

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Speciální chemicko-biologické obory  
Molekulární biologie a biochemie organismů



Kristýna Hudáčková

Role posttranslačních modifikací v aktivitě bakteriálních toxinů  
The role of posttranslational modifications in action of bacterial toxins

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Jiří Mašín, Ph.D.

Praha, 2021

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 4. 5. 2021

Kristýna Hudáčková

## **Poděkování**

Ráda bych poděkovala celé mé rodině a přátelům za podporu, a také RNDr. Jiřímu Mašínovi, Ph.D. za zasvěcení do tématu a značnou trpělivost při vedení mé práce.

## Abstrakt

Posttranslační modifikace proteinů jsou rozšířeným mechanismem, který využívají prokaryotické i eukaryotické buňky pro zvýšení diverzity proteomu. Při posttranslačních modifikacích může docházet k přidávání funkčních skupin, proteinů, proteolytickému štěpení regulačních podjednotek, nebo k degradaci proteinů. Mezi posttranslační modifikace patří například fosforylace, glykosylace, acetylace, modifikace mastnou kyselinou, ubiquitinace či proteolýza. Tyto modifikace mohou ovlivňovat téměř všechny aspekty buněčné biologie či patogeneze. Toxiny produkované mikroorganismy jsou důležitými faktory virulence. Mnoho bakteriálních toxinů využívá posttranslační modifikaci pro svou aktivaci. Do této skupiny patří například listeriolysin O, toxiny bakterie *Bacillus anthracis* či toxiny klostridií. Velkou skupinou toxinů, které jsou aktivovány modifikací mastnou kyselinou, jsou tzv. RTX toxiny (z anglického Repeats-in-ToXin) gramnegativních patogenních bakterií, mezi které patří například adenylát cyklázový toxin bakterie *Bordetella pertussis*, případně  $\alpha$ -hemolysin produkovaný uropatogenními bakteriemi *Escherichia coli*.

**Klíčová slova:** posttranslační modifikace v prokaryotech a eukaryotech, bakteriální toxiny, aktivace bakteriálních toxinů, aktivita bakteriálních toxinů, interakce s buňkou, RTX toxiny

## Abstract

Posttranslational modifications of proteins are a widespread mechanisms used by both prokaryotic and eukaryotic cells for increase the diversity of the proteome by the addition of functional groups, proteins, proteolytic cleavage of regulatory subunits, or degradation of entire proteins. These modifications include for example phosphorylation, glycosylation, acetylation, lipidation, ubiquitination or proteolysis and affect almost all aspects of cell biology and pathogenesis. Toxins produced by microorganisms are important virulence factors. Many of these bacterial toxins use posttranslational modification for their activation, as for example listeriolysin O, toxins of *Bacillus anthracis* or clostridial toxins. Large group of bacterial toxins activated by fatty acid are RTX (from Repeats-in-ToXin) toxins of Gram-negative pathogens, including *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin or  $\alpha$ -hemolysin secreted by uropathogenic *Escherichia coli*.

**Keywords:** posttranslational modifications in prokaryotes and eukaryotes, bacterial toxins, activation of bacterial toxins, activity of bacterial toxins, interaction with cell, RTX toxins

## Seznam zkratek

28S	velká podjednotka ribozomu
AcP	acetyl fosfát (z angl. acetyl phosphate)
ACP	acyl nesoucí protein (z angl. acyl carrier protein)
ActA	protein polymerizující aktin (z angl. actin-polymerizing protein)
ADP	adenosin difosfát (z angl. adenosine diphosphate)
AMP	adenosin monofosfát (z angl. adenosine monophosphate)
ARC	ATPázový komplex vytvářející kruh (z angl. ATPase forming ring-shaped complexes)
ATP	adenosin trifosfát (z angl. adenosine triphosphate)
Bvg	dvousložkový systém bakterie <i>Bordetella</i> (z angl. <i>Bordetella</i> virulence gene)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát (z angl. cyclic adenosine monophosphate)
CMG2	kapilární morfogenetický protein 2 (z angl. capillary morphogenesis protein 2)
CNF1	cytotoxický nekrotizující faktor 1 (z angl. cytotoxic necrotizing factor 1)
CoA	koenzym A (z angl. coenzyme A)
CopB	vnější membránový protein B bakterie <i>Catarrhalis</i> (z angl. <i>Catarrhalis</i> outer membrane protein B)
CyaA	adenylát cyklázový toxin (z angl. adenylate cyclase toxin)
CyaC	acyltransferáza (z angl. acyltransferase CyaC)
Dop	deamidáza proteinu Pup (z angl. deamidase of Pup)
DUBs	enzymy odstraňující ubikvitin (z angl. deubiquitylating enzymes)
ERK	kináza (z angl. extracellular signal-regulated kinase)
Fap1	protein spojený s fimbriemi 1 (z angl. fimbriae-associated protein 1)
GalNac	N-acetylgalaktosamin (z angl. N-acetylgalactosamine)
GDP	guanosin difosfát (z angl. guanosine diphosphate)
GEF	guaninový výměňný faktor (z angl. guanine nucleotide exchange factor)
GlcNac	N-acetylglukosamin (z angl. N-acetylglucosamine)
GNATs	Gcn5 histonové N- acetyltransferázy (z angl. Gcn5-related N-acetyltransferase)
GPI	glykosylfosfatidylinositolová kotva (z angl. glykosylfosfatidylinositol anchored protein)

GTP	guanosin trifosfát (z angl. guanosine triphosphate)
HDAC1	histonová deacetyláza 1 (z angl. histone deacetylase 1)
HK	histidin kináza (z angl. histidine kinase)
HlyA	$\alpha$ -hemolysin bakterie <i>Escherichia coli</i> (z angl. $\alpha$ -hemolysin from <i>E. coli</i> )
HlyC	hemolysin-aktivující acyltransferáza (z angl. hemolysin-activating acyltransferase)
IL-8	interleukin 8 (z angl. interleukin-8)
Lgt	lipoproteinová diacylglyceryl transferáza (z angl. lipoprotein diacylglyceryl transferase)
InIA	internalin A
InIB	internalin B
LLO	listeriolysin O (z angl. listriolysin O)
LLO	oligosacharidový prekurzor (z angl. lipid-linked oligosaccharide precursor)
LtxA	leukotoxin A
MAPK	mitogenem aktivované proteinkinázy (z angl. mitogen-activated protein kinases)
MARCKS	mirystoylovaný substrát bohatý na alanin (z angl. mirystoylated alanine-rich C kinase substrate)
MEK2	mitogenem aktivovaná proteinová kináza 2 (z angl. mitogen-activated protein kinase 2)
MKK6	mitogenem aktivovaná proteinová kináza 6 (z angl. mitogen-activated protein kinase 6)
Mpa	mykobakteriální proteazomová ATPáza (z angl. mycobacterial proteasome ATPase)
NAD	nikotinamid (z angl. nicotinamide)
NDP	nukleotid difosfát (z angl. nukleotide diphosphate)
O-OST	oligosacharyl transferáza využívaná při o-glykosylaci (z angl. O-oligosacharyl transferase)
OspF	vnější F protein bakterie <i>Shigella</i> (z angl. outer <i>Shigella</i> protein F)
OspG	vnější G protein bakterie <i>Shigella</i> (z angl. outer <i>Shigella</i> protein G)
OST	oligosacharyl transferáza (z angl. oligosaccharyl transferase)
PA	protektivní antigen (z angl. protective antigen)
PafA	proteazomový doplňkový faktor A (z angl. proteasome accessory factor A)
PrpA	prolinový racemasový protein A (z angl. proline racemase protein A)

Pup	prokaryotický protein podobný ubikvitinu (z angl. prokaryotic ubiquitin-like protein)
Rho	homolog ze skupiny Ras proteinů (z angl. Ras homolog family member)
RIP	protein inaktivující ribozomy (z angl. ribosome-inactivating protein)
RR	regulátor odpovědi (z angl. response regulator)
Ser	serin
SNAP25	synaptosomálně asociovaný protein, 25kDa (z angl. synaptosomal-associated protein, 25kDa)
SOD	superoxid dismutáza (z angl. superoxide dismutase)
SopA	vnější membránová protéza bakterie <i>Shigella</i> (z angl. <i>Shigella</i> outer membrane protease)
SopE	vnější protein E bakterie <i>Salmonella</i> (z angl. <i>Salmonella</i> outer protein E)
SptP	tyrosin fosfatáza bakterie <i>Salmonella</i> (z angl. <i>Salmonella</i> protein tyrosine phosphatase)
SpvC	virulenční plasmid C bakterie <i>Salmonella</i> (z angl. <i>Salmonella</i> plasmid virulence C)
Src	tyrosin kináza (z angl. tyrosine kinase)
SRR	repetice bohatá na serin (z angl. serin-rich repeat)
SUMO	malý modifikátor podobný ubikvitinu (z angl. Small Ubiquitin-like Modifier)
T1SS	sekreční systém typu 1 (z angl. type 1 secretion system)
T3SS	sekreční systém typu 3 (z angl. type 3 secretion system)
T4SS	sekreční systém typu 4 (z angl. type 4 secretion system)
T6SS	sekreční systém typu 6 (z angl. type 6 secretion system)
TCS	dvousložkový systém (z angl. two component system)
TEM8	tumorový endoteliální marker 8 (z angl. tumor endothelial marker 8)
Thr	threonin
Ubc9	ubikvitinační spojovací enzym 9 (z angl. ubiquitin-conjugating enzyme 9)
UBL	proteiny podobné ubikvitinu (z angl. Ubiquitin-like protein)
UDP	uridin difosfát (z angl. uridine diphosphate)
VAMP-1	membránový protein spojený s vezikuly 1 (z angl. Vesicular Associated Membrane Protein 1)
XopD	efektor typu 3 bakterie <i>Xanthomonas</i> (z angl. <i>Xanthomonas</i> type III effector)

