje jednu důležitou a rozmanitou třídu posttranslačních modifikací. Takto modifikované proteiny mají větší afinitu k lipidovým membránám a lipidace signálních proteinů Hedgehog, Wnt a Ras je nezbytná pro jejich normální funkci. Některé z takto modifikovaných proteinů figurují také při rakovinném bujení. Enzymy regulující proteinovou acylaci by mohly sloužit jako cíle protirakovinných léků.

Při acylaci jsou proteiny kovalentně modifikovány různými lipidy včetně mastných kyselin, isoprenoidů a cholesterolu. Acylace je zapojena do celé řady buněčných procesů a biosyntetických drah. Je jí dosaženo různými mechanismy, které se navzájem liší modifikovaným aminokyselinovým zbytkem, acylovým donorem a také samotným acylem. Acylace má hned několik funkcí, ať už je to cílení proteinů, zvyšování hydrofobicity za účelem asociace proteinu s membránou a acylace také bývá prvním krokem ze série dalších reakcí vedoucích ke zrání proteinu. V neposlední řadě také zvyšuje proteinovou stabilitu a má vliv na sekundární a terciární strukturu proteinu. Palmitoylace je reverzibilní modifikace proteinu, při níž dochází k připojení palmitátu na aminokyselinový zbytek. Jedná se o jednu z nejčastějších posttranslačních úprav. V savčích buňkách jsou za ni zodpovědné acyl transferázy z DHHC rodiny proteinů. Při prenylaci dochází ke kovalentnímu připojení farnesyly nebo geranylgeranylu na cysteinový aminokyselinový zbytek. Myristoylace je typ acylace, při níž se na protein připojuje řetězec kyseliny myristové. Acylace také slouží k aktivaci bakteriálních toxinů a lipoproteinů. Lipidové skupiny se mohou na proteinovou kostru připojovat také nepřímou. Příkladem může být GPI kotva spojující protein s fosfolipidy.

Přesné mechanismy a funkce proteinové lipidace nejsou prozatím detailně popsány. Je zapotřebí dále provádět základní výzkum, který nám objasní jednotlivé kroky acylace, které jsou nezbytné pro celkové pochopení konečných funkcí takto modifikovaných proteinů.

7. Literatura

- Abrami, L., Dallavilla, T., Sandoz, P.A., Demir, M., Kunz, B., Savoglidis, G., Hatzimanikatis, V., Van Der Goot, F.G., 2017. Identification and dynamics of the human ZDHHC16-ZDHHC6 palmitoylation cascade. *Elife* 6, e27826.
- Ahearn, I.M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., Philips, M.R., 2012. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 39–51.
- Ames, J.B., Tanaka, T., Stryer, L., Ikura, M., 1996. Portrait of a myristoyl switch protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 6, 432–438.
- Anderson, M.S., Raetz, C.R., 1987. Biosynthesis of lipid A precursors in *Escherichia coli*. A cytoplasmic acyltransferase that converts UDP-N-acetylglucosamine to UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-N-acetylglucosamine. *J. Biol. Chem.* 262, 5159–5169.
- Andres, D.A., Seabra, M.C., Brown, M.S., Armstrong, S.A., Smeland, T.E., Cremers, F.P., Goldstein, J.L., 1993. cDNA cloning of component A of Rab geranylgeranyl transferase and demonstration of its role as a Rab escort protein. *Cell* 73, 1091–1099.
- Bachert, C., Linstedt, A.D., 2010. Dual anchoring of the GRASP membrane tether promotes trans pairing. *J. Biol. Chem.* 285, 16294–16301.
- Barbacid, M., 1987. ras Genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779–827. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.56.070187.004023>
- Barry, E.M., Weiss, A.A., Ehrmann, I.E., Gray, M.C., Hewlett, E.L., Goodwin, M.S., 1991. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin and hemolytic activities require a second gene, *cyaC*, for activation. *J. Bacteriol.* 173, 720–726.
- Basar, T., Havlíček, V., Bezoušková, S., Hackett, M., Šebo, P., 2001. Acylation of lysine 983 is sufficient for toxin activity of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: substitutions of alanine 140 modulate acylation site selectivity of the toxin acyltransferase CyaC. *J. Biol. Chem.* 276, 348–354.
- Basar, T., Havlíček, V., Bezoušková, S., Halada, P., Hackett, M., Šebo, P., 1999. The conserved lysine 860 in the additional fatty-acylation site of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase is crucial for toxin function independently of its acylation status. *J. Biol. Chem.* 274, 10777–10783.
- Beck, L.A., Hosick, T.J., Sinensky, M., 1988. Incorporation of a product of mevalonic acid metabolism into proteins of *Chinese hamster* ovary cell nuclei. *J. Cell Biol.* 107, 1307–1316.
- Bélanger, C., Ansanay, H., Qanbar, R., Bouvier, M., 2001. Primary sequence requirements for S-acylation of β 2-adrenergic receptor peptides. *FEBS Lett.* 499, 59–64. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02513-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02513-3)
- Belisle, J.T., Brandt, M.E., Radolf, J.D., Norgard, M.V., 1994. Fatty acids of *Treponema pallidum* and *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *J. Bacteriol.* 176, 2151–2157.
- Bhatnagar, R.S., Schall, O.F., Jackson-Machelski, E., Sikorski, J.A., Devadas, B., Gokel, G.W., Gordon, J.I., 1997. Titration calorimetric analysis of AcylCoA recognition by myristoylCoA: protein N-myristoyltransferase. *Biochemistry* 36, 6700–6708.
- Bishop, R.E., 2005. The lipid A palmitoyltransferase PagP: molecular mechanisms and role in bacterial pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 57, 900–912.
- Bishop, R.E., Gibbons, H.S., Guina, T., Trent, M.S., Miller, S.I., Raetz, C.R., 2000. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of gram-negative bacteria. *EMBO J.* 19, 5071–5080.
- Boggon, T.J., Eck, M.J., 2004. Structure and regulation of Src family kinases. *Oncogene* 23, 7918–7927.
- Bolanowski, M.A., Earles, B.J., Lennarz, W.J., 1984. Fatty acylation of proteins during development of sea urchin embryos. *J. Biol. Chem.* 259, 4934–4940.
- Bordier, B.B., Marion, P.L., Ohashi, K., Kay, M.A., Greenberg, H.B., Casey, J.L., Glenn, J.S., 2002. A prenylation inhibitor prevents production of infectious hepatitis delta virus particles. *J. Virol.* 76, 10465–10472.