YopJ	vnější membránový protein J bakterie <i>Yersinia</i> (z angl. <i>Yersinia</i> outer membrane protein J)
YopH	vnější membránový protein H bakterie <i>Yersinia</i> (z angl. <i>Yersinia</i> outer membrane protein H)



# Obsah

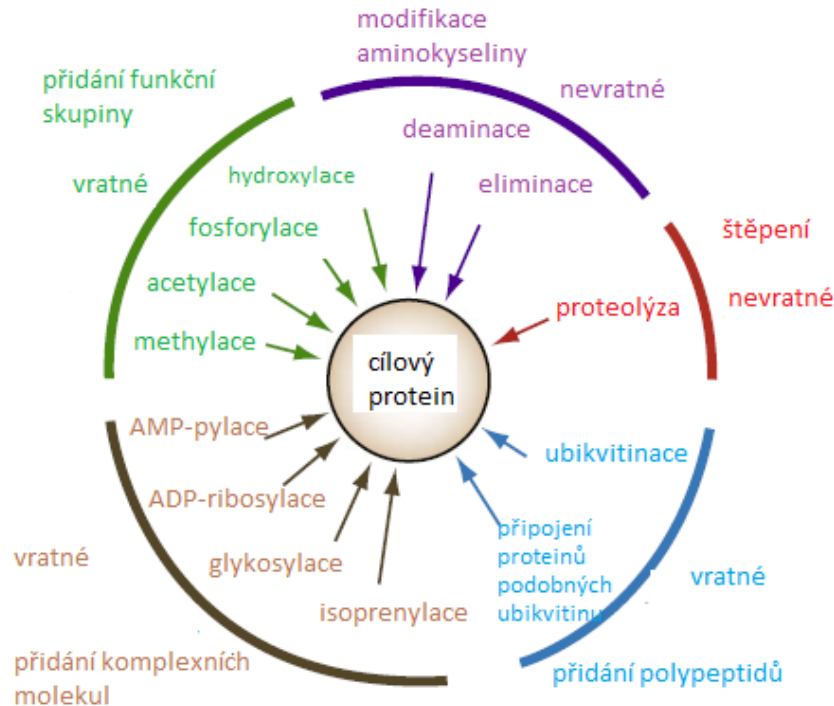
1. Úvod .....	1
2. Eukaryotní versus prokaryotní buňka: rozdíly v modifikacích .....	2
2.1 Glykosylace .....	3
2.2 Lipidace .....	5
2.3 Pupylace, ubikvitinace.....	6
3. Prokaryotní posttranslační modifikace .....	8
3.1 Fosforylace .....	9
3.2 Acetylace.....	11
4. Toxiny.....	12
4.1 Eukaryotní toxiny .....	12
4.2 Prokaryotní toxiny a posttranslační modifikace .....	13
4.2.1 Bakteriální efekty.....	14
4.2.2 Bakteriální efekty a toxiny katalyzující posttranslační modifikace.....	15
4.2.3 Bakteriální toxiny spouštějící posttranslační modifikace.....	16
4.2.4 Bakteriální efekty modifikovány v průběhu infekce .....	17
4.2.5 Aktivita Listeriolysinu O (LLO).....	18
4.2.6 RTX toxiny .....	19
5. Závěr.....	23
6. Seznam použité literatury.....	24

## 1. Úvod

Posttranslační modifikace proteinů jsou klíčem ke zvýšení diverzity proteomu a to například kovalentním přidáváním funkčních skupin, proteolytickým štěpením regulačních podjednotek nebo degradací celých proteinů. Mezi tyto modifikace patří například fosforylace, glykosylace, ubikvitinace, nitrosylace, methylace, acetylace nebo lipidace. Posttranslační modifikace ovlivňují téměř všechny aspekty normálního fungování buňky. Hrají klíčovou roli v mnoha buněčných procesech, jako jsou například: buněčná diferenciaci, degradace proteinů, signalizační a regulační procesy, regulace genové exprese nebo vzájemné interakce proteinů. Proto je identifikace a porozumění posttranslačním modifikacím zásadní při studiu buněčné biologie, případně léčbě a prevenci nemocí.

Posttranslační modifikace může nastat v jakémkoliv kroku "životního cyklu" proteinu. Mnoho proteinů je modifikováno krátce po dokončení translace za účelem správné konformace proteinu nebo cílení vznikajícího proteinu do odlišných buněčných kompartmentů (např. do jádra nebo membrány). Další modifikace nastávají až poté, co je dokončeno sbalování a lokalizace proteinů, což je potřeba například k aktivaci nebo inaktivaci katalytické aktivity nebo ovlivnění jiné biologické aktivity proteinu. Proteiny jsou také kovalentně vázány na značky, které označí protein k degradaci.

Posttranslační modifikace mohou cílit na postranní řetězce aminokyselin nebo peptidové vazby proteinů. Často jsou katalyzovány enzymy. Mezi tyto enzymy patří například kinázy, fosfatázy, transferázy a ligázy. Ty přidávají nebo naopak odebírají funkční skupiny, proteiny, lipidy nebo cukry na nebo z postranních řetězců aminokyselin. Do jiné skupiny patří proteázy, které štěpí peptidové vazby za účelem odstranění specifických sekvencí nebo celých regulačních podjednotek proteinů. Mnoho proteinů také může modifikovat samo sebe za použití autokatalytických domén, jako je například autokináza a autoprotolytická doména. Posttranslační modifikace mohou být vratné nebo nevratné (Obrázek 1). Například kinázy fosforylují proteiny na specifických postranních řetězcích aminokyselin, což je běžný způsob katalytické aktivace nebo deaktivace. Fosfatázy naopak hydrolyzují fosfátovou skupinu, čímž jí odstraní z proteinu a změní biologickou aktivitu celého proteinu. Většina známých posttranslačních modifikací není stechiometrická, což znamená, že tyto modifikace nejsou přítomny na všech molekulách daného proteinu (Olsen a Mann, 2013).



**Obrázek 1. Typy posttranslačních modifikací podle tříd.** Jedná se o modifikace postranního aminokyselinového řetězce, přidání chemické skupiny, komplexních molekul, polypeptidů nebo proteolytické štěpení. Většina z modifikací probíhá vratně. Upraveno z Ribet a Cossart, 2010.

## 2. Eukaryotní versus prokaryotní buňka: rozdíly v modifikacích

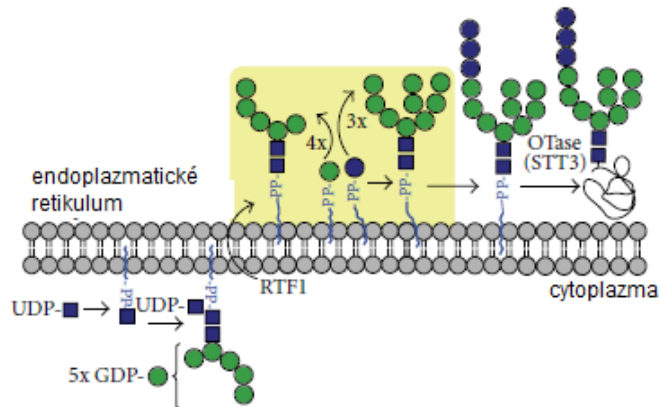
Až polovina všech proteinogenních aminokyselin může být modifikována. Modifikace může probíhat jak na malých chemických skupinách, jako jsou metylové skupiny, acetylové a fosfátové skupiny, ale i na těch komplexnějších, jako jsou například polypeptidové řetězce. Příkladem je eukaryotický protein ubikvitin nebo jeho obdoba vyskytující se u prokaryot, a to protein Pup (prokaryotic ubiquitin-like protein, Pearce *et al.*, 2008). Aminokyseliny, které bývají nejčastěji modifikovány, obsahují ve vedlejší řetězci hydroxy a amino skupinu. Velmi časté jsou také modifikace aminokyselin obsahující thiolovou skupinu tedy například serin, treonin, tyrosin, histidin, lysin nebo cystein.

Většina posttranslačních modifikací probíhá za účasti enzymů. Fosforylace se neobejde bez kináz a fosfatáz, acetylace bez acetyltransferáz a deacetyláz a ubikvitinace bez ubikvitinových ligáz a deubikvitináz. Některé modifikace mohou dokonce probíhat bez účasti enzymů. Mezi takové patří S-thiolace, která je způsobena mnoha reaktivními molekulami kyslíku, dusíku nebo chloru, které indukují různé modifikace thiolové skupiny a regulují tak specifické transkripční faktory, zapojené do exprese detoxifikačních cest. Tato modifikace byla objevena u různých Gram pozitivních bakterií, například u rodů *Bacillus* a *Staphylococcus* (Loi *et al.*, 2015).

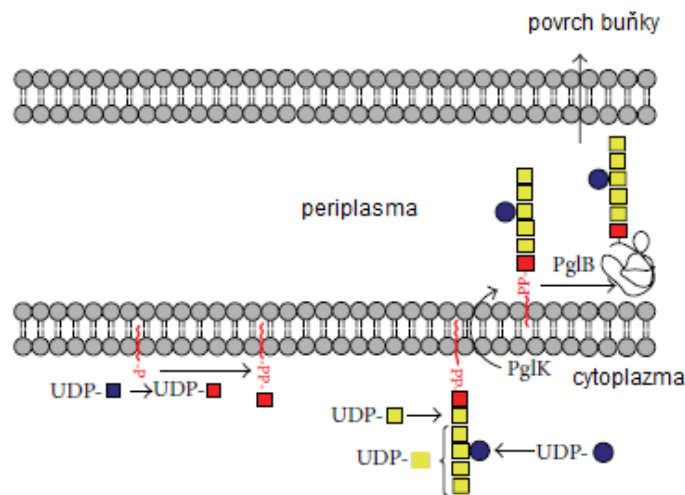
## 2.1 Glykosylace

Glykosylace je všudypřítomná posttranslační modifikace, vyskytující se ve dvou formách. První formou je N-glykosylace, jejíž podstata je v připojení cukrů k atomu dusíku asparaginu nebo argininu. Druhou formou je O-glykosylace, kdy se připojí cukry k hydroxy skupině serinových nebo threoninových zbytků. Hlavní typy bakteriálních proteinů, které podléhají O-glykosylaci jsou povrchové proteiny, jako jsou adhesiny (Charbonneau *et al.*, 2007), bičíky (Logan 2006) a sekretované toxiny (Just *et al.*, 1995). N-glykosylované proteiny se také běžně vyskytují na povrchu bakterií, což dokládají i studie prováděné na bakterii *Campylobacter jejuni* (Wacker, 2002). Zatímco eukaryota využívají glykosylaci spíše k regulaci správného skládání bílkovin a k mezibuněčným interakcím, v bakteriích je glykosylace zásadní z hlediska patogeneze (Guerry *et al.*, 2006). V bakteriích nicméně není glykosylace proteinů omezena pouze na patogenní bakterie, ale existuje i u komensálů, jako jsou některé rody *Bacteroides* (Nothhaft a Szymanski 2010). U skupin *Eukarya* a *Archea* se velmi hojně vyskytuje N-glykosylace zprostředkovávaná oligosacharyltransferázou (OST), u bakterií se vyskytuje omezeně. Další typ, postupná cytoplazmatická N-glykosylace se vyskytuje pouze u bakterií. Oproti tomu OST zprostředkovaná O-glykosylace se projevuje v bakteriích a postupná O-glykosylace u eukaryot a bakterií (Dell *et al.*, 2010).

N-glykosylace je modifikace velmi běžná u eukaryot a archeí, u prokaryot se vyskytuje méně. N-glykosylace u eukaryot a bakterií je znázorněna na obrázcích 2 a 3. Byla dlouho považována za modifikaci probíhající výhradně v eukaryotických buňkách. Poté však bylo zjištěno, že S-vrstva proteinu z *Halobacterium salinarum* obsahuje glykany kovalentně připojené k asparaginovým zbytkům (Mescher *et al.*, 1976). Výzkumem na patogenu *Campylobacter jejuni* bylo dále ukázáno, že prokaryota mají také N-glykosylační systém (Young *et al.*, 2002). Na základě této práce bylo zjištěno, že prokaryota i eukaryota provádějí N-glykosylaci stejným způsobem. Dochází k postupnému skládání cukrů v cytoplazmě za vzniku oligosacharidových prekurzorů připojených přes pyrofosfát nebo fosfát na lipidový nosič tzv. LLO (lipid-linked oligosaccharide precursor). V eukaryotech je v LLO lipidovou složkou dolichol. Bakterie mají místo toho undekaprenol, který má oproti dolicholu navíc jednu dvojnou vazbu. Tato dvojitá vazba brání rotační mobilitě, což brání prodlužování řetězce po vstupu LLO z cytoplazmy do lumen endoplazmatického retikula hostitele. N-glykosylace zatím nebyla pozorována u Gram-pozitivních bakterií (Dell *et al.*, 2010).



**Obrázek 2. N-glykosylace u eukaryot.** Zeleně jsou schematicky znázorněny molekuly manózy, modré čtverce jsou GlcNAc, modrá kolečka znázorňují glukózu, modrý řetězec znázorňuje dolichol fosfát, GDP = guanosin difosfát, UDP = uridin difosfát. Upraveno z Dell *et al.*, 2010.



**Obrázek 3. N-glykosylace u bakterií.** Modrý čtverec schematicky znázorňuje GlcNAc, červené čtverce znázorňují tzv. bacillosaminy, žluté čtverce jsou GalNAc, modré kolečko je glukóza, červený řetězec je undekaprenyl fosfát. Upraveno z Dell *et al.*, 2010.

O-glykosylace se vyskytuje u skupin *Archea*, *Bacteria* i *Eukarya*. Tato modifikace probíhá nejčastěji na aminokyselinách s funkčními hydroxylovými skupinami, což jsou například serin a threonin. Během let výzkumu na glykosylaci bakterií rodu *Neisseria* a *Pseudomonas* bylo zjištěno, že O-glykosylace se velmi podobá N-glykosylaci. O-glykosylace byla poprvé charakterizována u bakterie *Neisseria meningitidis*, kde se prokázalo, že pilusový protein je modifikován trisacharidem (Stimson *et al.*, 1995). Následné šetření vedlo k identifikaci O-oligosacharyltransferázy (O-OST), která se nazývá se PgL (Power *et al.*, 2006). Patří do skupiny bakteriálních OST, které mají za úkol O-glykosylovat piliny typu IV.

Eukaryotická O-glykosylace je postupný proces, který začíná připojením spojovacího monosacharidu k akceptoru (serin nebo threonin). Další cukry se přidávají jeden po druhém,

až do vytvoření zralého glykanu. Mnoho eukaryotických O-glykanů je mucinového typu a jsou spojeny prostřednictvím GalNAc (N-acetylgalaktosaminu), ale existují i další třídy, které jsou připojeny k proteinům prostřednictvím různých cukrů. Jsou to například: fukóza, manóza, glukóza, galaktóza a další. Eukaryotická O-glykosylace probíhá většinou v Golgiho aparátu nebo v endoplasmatickém retikulu. Přes spojovací cukry je možné připojit obrovské množství sekvencí, což zajišťuje glykosylaci v eukaryotech značnou rozmanitost (Hug a Feldman, 2011). Také u prokaryot je O-glykosylace velmi rozmanitá. Nejsložitější struktury byly nalezeny v bakteriích v jejich S-vrstvách. V posledních letech se ukázalo, že mnoho bakteriálních biofilmů obsahuje glykoproteiny, jejichž složení je velmi podobné mucinu. Mucin je eukaryotický glykoprotein, který obsahuje tandemové repetice sekvencí, které bývají rozsáhle glykosylované (Peng *et al.*, 2008). Nejlépe charakterizované jsou tzv. serinem-bohaté repetice (SRR) u glykoproteinů, patřících do rodiny Fap1 (fimbriae-associated protein 1), které jsou konzervovány u rodů *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Lactobacillus* a jsou nezbytné pro tvorbu bakteriálního biofilmu a při patogenezi.

## 2.2 Lipidace

Lipidace je důležitou modifikací, při které jsou lipidové skupiny kovalentně připojeny k proteinům. Lipidace výrazně zvyšuje hydrofobní vlastnosti proteinů, což vede ke změně jejich konformace a stability, asociaci s membránou, lokalizaci, přenosu a změně vazebné afinity proteinů k jejich kofaktorům. Různé lipidy a lipidové metabolity slouží jako proteinové lipidační skupiny. Vnitrobuněčné koncentrace těchto lipidů a jejich derivátů je přísně regulována buněčným metabolismem. Proteiny mohou být kovalentně modifikovány různými typy lipidů, včetně mastných kyselin, isoprenoidů, sterolů, fosfolipidů nebo glykosylfosfatidylinositolových kotev (GPI). Syntéza lipidů se přímo zapojuje do homeostázy v buňce. Deregulace metabolismu lipidů může vést u člověka k rozvoji některých onemocnění (neurologické poruchy, metabolické onemocnění, rakovina).

Lipidace se účastní dozrávání mnoha proteinů a to v prokaryotické i eukaryotické buňce. Mechanismus je ale v každé buňce jiný. Liší se podle toho, která mastná kyselina byla přenesena, která aminokyselina byla modifikována, a podle toho, kdo byl donorem mastných acylových zbytků. Nejčastěji jsou připojovány kyselina myristová a kyselina palmitová. Proteiny jsou rozříděny na vnější membránu (v případě bakterií) nebo na plazmatickou membránu (v případě eukaryot). Takto připravené podstoupí zpracování, ve kterém je acylová skupina připojena k N-konci aminokyseliny. Tohoto procesu se účastní enzymy s acyltransferázovou, lipázovou nebo esterázovou aktivitou, které, přes esterovou vazbu katalyticky připojí acylovou skupinu k serinovým nebo cysteinovým zbytkům. Eukaryotické proteiny využívají esterovou palmitoylaci a etherovou prenylaci cysteinových zbytků. Mastné acylové skupiny jsou nepřímo připojovány k eukaryotickým proteinům přes

skupinu GPI. U bakterií jsou acylové skupiny připojovány přes ACP (Stanley *et al.*, 1998). Bakteriím chybí acyltransferázy přítomné v eukaryotech, využívají proto jiné specificky bakteriální enzymy a to například prolipoprotein diacylglyceryl transferázu (Sankaran a Wu, 1994).