- Borgese, N., Aggujaro, D., Carrera, P., Pietrini, G., Bassetti, M., 1996. A role for N-myristoylation in protein targeting: NADH-cytochrome b5 reductase requires myristic acid for association with outer mitochondrial but not ER membranes. *J. Cell Biol.* 135, 1501–1513.
- Boyartchuk, V.L., Ashby, M.N., Rine, J., 1997. Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* 275, 1796–1800.
- Braun, P.E., Radin, N.S., 1969. Interactions of lipids with a membrane structural protein from myelin. *Biochemistry* 8, 4310–4318.

- Bryant, M., Ratner, L., 1990. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 523–527.
- Buglino, J.A., Resh, M.D., 2008. Hhat Is a Palmitoylacyltransferase with Specificity for N-Palmitoylation of Sonic Hedgehog. *J. Biol. Chem.* 283, 22076–22088. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803901200>
- Burnaevskiy, N., Fox, T.G., Plymire, D.A., Ertelt, J.M., Weigele, B.A., Selyunin, A.S., Way, S.S., Patrie, S.M., Alto, N.M., 2013. Proteolytic elimination of N-myristoyl modifications by the *Shigella* virulence factor IpaJ. *Nature* 496, 106–109.
- Byers, D.M., Meighen, E.A., 1985. Acyl-acyl carrier protein as a source of fatty acids for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 6085–6089.
- 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. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41567-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41567-0)
- Casey, P.J., 1995. Protein lipidation in cell signaling. *Science* 268, 221–225.
- Casey, P.J., 1992. Biochemistry of protein prenylation. *J. Lipid Res.* 33, 1731–1740.
- Casey, P.J., Solski, P.A., Der, C.J., Buss, J.E., 1989. p21ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 8323–8327.
- Casey, P.J., Thissen, J.A., Moomaw, J.F., 1991. Enzymatic modification of proteins with a geranylgeranyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 8631–8635.
- Casey, W.M., Gibson, K.J., Parks, L.W., 1994. Covalent attachment of palmitoleic acid (C16: 1 delta 9) to proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence for a third class of acylated proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 2082–2085.
- Chandra, A., Grecco, H.E., Pisupati, V., Perera, D., Cassidy, L., Skoulidis, F., Ismail, S.A., Hedberg, C., Hanzal-Bayer, M., Venkitaraman, A.R., 2012. The GDI-like solubilizing factor PDE δ sustains the spatial organization and signalling of Ras family proteins. *Nat. Cell Biol.* 14, 148–158.
- Chardin, P., Camonis, J.H., Gale, N.W., Van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H., Bar-Sagi, D., 1993. Human Sos1: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to GRB2. *Science* 260, 1338–1343.
- Chen, B., Sun, Y., Niu, J., Jarugumilli, G.K., Wu, X., 2018. Protein Lipidation in Cell Signaling and Diseases: Function, Regulation, and Therapeutic Opportunities. *Cell Chem. Biol.* 25, 817–831. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2018.05.003>
- Chen, M.-H., Li, Y.-J., Kawakami, T., Xu, S.-M., Chuang, P.-T., 2004. Palmitoylation is required for the production of a soluble multimeric Hedgehog protein complex and long-range signaling in vertebrates. *Genes Dev.* 18, 641–659.
- Chen, Z.Q., Ulsh, L.S., DuBois, G., Shih, T.Y., 1985. Posttranslational processing of p21 ras proteins involves palmitoylation of the C-terminal tetrapeptide containing cysteine-186. *J. Virol.* 56, 607–612.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., Philips, M.R., 1999. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98, 69–80.
- Clarke, S., 1992. Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 355–386.
- Coe, J.G., Lim, A.C., Xu, J., Hong, W., 1999. A role for Tlg1p in the transport of proteins within the Golgi apparatus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 10, 2407–2423.
- Cordo, S.M., Candurra, N.A., Damonte, E.B., 1999. Myristic acid analogs are inhibitors of Junin virus replication. *Microbes Infect.* 1, 609–614.
- Dai, Q., Choy, E., Chiu, V., Romano, J., Slivka, S.R., Steitz, S.A., Michaelis, S., Philips, M.R., 1998. Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 273, 15030–15034.
- Deichaite, I., Casson, L.P., Ling, H.-P., Resh, M.D., 1988. In vitro synthesis of pp60v-src: myristylation in a cell-free system. *Mol. Cell. Biol.* 8, 4295–4301.
- Dekker, F.J., Rocks, O., Vartak, N., Menninger, S., Hedberg, C., Balamurugan, R., Wetzel, S., Renner, S., Gerauer, M., Schölermann, B., 2010. Small-molecule inhibition of APT1 affects Ras localization and signaling. *Nat. Chem. Biol.* 6, 449.
- Ducker, C.E., Upson, J.J., French, K.J., Smith, C.D., 2005. Two N-myristoyltransferase isozymes play unique roles in protein myristoylation, proliferation, and apoptosis. *Mol. Cancer Res.* 3, 463–476.

- Duncan, J.A., Gilman, A.G., 1996. Autoacylation of G Protein α Subunits. *J. Biol. Chem.* 271, 23594–23600. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.38.23594>
- Dunphy, J.T., Linder, M.E., 1998. Signalling functions of protein palmitoylation. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Biol. Lipids* 1436, 245–261.
- Duronio, R.J., Towler, D.A., Heuckeroth, R.O., Gordon, J.I., 1989. Disruption of the yeast N-myristoyl transferase gene causes recessive lethality. *Science* 243, 796–800.
- Dyda, F., Klein, D.C., Hickman, A.B., 2000. GCN5-related N-acetyltransferases: a structural overview. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 29, 81–103.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D., Leclerc, C., 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.* 278, 38514–38521.
- Endo, A., 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J. Lipid Res.* 33, 1569–1582.
- Englund, P.T., 1993. The structure and biosynthesis of glycosyl phosphatidylinositol protein anchors. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 121–138.
- Epstein, W.W., Lever, D., Leining, L.M., Bruenger, E., Rilling, H.C., 1991. Quantitation of prenylcysteines by a selective cleavage reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 9668–9670.
- Fankhauser, C., Homans, S.W., Thomas-Oates, J.E., McConville, M.J., Desponds, C., Conzelmann, A., Ferguson, M.A., 1993. Structures of glycosylphosphatidylinositol membrane anchors from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 26365–26374.