V procesu zvaném acylace mastnou kyselinou se nasycené i nenasycené mastné kyseliny připojují k cysteinovým, serinovým nebo lysinovým zbytkům. Připojení myristátu, skládajícího se ze 14 uhlíků na N-konec glycinu, je stabilní a nevratná modifikace, která je katalyzována N-myristoyltransferázami. Nedávné proteomické studie naznačují, že v lidských buňkách je myristoylováno více než 100 proteinů (Thinon *et al.*, 2014). S-palmitoylace (také nazývána jako S-acylace) je další z forem acylace mastných kyselin, při které je lipidový řetězec, např. kyselina palmitová, nebo kyselina stearová, připojena na cysteinové zbytky, přes thioesterovou vazbu. Kvůli labilní povaze thioesterové vazby je tato modifikace reverzibilní. Modifikace proteinů pomocí isoprenoidů, je známá jako prenylace. Většina proteinů, které podléhají prenylaci obsahuje na svém karboxylovém konci motiv CAAX, ve kterém je zbytek cysteinu modifikován farnesyltransferázou nebo geranylgeranyltransferázou I (Chen *et al.*, 2018). Tyto tři typy lipidace, tedy myristoylace, S-palmitoylace a prenylace probíhají v cytoplazmě (Nadolski a Linder, 2007).

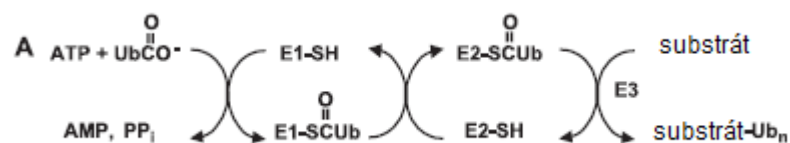
Bray a kolegové (2009) pro výzkum k úloze lipoproteinů v bakteriální buňce vytvořili mutantní *Streptococcus agalactiae*, deficitní v enzymu Lgt. Tento enzym je důležitý při lipidaci proteinů. Ztráta lipidace neměla vliv na životaschopnost bakterie. Inaktivace Lgt vedla ale ke změnám v polysacharidových kapsulích bakterií, což se projevilo významným snížením adherence bakterií k lidským endoteliálními buňkám. Tyto data naznačují, že lipoproteiny mohou hrát důležitou úlohu v interakcích patogen-hostitel.

### 2.3 Pupylice, ubikvitinace

Proteiny mohou být degradovány připojením malého proteinu. V eukaryotních buňkách se tomuto jevu říká ubikvitinace, v prokaryotních buňkách probíhá obdobný proces, který se nazývá pupylace. Posttranslační modifikace proteinů spočívající v kovalentním připojení jiného malého proteinu jsou přední vlastností eukaryot, kde se často vyskytují modifikace s ubikvitinem nebo s podobně malými proteiny.

Ubikvitin je malý protein o velikosti přibližně 9 kDa, přítomný ve všech eukaryotech. Ubikvitinace, neboli kovalentní přidání jednoho nebo několika ubikvitinů na cílový protein, je nezbytnou posttranslační modifikací v eukaryotických buňkách. Probíhá ve třech po sobě jdoucích krocích, kterými jsou: aktivace, konjugace a ligace. Jednotlivé kroky zajišťují tři různé enzymy: aktivační enzymy E1, konjugační enzymy E2 a E3 ubikvitinové ligázy. Výsledkem těchto postupných reakcí je navázání ubikvitinu na: i) lysinové zbytky na

proteinovém substrátu prostřednictvím isopeptidové vazby, ii) cysteinové zbytky přes thioesterovou vazbu, iii) serinové a threoninové zbytky přes esterovou vazbu nebo iv) aminoskupinu N-konce proteinu prostřednictvím peptidové vazby (Pickart a Eddins, 2004). K aktivaci dochází díky enzymu E1, který potřebuje ke své aktivitě ATP. Tato fáze má dva mezikroky. V tom prvním enzym E1 váže ATP, ubikvitin a katalyzuje acyl-adenylaci C-konce molekuly ubikvitinu. Ve druhém mezikroku je ubikvitin přenášen na aktivní místo cysteinového zbytku, se současným uvolňováním AMP. To vede ke vzniku thioesterové vazby mezi C-koncem ubikvitinu a sulfhydrylovou skupinou cysteinu. Při konjugaci katalyzují E2 enzymy přenos ubikvitinu esterifikační reakcí. Enzym E2 se váže na aktivovaný ubikvitin i na enzym E1. V posledním kroku, ligaci, jsou využívány E3 enzymy. Ty vytvářejí isopeptidovou vazbu mezi lysinem cílového proteinu a C-koncem glycinu ubikvitinu. Enzymy E3 jsou schopné jak interakce s E2, tak se substrátem, některé E3 dokonce aktivují E2 (Pickart, 2001). Ubikvitin E3 ligázy kontrolují specifitu substrátu tím, že přímo interagují s cílovými proteiny. Všechna eukaryota kódují několik enzymů E2 a E3, což umožňuje modifikaci mnoha různých proteinů. Ubikvitinace je vratná modifikace, deubikvitinační enzymy (DUBs), odebírají ubikvitin z cílového proteinu (Ribet a Cossart, 2010). Proces ubikvitinace je schematicky znázorněn na obrázku 4.



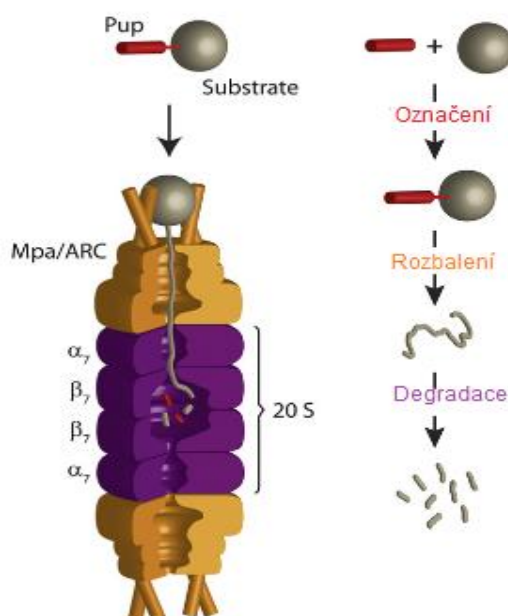
**Obrázek 4. Schematické znázornění ubikvitinace.** Ub = ubikvitin. Upraveno z Pickart a Eddins, 2004.

Aktinobakterie kódují malý protein, funkčně podobný ubikvitinu, který je označován jako Pup (prokaryotic ubiquitin-like protein, Pearce *et al.*, 2008). Pup je vnitřně neuspořádaný protein, skládající se z 60-70 aminokyselinových zbytků. Stejně jako ubikvitin slouží Pup k nasměrování proteinů do proteazomu k degradaci.

Zatímco všechna eukaryota i archea využívají proteazom k degradaci proteinů, jen některé druhy bakterií mají proteazom. Proteazom je komplexní struktura ve tvaru barelu. Proteolýza závislá na ATP, která v něm probíhá je pro eukaryota nezbytná a je důležitá pro mnoho buněčných procesů, jako je buněčný cyklus, transkripce nebo regulace hladiny enzymů. K dopravení proteinů do proteazomu používají bakterie pupylaci. Pro *Mycobacterium tuberculosis* je degradace pupylovaných substrátů nezbytná pro virulenci. Studium bakteriálního proteazomu bylo zjištěno, že proteazomální degradace závislá na ATP je důležitá pro normální fyziologii *M. tuberculosis* (Becker a Darwin, 2016). Enzymologie pupylace je odlišná od ubikvitinace. Pup může být navázán k postranním řetězcům lysinu



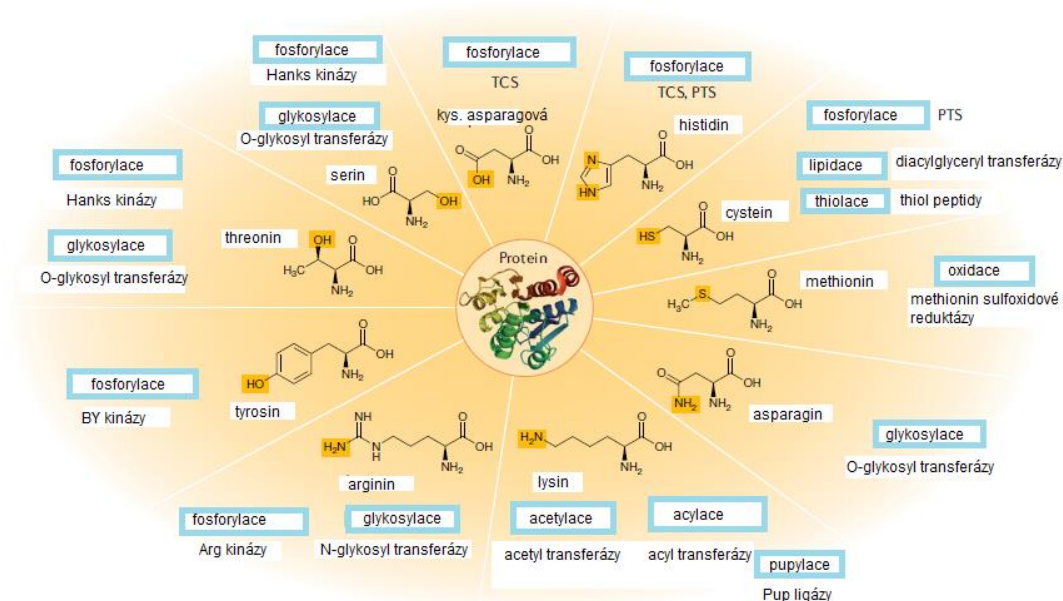
cílového proteinu pomocí karboxylátu jeho karboxy-koncového glutamátového zbytku, v procesu zvaném pupylace (Striebel *et al.*, 2009). Pupylace probíhá ve dvou krocích. Při pupylaci je Pup připojen k lyzinovému zbytku cílového proteinu přes izopeptidovou vazbu. Tento krok je katalyzován enzymem PafA (Pearce *et al.*, 2008). Proti němu pracuje tzv. depupylační enzym Dop, který zprostředkovává štěpení izopeptidové vazby a tedy uvolnění Pup z modifikovaného proteinu (Burns *et al.*, 2010). V bakteriích, které mají proteazom (tedy mykobakterie a některé aktinobakterie), jsou pupylované proteiny přijímány do 20S proteazomu pomocí ATP-závislého regulátoru Mpa (mykobakterie) nebo pomocí ARC (aktinobakterie), (Pearce *et al.*, 2008). Po připojení na Mpa nebo ARC N-koncovou doménu přejímá Pup helikální strukturu k vytvoření třívláknové spirály a zapojí svůj vlastní N-konec do póru Mpa nebo ARC (Striebel *et al.*, 2010). Pupylované substráty jsou rozbaleny provlečením přes centrální pór a translokovány do 20S, kde jsou degradovány na malé peptidy (Striebel *et al.*, 2014). Proces pupylace je schematicky znázorněn na obrázku 5.