- Farazi, T.A., Waksman, G., Gordon, J.I., 2001a. The biology and enzymology of protein N-myristoylation. *J. Biol. Chem.* 276, 39501–39504.
- Farazi, T.A., Waksman, G., Gordon, J.I., 2001b. Structures of *Saccharomyces cerevisiae* N-myristoyltransferase with bound myristoylCoA and peptide provide insights about substrate recognition and catalysis. *Biochemistry* 40, 6335–6343.
- Farnsworth, C.C., Wolda, S.L., Gelb, M.H., Glomset, J.A., 1989. Human lamin B contains a farnesylated cysteine residue. *J. Biol. Chem.* 264, 20422–20429.
- Felmlee, T., Pellett, S., Welch, R.A., 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* 163, 94–105.
- Forestier, C., Welch, R.A., 1990. Nonreciprocal complementation of the hlyC and lktC genes of the *Escherichia coli* hemolysin and *Pasteurella haemolytica* leukotoxin determinants. *Infect. Immun.* 58, 828–832.
- Franch-Marro, X., Wendler, F., Griffith, J., Maurice, M.M., Vincent, J.-P., 2008. In vivo role of lipid adducts on Wingless. *J. Cell Sci.* 121, 1587–1592.
- Fujimoto, T., Stroud, E., Whatley, R.E., Prescott, S.M., Muszbek, L., Laposata, M., McEver, R.P., 1993. P-selectin is acylated with palmitic acid and stearic acid at cysteine 766 through a thioester linkage. *J. Biol. Chem.* 268, 11394–11400.
- Fukata, M., Fukata, Y., Adesnik, H., Nicoll, R.A., Brecht, D.S., 2004. Identification of PSD-95 palmitoylating enzymes. *Neuron* 44, 987–996.
- Furfine, E.S., Leban, J.J., Landavazo, A., Moomaw, J.F., Casey, P.J., 1995. Protein farnesyltransferase: kinetics of farnesyl pyrophosphate binding and product release. *Biochemistry* 34, 6857–6862.
- Gagnon, J., Finch, P.R., Wood, D.D., and Moscarello, M., 1971. Isolation of a highly purified myelin protein. *Biochemistry* 10, 4756–4763.
- Gallet, A., Ruel, L., Staccini-Lavenant, L., Théron, P.P., 2006. Cholesterol modification is necessary for controlled planar long-range activity of Hedgehog in *Drosophila* epithelia. *Development* 133, 407–418.
- Giang, D.K., Cravatt, B.F., 1998. A second mammalian N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* 273, 6595–6598.
- Gibbs, J.B., 1991. Ras C-terminal processing enzymes—new drug targets? *Cell* 65, 1–4.
- Glomset, J.A., Farnsworth, C.C., 1994. Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 181–205.
- Glomset, J.A., Gelb, M.H., Farnsworth, C.C., 1990. Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem. Sci.* 15, 139–142. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90213-U](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90213-U)

- Glover, C.J., Hartman, K.D., Felsted, R.L., 1997. Human N-myristoyltransferase amino-terminal domain involved in targeting the enzyme to the ribosomal subcellular fraction. *J. Biol. Chem.* 272, 28680–28689.
- Goldberg, J., 1998. Structural basis for activation of ARF GTPase: mechanisms of guanine nucleotide exchange and GTP–myristoyl switching. *Cell* 95, 237–248.
- Goltz, R.W., 1992. Focal dermal hypoplasia syndrome: an update. *Arch. Dermatol.* 128, 1108–1111.
- González Montoro, A., Chumpen Ramirez, S., Valdez Taubas, J., 2015. The Canonical DHHC Motif Is Not Absolutely Required for the Activity of the Yeast S-acyltransferases Swf1 and Pfa4. *J. Biol. Chem.* 290, 22448–22459. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.651356>
- Gottlieb, C.D., Linder, M.E., 2017. Structure and function of DHHC protein S-acyltransferases. *Biochem. Soc. Trans.* 45, 923–928.
- Greaves, J., Gorleku, O.A., Salaun, C., Chamberlain, L.H., 2010. Palmitoylation of the SNAP25 protein family: specificity and regulation by DHHC palmitoyl transferases. *J. Biol. Chem.* 285, 24629–24638.
- Grzeschik, K.-H., Bornholdt, D., Oeffner, F., König, A., del Carmen Boente, M., Enders, H., Fritz, B., Hertl, M., Grasshoff, U., Höfling, K., 2007. Deficiency of PORCN, a regulator of Wnt signaling, is associated with focal dermal hypoplasia. *Nat. Genet.* 39, 833–835.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L., 1994. Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science* 266, 433–435.
- Hackett, M., Walker, C.B., Guo, L., Gray, M.C., Van Cuyk, S., Ullmann, A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Hewlett, E.L., Sebo, P., 1995. Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270, 20250–20253.
- Hallak, H., Muszbek, L., Laposata, M., Belmonte, E., Brass, L.F., Manning, D.R., 1994. Covalent binding of arachidonate to G protein alpha subunits of human platelets. *J. Biol. Chem.* 269, 4713–4716.
- Hancock, J.F., Cadwallader, K., Marshall, C.J., 1991. Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras (B). *EMBO J.* 10, 641–646.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., Marshall, C.J., 1989. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* 57, 1167–1177.
- Hancock, J.F., Paterson, H., Marshall, C.J., 1990. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63, 133–139.
- Hardie, K.R., Issartel, J.-P., Koronakis, E., Hughes, C., Koronakis, V., 1991. In vitro activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature membrane-targeted toxin requires HlyC and a low molecular-weight cytosolic polypeptide. *Mol. Microbiol.* 5, 1669–1679.
- Harper, D.R., Gilbert, R.L., Blunt, C., McIlhinney, R.A.J., 1993. Inhibition of varicella-zoster virus replication by an inhibitor of protein myristoylation. *J. Gen. Virol.* 74, 1181–1184.
- Heinrich, F., Nanda, H., Goh, H.Z., Bachert, C., Lösche, M., Linstedt, A.D., 2014. Myristoylation restricts orientation of the GRASP domain on membranes and promotes membrane tethering. *J. Biol. Chem.* 289, 9683–9691.
- Hermida-Matsumoto, L., Resh, M.D., 1999. Human immunodeficiency virus type 1 protease triggers a myristoyl switch that modulates membrane binding of Pr55 gag and p17MA. *J. Virol.* 73, 1902–1908.
- Hill, B.T., Skowronski, J., 2005. Human N-myristoyltransferases form stable complexes with lentiviral nef and other viral and cellular substrate proteins. *J. Virol.* 79, 1133–1141.
- Hofmann, K., 2000. A superfamily of membrane-bound O-acyltransferases with implications for wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* 25, 111–112.
- Horiuchi, H., Kawata, M., Katayama, M., Yoshida, Y., Musha, T., Ando, S., Takai, Y., 1991. A novel prenyltransferase for a small GTP-binding protein having a C-terminal Cys-Ala-Cys structure. *J. Biol. Chem.* 266, 16981–16984.
- Houston, S., Hof, R., Francescutti, T., Hawkes, A., Boulanger, M.J., Cameron, C.E., 2011. Bifunctional role of the *Treponema pallidum* extracellular matrix binding adhesin Tp0751. *Infect. Immun.* 79, 1386–1398.
- Huang, C.-C., Casey, P.J., Fierke, C.A., 1997. Evidence for a Catalytic Role of Zinc in Protein Farnesyltransferase: SPECTROSCOPY OF Co²⁺-FARNESYLTRANSFERASE INDICATES METAL COORDINATION OF THE SUBSTRATE THIOLATE. *J. Biol. Chem.* 272, 20–23.

- Huang, K., Sanders, S.S., Kang, R., Carroll, J.B., Sutton, L., Wan, J., Singaraja, R., Young, F.B., Liu, L., El-Husseini, A., 2011. Wild-type HTT modulates the enzymatic activity of the neuronal palmitoyl transferase HIP14. *Hum. Mol. Genet.* 20, 3356–3365.
- Hughes, C., Issartel, J.-P., Hardie, K., Stanley, P., Koronakis, E., Koronakis, V., 1992. Activation of *Escherichia coli* prohemolysin to the membrane-targeted toxin by HlyC-directed ACP-dependent fatty acylation. *FEMS Microbiol. Immunol.* 5, 37–43.
- Ivanov, S.S., Charron, G., Hang, H.C., Roy, C.R., 2010. Lipidation by the host prenyltransferase machinery facilitates membrane localization of *Legionella pneumophila* effector proteins. *J. Biol. Chem.* 285, 34686–34698.
- Iwasaki, A., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 5, 987–995.
- Jennings, B.C., Linder, M.E., 2012. DHHC Protein S-Acyltransferases Use Similar Ping-Pong Kinetic Mechanisms but Display Different Acyl-CoA Specificities*. *J. Biol. Chem.* 287, 7236–7245. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.337246>
- Jiang, H., Zhang, X., Chen, X., Aramsangtienchai, P., Tong, Z., Lin, H., 2018. Protein lipidation: occurrence, mechanisms, biological functions, and enabling technologies. *Chem. Rev.* 118, 919–988.
- Johnson, D.R., Bhatnagar, R.S., Knoll, L.J., Gordon, J.I., 1994. Genetic and biochemical studies of protein N-myristoylation. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 869–914.
- Kabouridis, P.S., Magee, A.I., Ley, S.C., 1997. S-acylation of LCK protein tyrosine kinase is essential for its signalling function in T lymphocytes. *EMBO J.* 16, 4983–4998.
- Kadowaki, T., Wilder, E., Klingensmith, J., Zachary, K., Perrimon, N., 1996. The segment polarity gene porcupine encodes a putative multitransmembrane protein involved in Wingless processing. *Genes Dev.* 10, 3116–3128.
- Kamiya, Y., Sakurai, A., Tamura, S., Takahashi, N., Abe, K., Tsuchiya, E., Fukui, S., Kitada, C., Fujino, M., 1978. Structure of rhodotorucine A, a novel lipopeptide, inducing mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83, 1077–1083.
- Kawasaki, K., Ernst, R.K., Miller, S.I., 2004. 3-O-deacylation of lipid A by PagL, a PhoP/PhoQ-regulated deacylase of *Salmonella typhimurium*, modulates signaling through Toll-like receptor 4. *J. Biol. Chem.* 279, 20044–20048.
- Keller, C.A., Yuan, X., Panzanelli, P., Martin, M.L., Alldred, M., Sassoè-Pognetto, M., Lüscher, B., 2004. The γ 2 subunit of GABAA receptors is a substrate for palmitoylation by GODZ. *J. Neurosci.* 24, 5881–5891.
- Kinsella, B.T., Erdman, R.A., Maltese, W.A., 1991. Carboxyl-terminal isoprenylation of ras-related GTP-binding proteins encoded by *rac1*, *rac2*, and *ralA*. *J. Biol. Chem.* 266, 9786–9794.
- Kong, E., Peng, S., Chandra, G., Sarkar, C., Zhang, Z., Bagh, M.B., Mukherjee, A.B., 2013. Dynamic palmitoylation links cytosol-membrane shuttling of acyl-protein thioesterase-1 and acyl-protein thioesterase-2 with that of proto-oncogene H-ras product and growth-associated protein-43. *J. Biol. Chem.* 288, 9112–9125.
- Konitsiotis, A.D., Chang, S.-C., Jovanović, B., Ciepla, P., Masumoto, N., Palmer, C.P., Tate, E.W., Couchman, J.R., Magee, A.I., 2014. Attenuation of hedgehog acyltransferase-catalyzed sonic Hedgehog palmitoylation causes reduced signaling, proliferation and invasiveness of human carcinoma cells. *PLoS One* 9, e89899.
- Kordyukova, L.V., Serebryakova, M.V., Baratova, L.A., Veit, M., 2008. S acylation of the hemagglutinin of influenza viruses: mass spectrometry reveals site-specific attachment of stearic acid to a transmembrane cysteine. *J. Virol.* 82, 9288–9292.
- Koronakis, V., Hughes, C., 1996. Synthesis, maturation and export of the *E. coli* hemolysin. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 185, 65–71.
- Kovacs-Simon, A., Titball, R.W., Michell, S.L., 2011. Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect. Immun.* 79, 548–561.
- Lai, J., Linder, M.E., 2013. Oligomerization of DHHC protein S-acyltransferases. *J. Biol. Chem.* 288, 22862–22870.
- Lambalot, R.H., Walsh, C.T., 1997. [27] Holo-[acyl-carrier-protein] synthase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 279, 254–262.