**Obrázek 5. Schematické znázornění procesu pupylace.** Upraveno z Striebel *et al.*, 2014.

### 3. Prokaryotní posttranslační modifikace

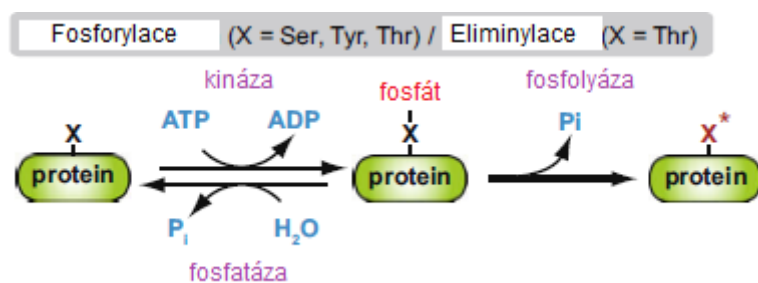
V současnosti velice razantně vzrostl počet posttranslačních modifikací objevených a charakterizovaných v bakteriích. Mezi proteinové modifikace v bakteriích patří modifikace jako: fosforylace, acetylace, SUMOylace, glykosylace nebo lipidace. Vybrané modifikace jsou znázorněny na obrázku 6, spolu s účastnicími se enzymy.



**Obrázek 6. Posttranslační modifikace v bakteriích.** Na obrázku jsou znázorněny proteinové zbytky, které mohou být kovalentně modifikovány. Tento obrázek shrnuje nejen modifikace, ale i účastníci se reakce. Reaktivní skupiny jsou zvýrazněny žlutě. TCS = dvousložkový systém, PTS = fosfotransferázový systém. Upraveno z Macek *et al.*, 2019.

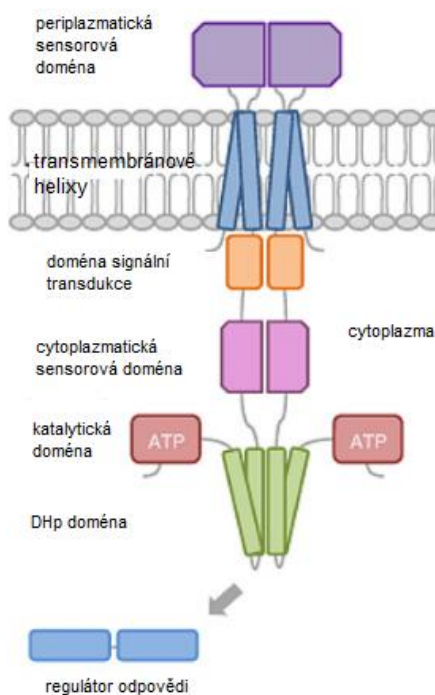
### 3.1 Fosforylace

Fosforylace je jedna z nejběžnějších posttranslačních modifikací. Spočívá ve vratném připojení fosfátové skupiny ke specifickému zbytku cílového proteinu. Proteinová fosforylace je enzymaticky katalyzována kinázami, které přenáší fosfátovou skupinu z ATP na cílový protein vytvořením fosfoesterové vazby. Protichůdná reakce, defosforylace, je katalyzována fosfatázami. Ty naopak hydrolyzují fosfoesterovou vazbu, čímž způsobí uvolnění fosfátové skupiny a získávají akceptorovou aminokyselinu ve své nefosforylované formě (Obrázek 7). V bakteriích se fosforylace objevuje na postranních řetzcích serinu, threoninu, tyrosinu, histidinu, argininu, lysinu a cysteinu (Mijakovic *et al.*, 2016).



**Obrázek 7. Schematické znázornění fosforylace.** Fialově jsou označeny enzymy katalyzující reakci, modře kofaktory. Skupina přidaná k cílovému proteinu je vyznačena červeně. X\* nefosforylovatelná aminokyselina. Upraveno z Ribet a Cossart, 2010.

Z hlediska bakteriálních modifikací je fosforylace prostudována asi nejvíce. Při tomto procesu bakterie využívá takzvaný dvousložkový systém (two component system; TCS). Proteiny ze kterých je TCS tvořen, zahrnují sensorovou histidin kinázu (HK) a regulátor odpovědi (RR), (Obrázek 8, Zschiedrich *et al.*, 2016). Tyto dva faktory patří mezi nejhojnější proteiny v sekvenčních databázích, vzhledem k široké distribuci v bakteriální a archeální říši a díky významné amplifikaci v bakteriálních a archeálních genomech (Ulrich a Zhulin, 2010). HK a RR slouží jako spojnice mezi dvěma procesy. Prvním je buněčný signál, nebo signál prostředí a druhým je adekvátní buněčná odpověď. Komunikace mezi proteiny probíhá přenosem fosfátové skupiny z histidinu HK na aspartát RR. Některé HK fungují také jako fosfatáza pro své příslušné RR za určitých podmínek (Igo *et al.*, 1989).



**Obrázek 8. Schématické znázornění dvousložkového systému.** Schématické znázornění membránově vázané sensorové histidin kinázy, zahrnující domény pro rozpoznávání signálu, pro přenos signálu a katalýzu. Upraveno z Zschiedrich *et al.*, 2016.

V patogenních bakteriích bylo zaznamenáno, že TCS jsou schopné rozpoznat přítomnost v hostiteli a spouštějí mechanismy virulence (Deng *et al.*, 2018), nebo mechanismy úniku při léčbě antibiotiky (Namugenyi *et al.*, 2017). To je důvod, proč jsou TCS životně důležité pro patogenitu bakterií. Nedávno bylo zjištěno, že Ser/Thr kinázy, které mají obvykle více substrátů, mohou také fosforylovat regulátory odezvy TCS. Ser/Thr kináza PknB z *Mycobacterium tuberculosis* byla nalezena v procesu fosforylace regulátoru odezvy DevR z *Mycobacterium smegmatis* (Bae *et al.*, 2017). Podobně je to u Ser/Thr kinázy PrkC

z *Bacillus subtilis*, která fosforyluje regulátor odezvy WalR28 (Libby *et al.*, 2015). Oba tyto procesy fosforylace se vyskytují na threoninových zbytcích regulátorů odpovědi a modelují jejich vazbu na cílovou DNA.

Podobný dvousložkový systém využívá původce černého, nebo též dávivého kašle, bakterie *Bordetella pertussis*. Nazývá se BvgAS a skládá se z histidinkinázy BvgS a regulátoru odpovědi BvgA. Tento systém je hlavní regulátor virulence této bakterie (Hot *et al.*, 2003) a je koordinován úrovní vnitrobuněčného fosforylovaného BvgA (Williams *et al.*, 2005).

Většina fosforylací, probíhajících na serinových nebo threoninových zbytcích, je prováděna za účasti tzv. Hanks-kináz (Stancik *et al.*, 2018). Fosforylace na tyrosinu, jsou katalyzovány tzv. BY kinázami (Mijakovic *et al.*, 2016), které na rozdíl od Hanks kináz byly zatím nalezené pouze u bakterií. Oba druhy těchto kináz mají vliv na regulaci bakteriálních procesů, jako je buněčné dělení, morfogeneze a virulence (Pereira *et al.*, 2011).

Fosforylace argininu byla v bakteriích detekována teprve na počátku 21. století (Fuhrmann *et al.*, 2009), což je pravděpodobně kvůli tomu, že tato modifikace je často nestabilní při  $\text{pH} < 4$ , při kterém je fosfoproteomický vzorek často připravován. Tato modifikace se podílí na stresové reakci grampozitivních bakterií. Je zprostředkována kinázou McsB, která fosforyluje a inaktivuje represor tepelného šoku CtsR (Fuhrmann *et al.*, 2009). V bakterii *B. subtilis* bylo zjištěno, že proteiny tepelného šoku patřící do systému kontroly kvality proteinů, vykazovaly během stresových podmínek zvýšenou hladinu fosforylace argininu (Schmidt *et al.*, 2014). Bylo také zjištěno, že tato fosforylace se často vyskytuje v bakterii *S. aureus*, a to díky zkoumání mutantu *S. aureus*  $\Delta\text{ptpB}$  (protein tyrosine phosphatase B), protože protein PtpB je argininová fosfatáza (Junker *et al.*, 2018).

### 3.2 Acetylce

Acetylce bakteriálních proteinů má důležitou roli v primárním a sekundárním metabolismu, virulenci, případně v regulaci transkripce a translace. Acetát může být přidán i odebrán z lysinového řetězce pomocí lysinových acetyltransferáz a deacetyláz. Některé reaktivní deriváty acetylu mohou také provádět acetylaci, například acetyl-CoA (Kuhn *et al.*, 2014). Lysin má hydrofobní vedlejší řetězec, a obsahuje pozitivně nabitou  $\epsilon$  amino-skupinu. Acetylce lysinu neutralizuje tento pozitivní náboj a také může změnit konformaci proteinů. Mechanismy regulující  $\epsilon$  amino-acetylaci jsou dva: enzymatický a neenzymatický. Ten enzymatický je prováděn lysinovými acetyltransferázami (KAT), které katalyzují přenos acetylové skupiny z acetyl-CoA a  $\epsilon$  amino-skupinu lysinu. V prokaryotních buňkách je acetylce prováděna díky GNAT (Gcn5-related N-acetyltransferase). Mechanismus nevyužívá enzymy a byl identifikován v *Escherichia coli*, kde acetyl fosfát (AcP) přímo daruje svojí acetylovou skupinu  $\epsilon$  amino skupině lysinu (Weinert *et al.*, 2013).

Acetylace lysinu byla poprvé objevena na histonech (Allfrey *et al.*, 1964). Acetylace lysinových zbytků na koncích histonů je jedna z mnoha modifikací, která dokáže ovlivnit tyto proteiny a tvoří tzv. histonový kód, který hraje nezbytnou roli v regulaci transkripce. Některé bakterie modifikují acetylaci histonů po infekci a tímto způsobem změni transkripci specifických genů. Jedním z příkladů je infekce *Listeria monocytogenes* v endoteliálních buňkách, která je spojena s aktivací p38 a ERK MAPK drah. Tato aktivace koreluje se zvýšenou acetylací histonu H3 a H4 a aktivací transkripce MAPK indukovaných genů, jako je IL-8 (Schmeck *et al.*, 2005).

Lysin může být modifikován ještě další podobnou modifikací a to sukcinylací. Prozatím nejsou známy žádné sukcinyl transferázy nebo desukcinylázy, ale například enzym CopB vykazuje desukcinylázovou aktivitu (Colak *et al.*, 2013). Acetylace i sukcinylace mohou probíhat bez přítomnosti enzymů, s účastí acetyl-CoA a acetyl fosfátu nebo sukcinyl-CoA (Wolfe, 2016). Acetylace neutralizuje pozitivní náboj na vedlejším řetězci lysinu, zatímco sukcinylace přidává negativní náboj. Bylo zjištěno, že stejný lysinový řetězec může být zároveň acetylován i sukcinylován (Weinert *et al.*, 2013). Sukcinylace ovlivňuje strukturu proteinu, interakce mezi proteiny a také bakteriím umožňuje rychle se přizpůsobit změnám prostředí. Acetylované a sukcinylované bakteriální proteiny se účastní mnoha procesů, např. metabolismu aminokyselin, translace nebo metabolismu lipidů (Carabetta a Cristea, 2017).

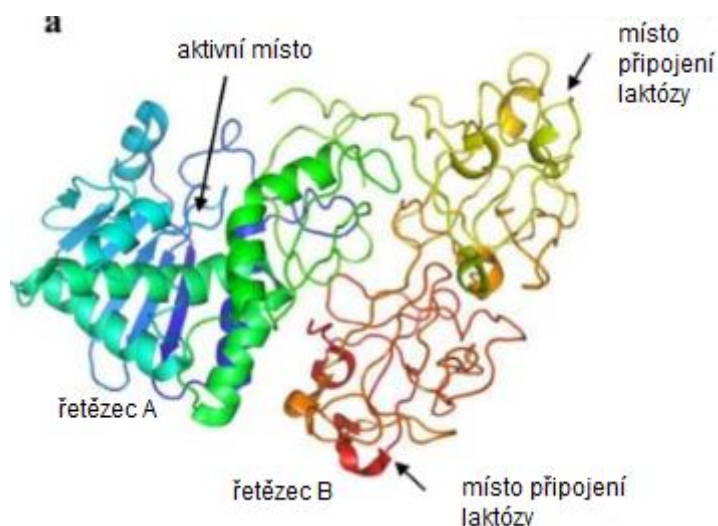
## 4. Toxiny

Toxiny jsou definovány jako malé molekuly, peptidy nebo proteiny, které jsou schopné způsobit onemocnění při kontaktu s hostitelem. Toxiny také mohou být cytotoxické proti širokému spektru buněk. Toxiny mohou být produkovány jak eukaryoty, tak prokaryoty.

Toxiny produkované mikroorganismy jsou důležitými determinanty virulence, zodpovědnými za mikrobiální patogenitu ale i únik před imunitní odpovědí hostitele (Mohamadzadeh, 2009).

### 4.1 Eukaryotní toxiny

Mezi zástupce toxinů z rostlinné říše patří například ricin. Ricin pochází z *Ricinus communis* (čeleď Euphorbiaceae, česky Skočec obecný), známé také jako ricinový bob. Rostlina pravděpodobně pochází z Afriky a Asie a nyní je rozšířená v mírných, subtropických a tropických oblastech, kde roste jako invazivní rostlina. Lisováním semen vzniká ricinový olej, který je po povaření zcela bezpečný a využívá se v potravinářství nebo kosmetice. Bylo prokázáno, že ricin se skládá ze dvou řetězců (A a B) spojených dohromady disulfidovou vazbou (Olsnes a Pihl, 1973). Struktura ricinu je znázorněna na obrázku 9.



**Obrázek 9. Struktura molekuly ricinu.** Domény řetězce A jsou zelené, modré a světle modré; domény řetězce B jsou žluté a oranžové. Upraveno z Polito *et al.*, 2019.

Ricin je klasifikován jako protein inaktivující ribosomy (RIP). Řetězec A inaktivuje ribosomy hydrolýzou N-glykosidické vazby adenosinového zbytku v 28S ribozomální RNA eukaryotických buněk, což inhibuje syntézu proteinů blokováním vazby elongačních faktorů. Tato inhibice syntézy proteinů je mechanismem ricinové toxicity. B řetězec ricinu se váže na cukerné zbytky na povrchu eukaryotických buněk a usnadňuje tak vstup toxinu do buňky (Hayoun *et al.*, 2021).

## 4.2 Prokaryotní toxiny a posttranslační modifikace

Schopnost sekretovat toxiny je hlavním mechanismem patogenicity bakterií. Ty produkují dva typy toxinů, lipopolysacharidy a proteinové toxiny. Lipopolysacharidy (tzv. endotoxiny) jsou toxiny uvolňované při lyzi gramnegativní bakteriální buňky. Proteinové toxiny (tzv. exotoxiny) jsou syntetizovány uvnitř bakteriálních buněk a poté jsou dopravovány různými mechanismy do cílových buněk. Klasifikace bakteriálních toxinů je primárně založena na jejich strukturálních a funkčních skupinách, ale také i na místě jejich působení. Toxiny mohou fungovat více způsoby: mohou inhibovat syntézu bílkovin, jako např. difterický toxin (Holmes, 2000), mohou destruovat buněčné membrány, jako např.  $\alpha$ -hemolysin z *E. coli* (Weiglmeier *et al.*, 2010), aktivují sekundární posly, jako např. cholerový toxin (Sanchez a Holmgren 2011), nebo působí jako enzymy, jako např. botulotoxin (Patel *et al.*, 2014).

Zatímco toxiny grampozitivních bakterií většinou nevyžadují aktivaci, mnoho toxinů produkovaných gramnegativními bakteriemi je translatováno v neaktivní formě a často je k jejich aktivaci potřeba proteolytické štěpení (Stanley *et al.*, 1998). I mnoho neenzymatických toxinů, které interagují s membránou eukaryotické buňky, vyžadují proteolytické štěpení proto, aby byly schopné oligomerizovat a tvořit póry. Například toxin

bakterie *Vibrio cholerae* El Tor je štěpen na svém N-konci (Nagamune *et al.*, 1996), zatímco alfa toxin bakterie *Clostridium septicum* je štěpen na svém C-konci (Ballard *et al.*, 1993).

#### 4.2.1 Bakteriální efekторы

Gramnegativní bakterie, které jsou patogenní pro rostliny, hmyz a zvířata, si vyvinuly mechanismus, aby mohly přenést do eukaryotických buněk více svých proteinů najednou. Pro tuto akci využívají sekreční aparáty typu III, IV a VI (T3SS, T4SS, T6SS, type 3/4/6 secretion system),(Christie *et al.*, 2005; Filloux *et al.*, 2008; Galán a Wolf-Watz, 2006). Tyto aparáty jsou ústřední pro patogenezí bakterií. Proteiny dodávané těmito aparáty jsou označovány jako efekторы a mohou modulovat různé buněčné funkce. Efekторы se liší od bakteriálních toxinů, které jsou také produkty bakterií. Jedinou vlastností toxinů je, že jejich toxické účinky lze pozorovat při exogenním přidání do živých organismů nebo k buňkám. Naproti tomu termín „efekторы“ by měl být vyhrazen pro molekuly, které pro jejich přímou dopravu do cílových buněk vyžadují specializované sekreční aparáty. Rozdíl mezi toxiny a efekторы je ale větší než jen v rozdílném vstupu do buňky. Bakteriální toxiny mají obvykle jedinou biochemickou aktivitu, která přímo působí na specifické buněčné cíle. Naproti tomu efektorové proteiny vykonávají svou specifickou funkci ve shodě s aktivitami mnoha dalších bakteriálních efektorů dodávaných stejným aparátem. Činnosti efektorových proteinů jsou často jemné a jsou více používány na modulaci buněčných funkcí než na nevratné narušení buněčné homeostázy.