- Landles, C., Bates, G.P., 2004. Huntingtin and the molecular pathogenesis of Huntington's disease: Fourth in Molecular Medicine Review Series. *EMBO Rep.* 5, 958–963.

- Lee, C.-Z., Chen, P.-J., Lai, M.M., Chen, D.-S., 1994. Isoprenylation of large hepatitis delta antigen is necessary but not sufficient for hepatitis delta virus assembly. *Virology* 199, 169–175.
- Lee, J.D., Kraus, P., Gaiano, N., Nery, S., Kohtz, J., Fishell, G., Loomis, C.A., Treisman, J.E., 2001. An acylatable residue of Hedgehog is differentially required in *Drosophila* and mouse limb development. *Dev. Biol.* 233, 122–136.
- Li, H., Dou, J., Ding, L., Spearman, P., 2007. Myristoylation is required for human immunodeficiency virus type 1 Gag-Gag multimerization in mammalian cells. *J. Virol.* 81, 12899–12910.
- Lievens, P.M.-J., Kuznetsova, T., Kochlamazashvili, G., Cesca, F., Gorinski, N., Galil, D.A., Cherkas, V., Ronkina, N., Lafera, J., Gaestel, M., 2016. ZDHHC3 tyrosine phosphorylation regulates neural cell adhesion molecule palmitoylation. *Mol. Cell. Biol.* 36, 2208–2225.
- Linder, M.E., Deschenes, R.J., 2003. New insights into the mechanisms of protein palmitoylation. *Biochemistry* 42, 4311–4320.
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., Hejnová-Holubová, J., Sadílková, L., 2010. RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 1076–1112.
- Liu, Y., Kahn, R.A., Prestegard, J.H., 2009. Structure and membrane interaction of myristoylated ARF1. *Structure* 17, 79–87.
- Lobo, S., Greentree, W.K., Linder, M.E., Deschenes, R.J., 2002. Identification of a Ras palmitoyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 41268–41273.
- Long, S.B., Casey, P.J., Beese, L.S., 2002. Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution. *Nature* 419, 645–650.
- Lu, J.-Y., Verkruyse, L.A., Hofmann, S.L., 1996. Lipid thioesters derived from acylated proteins accumulate in infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: correction of the defect in lymphoblasts by recombinant palmitoyl-protein thioesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 10046–10050.
- Magee, A.I., Schlesinger, M.J., 1982. Fatty acid acylation of eucaryotic cell membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 694, 279–289. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(82\)90008-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(82)90008-9)
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C.O., Cronan, J.E., 1993. Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 57, 522–542.
- Mann, R.K., Beachy, P.A., 2004. Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 891–923.
- Masin, J., Basler, M., Knapp, O., El-Azami-El-Idrissi, M., Maier, E., Konopasek, I., Benz, R., Leclerc, C., Sebo, P., 2005. Acylation of lysine 860 allows tight binding and cytotoxicity of *Bordetella* adenylate cyclase on CD11b-expressing cells. *Biochemistry* 44, 12759–12766.
- Maurer-Stroh, S., Gouda, M., Novatchkova, M., Schleiffer, A., Schneider, G., Sirota, F.L., Wildpaner, M., Hayashi, N., Eisenhaber, F., 2004. MYRbase: analysis of genome-wide glycine myristoylation enlarges the functional spectrum of eukaryotic myristoylated proteins. *Genome Biol.* 5, 1–16.
- McIlhinney, R.J., McGlone, K., 1996. Immunocytochemical Characterization and Subcellular Localization of Human Myristoyl-CoA: ProteinN-Myristoyltransferase in HeLa Cells. *Exp. Cell Res.* 223, 348–356.
- McLaughlin, S., Aderem, A., 1995. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* 20, 272–276.
- Mirsky, A.E., Ris, H., 1951. The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J. Gen. Physiol.* 34, 451.
- Mitchell, D.A., Mitchell, G., Ling, Y., Budde, C., Deschenes, R.J., 2010. Mutational Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Erf2 Reveals a Two-step Reaction Mechanism for Protein Palmitoylation by DHHC Enzymes. *J. Biol. Chem.* 285, 38104–38114. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.169102>
- Mittal, R., Ahmadian, M.R., Goody, R.S., Wittinghofer, A., 1996. Formation of a transition-state analog of the Ras GTPase reaction by Ras·GDP, tetrafluoroaluminate, and GTPase-activating proteins. *Science* 273, 115–117.
- Miura, G.I., Buglino, J., Alvarado, D., Lemmon, M.A., Resh, M.D., Treisman, J.E., 2006. Palmitoylation of the EGFR ligand Spitz by Rasp increases Spitz activity by restricting its diffusion. *Dev. Cell* 10, 167–176.

- Moffett, S., Adam, L., Bonin, H., Loisel, T.P., Bouvier, M., Mouillac, B., 1996. Palmitoylated Cysteine 341 Modulates Phosphorylation of the β 2-Adrenergic Receptor by the cAMP-dependent Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 21490–21497. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.35.21490>
- Moore, S.L., Schaber, M.D., Mosser, S.D., Rands, E., O'Hara, M.B., Garsky, V.M., Marshall, M.S., Pompliano, D.L., Gibbs, Jb., 1991. Sequence dependence of protein isoprenylation. *J. Biol. Chem.* 266, 14603–14610.
- Mousnier, A., Bell, A.S., Swieboda, D.P., Morales-Sanfrutos, J., Pérez-Dorado, I., Brannigan, J.A., Newman, J., Ritzefeld, M., Hutton, J.A., Guedán, A., 2018. Fragment-derived inhibitors of human N-myristoyltransferase block capsid assembly and replication of the common cold virus. *Nat. Chem.* 10, 599–606.
- Murray, D., Ben-Tal, N., Honig, B., McLaughlin, S., 1997. Electrostatic interaction of myristoylated proteins with membranes: simple physics, complicated biology. *Structure* 5, 985–989.
- Nagar, B., Hantschel, O., Young, M.A., Scheffzek, K., Veach, D., Bornmann, W., Clarkson, B., Superti-Furga, G., Kuriyan, J., 2003. Structural basis for the autoinhibition of c-Abl tyrosine kinase. *Cell* 112, 859–871.
- Nicaud, J.-M., Mackman, N., Gray, L., Holland, I.B., 1986. The C-terminal, 23 kDa peptide of *E. coli* haemolysin 2001 contains all the information necessary for its secretion by the haemolysin (Hly) export machinery. *FEBS Lett.* 204, 331–335.
- Noritake, J., Fukata, Y., Iwanaga, T., Hosomi, N., Tsutsumi, R., Matsuda, N., Tani, H., Iwanari, H., Mochizuki, Y., Kodama, T., 2009. Mobile DHHC palmitoylating enzyme mediates activity-sensitive synaptic targeting of PSD-95. *J. Cell Biol.* 186, 147–160.
- Novick, P., Brennwald, P., 1993. Friends and family: the role of the Rab GTPases in vesicular traffic. *Cell* 75, 597–601.
- Ntwasa, M., Aapies, S., Schiffmann, D.A., Gay, N.J., 2001. *Drosophila* embryos lacking N-myristoyltransferase have multiple developmental defects. *Exp. Cell Res.* 262, 134–144.
- O'Brien, D.P., Cannella, S.E., Voegelé, A., Raoux-Barbot, D., Davi, M., Douché, T., Matondo, M., Brier, S., Ladant, D., Chenal, Alexandre, 2019. Post-translational acylation controls the folding and functions of the CyaA RTX toxin. *FASEB J.* 33, 10065–10076.
- O'Brien, P.J., Zatz, M., 1984. Acylation of bovine rhodopsin by [³H] palmitic acid. *J. Biol. Chem.* 259, 5054–5057.
- Oh, P., Schnitzer, J.E., 2001. Segregation of heterotrimeric G proteins in cell surface microdomains: Gq binds caveolin to concentrate in caveolae, whereas Gi and Gs target lipid rafts by default. *Mol. Biol. Cell* 12, 685–698.
- Osickova, A., Balashova, N., Masin, J., Sulc, M., Roderova, J., Wald, T., Brown, A.C., Koufos, E., Chang, E.H., Giannakakis, A., 2018. Cytotoxic activity of *Kingella kingae* RtxA toxin depends on post-translational acylation of lysine residues and cholesterol binding. *Emerg. Microbes Infect.* 7, 1–15.
- Osickova, A., Khaliq, H., Masin, J., Jurnecka, D., Sukova, A., Fiser, R., Holubova, J., Stanek, O., Sebo, P., Osicka, R., 2020. Acyltransferase-mediated selection of the length of the fatty acyl chain and of the acylation site governs activation of bacterial RTX toxins. *J. Biol. Chem.* 295, 9268–9280.
- Paige, L.A., Zheng, G.Q., DeFrees, S.A., Cassady, J.M., Geahlen, R.L., 1989. S-(2-oxopentadecyl)-CoA, a nonhydrolyzable analog of myristoyl-CoA, is a potent inhibitor of myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *J. Med. Chem.* 32, 1665–1667.
- Patwardhan, P., Resh, M.D., 2010. Myristoylation and membrane binding regulate c-Src stability and kinase activity. *Mol. Cell Biol.* 30, 4094–4107.
- Peitzsch, R.M., McLaughlin, S., 1993. Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. *Biochemistry* 32, 10436–10443.
- 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.22.14037>
- Percherancier, Y., Planchenault, T., Valenzuela-Fernandez, A., Virelizier, J.-L., Arenzana-Seisdedos, F., Bachelier, F., 2001. Palmitoylation-dependent control of degradation, life span, and membrane expression of the CCR5 receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 31936–31944.
- Perinpanayagam, M.A., Beauchamp, E., Martin, D.D., Sim, J.Y., Yap, M.C., Berthiaume, L.G., 2013. Regulation of co- and post-translational myristoylation of proteins during apoptosis: interplay of N-myristoyltransferases and caspases. *FASEB J.* 27, 811–821.

- Pompliano, D.L., Rands, E., Schaber, M.D., Mosser, S.D., Anthony, N.J., Gibbs, J.B., 1992. Steady-state kinetic mechanism of Ras farnesyl: protein transferase. *Biochemistry* 31, 3800–3807.
- Powers, S., Michaelis, S., Broek, D., Santa, A.-A.S., Field, J., Herskowitz, I., Wigler, M., 1986. RAM, a gene of yeast required for a functional modification of RAS proteins and for production of mating pheromone α -factor. *Cell* 47, 413–422.
- Preston, A., Maxim, E., Toland, E., Pishko, E.J., Harvill, E.T., Caroff, M., Maskell, D.J., 2003. *Bordetella bronchiseptica* PagP is a Bvg-regulated lipid A palmitoyl transferase that is required for persistent colonization of the mouse respiratory tract. *Mol. Microbiol.* 48, 725–736.
- Price, C.T., Al-Quadani, T., Santic, M., Jones, S.C., Abu Kwaik, Y., 2010. Exploitation of conserved eukaryotic host cell farnesylation machinery by an F-box effector of *Legionella pneumophila*. *J. Exp. Med.* 207, 1713–1726.
- Reid, T.S., Terry, K.L., Casey, P.J., Beese, L.S., 2004. Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J. Mol. Biol.* 343, 417–433.
- Rein, A., McClure, M.R., Rice, N.R., Luftig, R.B., Schultz, A.M., 1986. Myristylation site in Pr65gag is essential for virus particle formation by Moloney murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 7246–7250.
- Reinicke, A.T., Hutchinson, J.L., Magee, A.I., Mastroeni, P., Trowsdale, J., Kelly, A.P., 2005. A *Salmonella typhimurium* effector protein SifA is modified by host cell prenylation and S-acylation machinery. *J. Biol. Chem.* 280, 14620–14627.
- Reiss, Y., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1992. Divalent cation and prenyl pyrophosphate specificities of the protein farnesyltransferase from rat brain, a zinc metalloenzyme. *J. Biol. Chem.* 267, 6403–6408.
- Resh, M.D., 2012. Targeting protein lipidation in disease. *Trends Mol. Med.* 18, 206–214.
- Resh, M.D., 2006. Trafficking and signaling by fatty-acylated and prenylated proteins. *Nat. Chem. Biol.* 2, 584–590.
- Resh, M.D., 1999. Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Mol. Cell Res.* 1451, 1–16.
- Rilling, H.C., Breunger, E., Epstein, W.W., Crain, P.F., 1990. Prenylated proteins: the structure of the isoprenoid group. *Science* 247, 318–320.
- Rock, C.O., Cronan, J.E., 1979. Re-evaluation of the solution structure of acyl carrier protein. *J. Biol. Chem.* 254, 9778–9785.