T3SS je kódován mnoha patogenními bakteriemi (*Shigella*, *Yersinia*, *Chlamydia*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Bordetella*),(Galán a Wolf-Watz, 2006). Mnoho efektorových proteinů T3SS vykonává svou funkci tak, že napodobují aktivitu buněčných proteinů (Stebbins a Galán, 2001). Některé efekторы sdílejí významnou aminokyselinovou sekvenci, která je obsažená v proteinech eukaryotických buněk (např. kinázy nebo fosfatázy),(Guan a Dixon, 1990; Galyov *et al.*, 1993). Jedním z příkladů jsou efekторы, které cílí na ubikvitinační aparát. Některé T3SS efekторы (např. SopA bakterie *S. typhimurium*) napodobují domény HECT a RING u ubikvitinových ligáz E3 (Diao *et al.*, 2008). Příklady dalších efektorů napodobujících aktivitu proteinů a enzymů, jsou vypsány v tabulce 1.

Tabulka 1. Upraveno z Galán, 2009.

Efaktor	Bakterie	Napodobení
SseL	<i>Salmonella enterica</i>	ubikvitin proteáza
SspH	<i>Salmonella enterica</i>	E3 ubikvitin ligáza
XopD	<i>Xanthomonas campestris</i>	cysteinová proteáza SUMO
IpgB	<i>Salmonella enterica</i>	Rho GTPáza

#### 4.2.2 Bakteriální efekторы a toxiny katalyzující posttranslační modifikace

SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier) je přibližně 10 kDa velký polypeptid. SUMO proteiny patří do skupiny "ubiquitin-like proteins", neboli proteinů podobných ubikvitinu. SUMOylace je řízena enzymatickou kaskádou, která se podobá ubikvitinaci. Na rozdíl od ubikvitinu se ale SUMO nepoužívá k označení proteinů k degradaci. SUMOylace, což je kovalentní připojení SUMO na lysinové zbytky proteinu, se účastní různé enzymy a tato modifikace je velice důležitá pro buněčné funkce, například pro regulaci transkripce, vnitrobuněčný transport nebo stresové reakce (Zhao, 2007). Bylo prokázáno, že patogeny mohou s touto posttranslační modifikací interferovat. Jejich proteiny mohou být substrátem pro SUMOylaci, ale také dokáží změnit mechanismus SUMOylace hostitelských proteinů. Takové mechanismy byly poprvé zaznamenány u virů, u jejichž proteinů byla prokázána SUMOylace v průběhu infekce (Boggio a Chiocca, 2006). Ohledně souvislostí mezi bakteriemi a SUMOylací je toho známo poměrně málo. XopD je T3SS efektor rostlinného patogenu *Xanthomonas campestris*, který podporuje růst bakterií a potlačuje obranu hostitele (Kim *et al.*, 2008). Proteázová aktivita XopD se projevuje pomocí silné specifity pro rostlinné SUMO substráty. To spustí celkovou deSUMOylaci hostitelských proteinů, které jsou v rostlinných buňkách (Hotson *et al.*, 2003). *Xanthomonas* má další efektor, AvrXv4, který má podobné struktury se známými deSUMOylázami. Pokud je tento faktor přítomen v rostlinných buňkách, vede to k poklesu hostitelských proteinů konjugovaných se SUMO (Roden *et al.*, 2004).

Rozsáhlé studie týkající se inhibice MAPK signalizace u efektorů *Yersinia* (YopJ) vedly k objevu, že tyto faktory virulence jsou schopné zprostředkovat acetylaci hostitelských proteinů, včetně MAPK, jako například MEK2 a MKK6 (Mukherjee *et al.*, 2006; Mittal *et al.*, 2006). Tato acetylace probíhá na serinových a threoninových zbytcích v aktivační smyčce cílových kináz a brání tak fosforylaci těchto zbytků, která je důležitým krokem k jejich aktivaci.

*Shigella flexneri*, původce bakteriální úplavice (shigelóza; bakteriální dysenterie), produkuje protein s fosfothreonin lyázovou aktivitou, nazývaný OspF (Li *et al.*, 2007). V případě, že je tento efektor T3SS translokován do hostitelské buňky, zprostředkovává nevratnou eliminaci fosfátové skupiny z fosforylovaných threoninových zbytků z hostitelovy MAPKs. Tato enzymatická reakce katalyzovaná OspF neobnovuje fosforovatelnou hydroxylovou skupinu, jak to dělají klasické fosfatázy. Naopak, pomocí tzv. vylučovací reakce se vytváří modifikovaný threoninový zbytek, který už nemůže být fosforylován (Brennan a Barford, 2009). Některé další bakteriální faktory mají stejnou aktivitu, jako má OspF. Jedním z příkladů je SpvC, protein kódovaný vnitrobuněčnou patogenní bakterií



*Salmonella typhimurium* (Zhu *et al.*, 2007) a také například HopA11, efektor rostlinného patogenu *Pseudomonas syringae* (Zhang *et al.*, 2007). Modifikace katalyzovaná těmito fosfothreonin lyázami nevratně potlačí MAPKs aktivitu infikovaných buněk a tedy přispívá k utlumení odpovědi imunitního systému při bakteriální infekci (Li *et al.* 2007; Zhang *et al.* 2007). Bylo také identifikováno několik efektorů s aktivitou proteinové fosfatázy. Takovým je například YopH (*Yersinia*), který narušuje funkci makrofágů a signalizaci MAP kináz (Bliska a Black, 1995).

ADP-ribosylace je posttranslační modifikace katalyzovaná mnoha různými bakteriálními toxiny. Tyto toxiny přenášejí skupinu ADP-ribosy z NAD na argininové, cysteinové a asparaginové zbytky různých cílových proteinů hostitelské buňky. Jejich úkolem je změnit funkce těchto proteinů a tak následně pozměnit nejrůznější metabolické procesy v eukaryotických buňkách. Pro mnoho bakterií je ADP-ribosylace klíčová. V případě toxinu A u bakterií *Pseudomonas* má tato modifikace vliv na inaktivaci části buněčného biosyntetického aparátu (Iglewski a Kabat, 1975).

Exoenzym C3 *Clostridium botulinum* zprostředkovává ADP-ribosylaci Rho GTPáz (Aktories *et al.*, 1987). Tato modifikace blokuje jejich aktivaci pomocí GEFs (guanine nukleotide exchange factors), což vede k velkým změnám v signalizaci, které jsou regulovány právě těmito proteiny, a také ke změnám v polymerizaci aktinu (Aktories *et al.*, 2005). Aktin může být také ADP-ribosylován bakteriálním toxinem C2 produkovaným bakterií *C. botulinum* (Aktories *et al.*, 1986), což mění regulaci cytoskeletu v buňce hostitele.

Další skupina hostitelských proteinů, které jsou ADP-ribosylovány bakteriálními toxiny, jsou G proteiny. Ty mohou být modifikovány těmito toxiny: choleroým toxinem z bakterie *Vibrio cholerae*, pertusovým toxinem z bakterie *Bordetella pertussis* a teplotně závislými (LT) enterotoxiny bakterie *E. coli* (Moss *et al.*, 1978). ADP ribosylace G proteinů těmito toxiny vede k ovlivnění aktivity vnitrobuněčné adenylát cyklázy, syntetizující signální molekulu cyklický adenosin monofosfát (cAMP).

#### **4.2.3 Bakteriální toxiny spouštějící posttranslační modifikace**

Jedním z toxinů využívající ubikvitinaci je antraxový toxin bakterie *Bacillus anthracis*. Ten používá tuto modifikaci ke zprostředkování vstupu do hostitelské buňky pomocí endocytózy. Část tohoto toxinu, protektivní antigen (PA), umožňuje bakterii přichycení na buňku, endocytózu a tím vstup dvou enzymatických komponentů do cytoplazmy infikované buňky. PA dokáže vázat dva buněčné povrchové receptory: TEM8 a CMG2. Tyto receptory jsou postupně ubikvitinovány hostitelskou ubikvitin ligázou Cbl, což spustí uvolnění toxinového komplexu do časného endosomu (Abrami *et al.*, 2003). Ubikvitinace je tedy nezbytná pro aktivitu tohoto toxinu.

Toxin CNF1, kódovaný bakterií *Escherichia coli*, je jedním z toxinů, které mohou cílit na hostitelskou ubikvitinaci a degradaci. Jakmile se tento toxin dostane do buňky, katalyzuje trvalou aktivaci hostitelských Rho GTPáz prostřednictvím jejich deaminace. To ale nevydrží dlouho, protože hostitelská buňka v reakci na deaminaci spustí polyubikvitinaci, což vede k degradaci těchto GTPáz. (Doye *et al.*, 2002).

*Listeria monocytogenes* využívá povrchový protein InlB k napadení různých typů buněk. Tento protein interaguje a spustí autofosforylaci Met, což je receptor růstové faktoru hepatocytů (Shen *et al.*, 2000). Met je poté ubikvitinován pomocí E3 ligázy, což vede k spuštění endocytózy. Tato endocytóza spuštěná ubikvitinací je potřebná pro invazi InlB do buňky (Veiga a Cossart, 2005). *Listeria* dokáže napadnout epiteliální buňky proteinem InlA, který interaguje s E-kadherinem. InlA vyvolává na E-kadherinu fosforylaci a ubikvitinaci, která je potřeba pro internalizaci bakterie (Bonazzi *et al.*, 2008).

Do této skupiny patří i toxin listeriolysin O, který je rozebrán později v samostatné kapitole.