- Rock, C.O., Jackowski, S., 1982. Regulation of phospholipid synthesis in *Escherichia coli*. Composition of the acyl-acyl carrier protein pool in vivo. *J. Biol. Chem.* 257, 10759–10765.
- Rocks, O., Gerauer, M., Vartak, N., Koch, S., Huang, Z.-P., Pechlivanis, M., Kuhlmann, J., Brunsveld, L., Chandra, A., Ellinger, B., 2010. The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins. *Cell* 141, 458–471.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M., Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., Bastiaens, P.I., 2005. An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* 307, 1746–1752.
- Ross, N.W., Braun, P.E., 1988. Acylation in vitro of the myelin proteolipid protein and comparison with acylation in vivo: Acylation of a cysteine occurs nonenzymatically. *J. Neurosci. Res.* 21, 35–44. <https://doi.org/10.1002/jnr.490210106>
- Roth, A.F., Feng, Y., Chen, L., Davis, N.G., 2002. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein Akr1p is a palmitoyl transferase. *J. Cell Biol.* 159, 23–28.
- Roth, A.F., Wan, J., Bailey, A.O., Sun, B., Kuchar, J.A., Green, W.N., Phinney, B.S., Yates III, J.R., Davis, N.G., 2006. Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* 125, 1003–1013.
- Rudnick, D.A., McWherter, C.A., Rocque, W.J., Lennon, P.J., Getman, D.P., Gordon, J.I., 1991. Kinetic and structural evidence for a sequential ordered Bi Bi mechanism of catalysis by *Saccharomyces cerevisiae* myristoyl-CoA: protein N-myristoyltransferase. *J. Biol. Chem.* 266, 9732–9739.
- Santavuori, P., 1988. Neuronal ceroid-lipofuscinoses in childhood. *Brain Dev.* 10, 80–83. [https://doi.org/10.1016/S0387-7604\(88\)80075-5](https://doi.org/10.1016/S0387-7604(88)80075-5)
- Schafer, W., Kim, R., Sterne, R., Thorner, J., Kim, S., Rine, J., 1989. Genetic and pharmacological suppression of oncogenic mutations in ras genes of yeast and humans. *Science* 245, 379–385. <https://doi.org/10.1126/science.2569235>
- Schafer, W.R., Rine, J., 1992. Protein prenylation: genes, enzymes, targets, and functions. *Annu. Rev. Genet.* 26, 209–237.

- Schmidt, M.F., Bracha, M., Schlesinger, M.J., 1979. Evidence for covalent attachment of fatty acids to Sindbis virus glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1687–1691.
- Schmidt, M.F., Schlesinger, M.J., 1979. Fatty acid binding to vesicular stomatitis virus glycoprotein: a new type of post-translational modification of the viral glycoprotein. *Cell* 17, 813–819.
- Schmidt, R.A., Schneider, C.J., Glomset, J.A., 1984. Evidence for post-translational incorporation of a product of mevalonic acid into Swiss 3T3 cell proteins. *J. Biol. Chem.* 259, 10175–10180.
- Schroepfer Jr, G.J., 1981. Sterol biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* 50, 585–621.
- Schülein, R., Gentschev, I., Mollenkopf, H.-J., Goebel, W., 1992. A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Mol. Gen. Genet. MGG* 234, 155–163.
- Seabra, M.C., Brown, M.S., Goldstein, J.L., 1993. Retinal degeneration in choroideremia: deficiency of rab geranylgeranyl transferase. *Science* 259, 377–381.
- Seabra, M.C., Goldstein, J.L., Südhof, T.C., Brown, M.S., 1992. Rab geranylgeranyl transferase. A multisubunit enzyme that prenylates GTP-binding proteins terminating in Cys-X-Cys or Cys-Cys. *J. Biol. Chem.* 267, 14497–14503.
- Shen, B., Summers, R.G., Gramajo, H., Bibb, M.J., Hutchinson, C.R., 1992. Purification and characterization of the acyl carrier protein of the *Streptomyces glaucescens* tetracenomycin C polyketide synthase. *J. Bacteriol.* 174, 3818–3821.
- Silvius, J.R., l'Heureux, F., 1994. Fluorometric evaluation of the affinities of isoprenylated peptides for lipid bilayers. *Biochemistry* 33, 3014–3022.
- Siniosoglou, S., Pelham, H.R., 2001. An effector of Ypt6p binds the SNARE Tlg1p and mediates selective fusion of vesicles with late Golgi membranes. *EMBO J.* 20, 5991–5998.
- Smeland, T.E., Seabra, M.C., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1994. Geranylgeranylated Rab proteins terminating in Cys-Ala-Cys, but not Cys-Cys, are carboxyl-methylated by bovine brain membranes in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 10712–10716.
- Sobocińska, J., Roszczenko-Jasińska, P., Ciesielska, A., Kwiatkowska, K., 2018. Protein palmitoylation and its role in bacterial and viral infections. *Front. Immunol.* 8, 2003.
- Stanley, P., Koronakis, V., Hughes, C., 1998. Acylation of *Escherichia coli* Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 309–333. <https://doi.org/10.1128/MMBR.62.2.309-333.1998>
- Stanley, P., Koronakis, V., Hughes, C., 1991. Mutational analysis supports a role for multiple structural features in the C-terminal secretion signal of *Escherichia coli* haemolysin. *Mol. Microbiol.* 5, 2391–2403.
- Stanley, P., Packman, L.C., Koronakis, V., Hughes, C., 1994. Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* 266, 1992–1996.
- Stirtan, W.G., Poulter, C.D., 1997. Yeast protein geranylgeranyltransferase type-I: steady-state kinetics and substrate binding. *Biochemistry* 36, 4552–4557.
- Sutton, L.M., Sanders, S.S., Butland, S.L., Singaraja, R.R., Franciosi, S., Southwell, A.L., Doty, C.N., Schmidt, M.E., Mui, K.K., Kovalik, V., 2013. Hip14l-deficient mice develop neuropathological and behavioural features of Huntington disease. *Hum. Mol. Genet.* 22, 452–465.
- Swierczynski, S.L., Blackshear, P.J., 1996. Myristoylation-dependent and electrostatic interactions exert independent effects on the membrane association of the myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate protein in intact cells. *J. Biol. Chem.* 271, 23424–23430.
- Takasaki, A., Hayashi, N., Matsubara, M., Yamauchi, E., Taniguchi, H., 1999. Identification of the Calmodulin-binding Domain of Neuron-specific Protein Kinase C Substrate Protein CAP-22/NAP-22: DIRECT INVOLVEMENT OF PROTEIN MYRISTOYLATION IN CALMODULIN-TARGET PROTEIN INTERACTION. *J. Biol. Chem.* 274, 11848–11853.
- Tanaka, T., Amest, J.B., Harvey, T.S., Stryer, L., 1995. Sequestration of the membrane-targeting myristoyl group of recoverin in the calcium-free state. *Nature* 376, 444–447.
- Tang, C., Loeliger, E., Luncsford, P., Kinde, I., Beckett, D., Summers, M.F., 2004. Entropic switch regulates myristate exposure in the HIV-1 matrix protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 517–522.
- Thaa, B., Levental, I., Herrmann, A., Veit, M., 2011. Intrinsic membrane association of the cytoplasmic tail of influenza virus M2 protein and lateral membrane sorting regulated by cholesterol binding and palmitoylation. *Biochem. J.* 437, 389–397.
- Thinon, E., Hang, H.C., 2015. Chemical reporters for exploring protein acylation. *Biochem. Soc. Trans.* 43, 253–261.

- Tschantz, W.R., Furfine, E.S., Casey, P.J., 1997. Substrate binding is required for release of product from mammalian protein farnesyltransferase. *J. Biol. Chem.* 272, 9989–9993.
- Tschantz, W.R., Zhang, L., Casey, P.J., 1999. Cloning, expression, and cellular localization of a human prenylcysteine lyase. *J. Biol. Chem.* 274, 35802–35808.
- Tu, Y., Wang, J., Ross, E.M., 1997. Inhibition of Brain Gz GAP and Other RGS Proteins by Palmitoylation of G Protein α Subunits. *Science* 278, 1132–1135. <https://doi.org/10.1126/science.278.5340.1132>
- Udenwobele, D.I., Su, R.-C., Good, S.V., Ball, T.B., Varma Shrivastav, S., Shrivastav, A., 2017. Myristoylation: An important protein modification in the immune response. *Front. Immunol.* 8, 751.
- Valdez-Taubas, J., Pelham, H., 2005. Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J.* 24, 2524–2532.
- Veit, M., Schmidt, M.F.G., 1993. Timing of palmitoylation of influenza virus hemagglutinin. *FEBS Lett.* 336, 243–247. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80812-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80812-9)
- Vesa, J., Hellsten, E., Verkruyse, L.A., Camp, L.A., Rapola, J., Santavuori, P., Hofmann, S.L., Peltonen, L., 1995. Mutations in the palmitoyl protein thioesterase gene causing infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. *Nature* 376, 584–587. <https://doi.org/10.1038/376584a0>
- Wandersman, C., Delepelaire, P., 1990. TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87, 4776–4780.
- Wang, R., Seror, S.J., Blight, M., Pratt, J.M., Broome-Smith, J.K., Holland, I.B., 1991. Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *J. Mol. Biol.* 217, 441–454.
- Webb, Y., Hermida-Matsumoto, L., Resh, M.D., 2000. Inhibition of protein palmitoylation, raft localization, and T cell signaling by 2-bromopalmitate and polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 275, 261–270.
- Weinberg, R.A., McWherter, C.A., Freeman, S.K., Wood, D.C., Gordon, J.I., Lee, S.C., 1995. Genetic studies reveal that myristoylCoA: protein N-myristoyltransferase is an essential enzyme in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 16, 241–250.
- Welch, R.A., 2001. RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Pore-Form. Toxins* 85–111.
- Westrop, G., Hormozi, K., da Costa, N., Parton, R., Coote, J., 1997. Structure-function studies of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* and the leukotoxin of *Pasteurella haemolytica* by heterologous C protein activation and construction of hybrid proteins. *J. Bacteriol.* 179, 871–879.
- Willert, K., Brown, J.D., Danenberg, E., Duncan, A.W., Weissman, I.L., Reya, T., Yates, J.R., Nusse, R., 2003. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448–452.
- Yanai, A., Huang, K., Kang, R., Singaraja, R.R., Arstikaitis, P., Gan, L., Orban, P.C., Mullard, A., Cowan, C.M., Raymond, L.A., 2006. Palmitoylation of huntingtin by HIP14 is essential for its trafficking and function. *Nat. Neurosci.* 9, 824–831.
- Yang, W., Di Vizio, D., Kirchner, M., Steen, H., Freeman, M.R., 2010. Proteome scale characterization of human S-acylated proteins in lipid raft-enriched and non-raft membranes. *Mol. Cell. Proteomics* 9, 54–70.
- Yokoyama, K., Goodwin, G.W., Ghomashchi, F., Glomset, J.A., Gelb, M.H., 1991. A protein geranylgeranyltransferase from bovine brain: implications for protein prenylation specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 5302–5306.
- Zha, J., Weiler, S., Oh, K.J., Wei, M.C., Korsmeyer, S.J., 2000. Posttranslational N-myristoylation of BID as a molecular switch for targeting mitochondria and apoptosis. *Science* 290, 1761–1765.
- Zhang, F.L., Casey, P.J., 1996. Protein Prenylation: Molecular Mechanisms and Functional Consequences. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 241–269. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.65.070196.001325>
- Zhang, F.L., Kirschmeier, P., Carr, D., James, L., Bond, R.W., Wang, L., Patton, R., Windsor, W.T., Syto, R., Zhang, R., 1997. Characterization of Ha-ras, N-ras, Ki-Ras4A, and Ki-Ras4B as in vitro substrates for farnesyl protein transferase and geranylgeranyl protein transferase type I. *J. Biol. Chem.* 272, 10232–10239.
- Zhang, F.L., Moomaw, J.F., Casey, P.J., 1994. Properties and kinetic mechanism of recombinant mammalian protein geranylgeranyltransferase type I. *J. Biol. Chem.* 269, 23465–23470.
- Zhang, L., Tschantz, W.R., Casey, P.J., 1997. Isolation and characterization of a prenylcysteine lyase from bovine brain. *J. Biol. Chem.* 272, 23354–23359.

Zou, C., Ellis, B.M., Smith, R.M., Chen, B.B., Zhao, Y., Mallampalli, R.K., 2011. Acyl-CoA: lysophosphatidylcholine acyltransferase I (Lpcat1) catalyzes histone protein O-palmitoylation to regulate mRNA synthesis. *J. Biol. Chem.* 286, 28019–28025.