#### 4.2.4 Bakteriální efekторы a toxiny využívající hostitelské modifikace

Mnoho efektorů vykonává svou funkci zavedením kovalentní modifikace do cílového buněčného proteinu. V některých případech jsou tyto modifikace vratné. Na fosforylaci, která je jednou z nejběžnějších, cílí mnoho efektorů. Například efektor OspG (*Shigella*) fosforyluje hostitelské enzymy spojující ubikvitin, aby zmařil odpověď imunitního systému (Kim *et al.*, 2005).

V některých případech bakteriální patogeny využívají hostitelskou ubikvitinaci k degradaci svých vlastních efektorů. Tento děj se vyskytuje například u dvou efektorů *S. typhimurium*: SopE a SptP. Tyto dva efekторы působí na hostitelské Rho GTPázy, ale každá jiným způsobem. Rho GTPázy ovlivňují v buňce mnoho signálních drah a dynamiku aktinového cytoskeletu. SopE vykazuje aktivitu podobnou GEF (Guanin nukleotid exchange factor), aktivuje hostitelské Rho GTPázy a ve výsledku tato aktivace vyvolá změny v hostitelském cytoskeletu (Hardt *et al.*, 1998). SptP, který je do buňky dodáván společně se SopE, naopak Rho GTPázy deaktivuje a umožňuje aktinovému cytoskeletu vrátit se do normálu (Fu a Galán, 1999). SopE je ubikvitinován a degradován vcelku rychle po translokaci do cytoplazmy hostitele, zatímco StpP je degradován mnohem pomaleji (Kubori a Galán, 2003). V některých případech dokážou efekторы využít hostitelskou ubikvitinaci k úpravě své lokalizace v buňce. To je např. SopB, fosfoinositid fosfatáza *S. typhimurium*, která se přes T3SS dostává do hostitelské buňky. SopB je v buňce mnohokrát ubikvitinován, což je potřeba pro jeho aktivitu na plazmatické membráně (Knodler *et al.*, 2009).

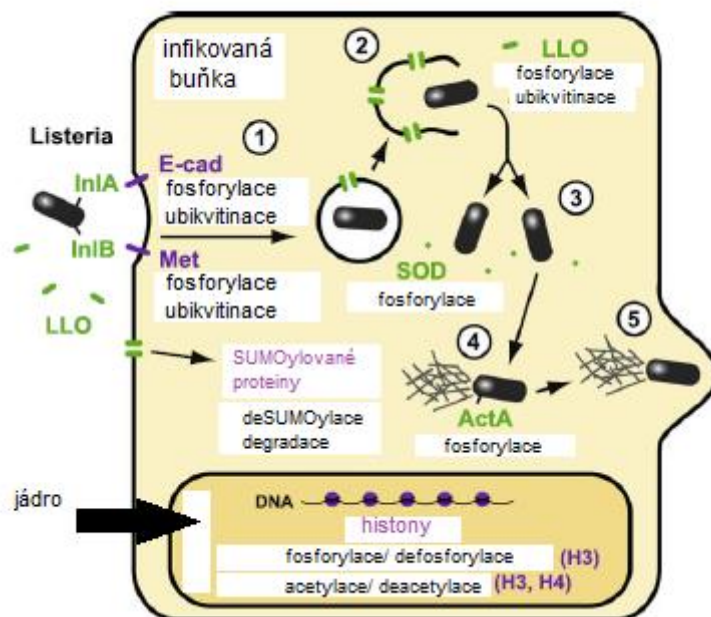
Některé bakterie, například *Brucella abortus*, využívají hostitelské proteiny k palmitoylaci svých proteinů. V případě této bakterie je palmitoylován PrpA (proline

racemase protein A). Tento protein je silný imunitní modulátor, dokáže vyvolat proliferaci B-buněk a změnu humorální imunitní odpovědi během infekce (Spera *et al.*, 2014). PrpA je hostitelskou buňkou palmitoylován na dvou N-koncových cysteinových zbytcích. Výsledky Spera *et al.*, (2018) ukazují, že palmitoylace podporuje migraci PrpA na plazmatickou membránu hostitelské buňky a stabilizuje protein během infekce.

#### 4.2.5 Aktivita Listeriolysinu O (LLO)

Patogenní bakterie často interagují s proteiny hostitele, které jsou posttranslačně modifikovány a využívají je k prolomení imunity nebo ke vstupu do buňky hostitele. Jednou z nich je *Listeria monocytogenes*, což je vnitrobuněčná bakterie způsobující listeriózu. Po infekci buňky musí *Listeria* uniknout z hostitelské vakuoly, aby se mohla dělit v cytoplazmě buňky. Aby toto dokázala, potřebuje toxin listeriolysin O, který má schopnost vytvářet póry, kterými narušuje vakuolární membránu (Schnup *et al.*, 2006). Tento toxin by mohl poškodit buněčnou stěnu hostitele a vést tak k cytotoxicitě, ale aktivita listeriolysinu O je omezena pouze na vakuolární membránu. To je důležité pro to, aby se bakterie vyhnula přímému kontaktu s imunitním systémem. Bylo prokázáno, že jak se jednou *Listeria* dostane do cytoplazmy, je listeriolysin O fosforylován, polyubikvitován a transportován do proteasomu k degradaci (Schnupf *et al.*, 2006). Omezení aktivity tohoto toxinu na vakuolu je způsobeno také kvůli změnám pH, protože tento toxin je rychle denaturován a inaktivován v buněčných kompartmentech, jejichž pH je neutrální, což je například cytoplazma (Schuerch *et al.*, 2005).

Vstup do buňky a děje v ní probíhající jsou zachyceny na obrázku 10. Potom, co *L. monocytogenes* vstoupí do buňky, je zachycena ve vakuole. Membrána vakuoly je rozrušena dvěma bakteriálními fosfolipázami a také LLO. Tím se bakterie dostane do cytoplazmy, kde se replikuje a následně polymerizuje aktin, což vede k vytvoření tzv. ocasu komety aktinu. Polymerizace aktinu usnadňuje bakterii pohyb v cytosolu hostitelské buňky a také vstup do vedlejších buněk, vytvořením vychlípenin v plazmatické membráně. V průběhu infekce jsou modifikovány některé hostitelské proteiny. Mohou být modifikovány například fosforylací nebo ubikvitinací (na obrázku znázorněny fialově). Modifikované ale mohou být i bakteriální efekторы, například SOD, ActA (znázorněny zeleně). Navíc *Listeria* dokáže blokovat některé hostitelské modifikace, jako je SUMOylace, acetylace nebo fosforylace.



**Obrázek 10. Posttranslační modifikace, ke kterým dochází při infekci bakterií *Listeria monocytogenes*.** Upraveno z Ribet a Cossart, 2010.

Listeriolysin O také spouští degradaci enzymu Ubc9 v infikovaných buňkách. Ubc9 je E2 SUMO enzym vyskytující se u lidí. To vede k zablokování SUMOylace a celkové deSUMOylaci hostitelských proteinů v infikované buňce. Listeriolysin O navíc způsobuje degradaci některých hostitelských SUMOylovaných proteinů. Ztráta těchto proteinů se ukázala být výhodná pro to, aby mohla bakterie infikovat buňku co nejefektivněji (Ribet a Cossart, 2010).

Další aktivita listeriolysinu O je spojena s histony. Tento toxin vyvolává snížení acetylace histonu H4 (v epiteliálních buňkách) a také snížení fosforylace histonu H3.

Analýza transkriptomu hostitelských genů v buňkách po působení LLO prokázala snížení odpovědi některých genů zapojených v imunitě, a to právě díky modifikacím, které tento toxin způsobil na histonech (Hamon *et al.*, 2007).

#### 4.2.6 RTX toxiny

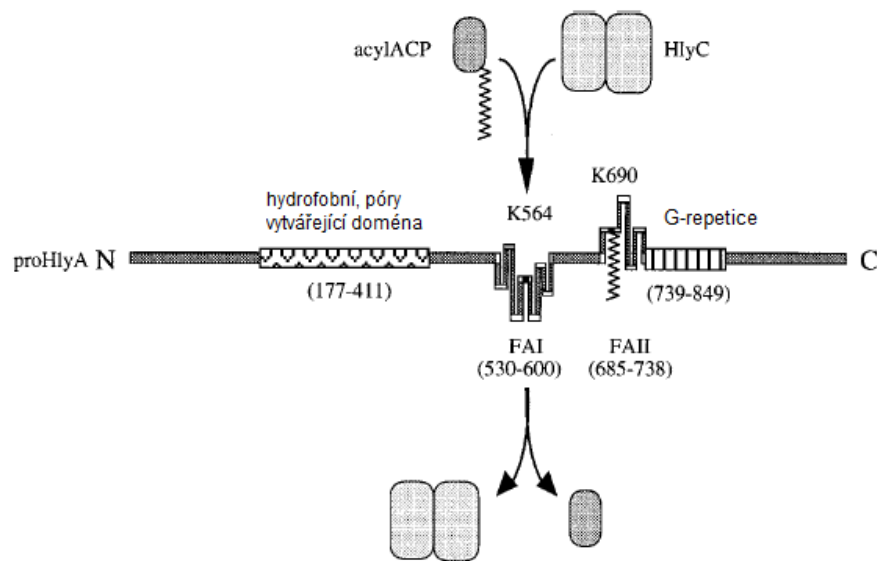
RTX (z anglického Repeats in ToXin) toxiny jsou proteiny, které jsou syntetizovány gramnegativními bakteriemi. Dělí se do dvou kategorií. První skupinou jsou hemolysiny (např. toxin HlyA bakterie *E. coli*), které lyzují hlavně červené krvinky. Druhá skupina jsou leukotoxiny (např. toxin LtxA bakterie *Actinobacillus actinomycetemcomitans*), které jsou cytotoxické k širokému spektru buněk a jsou cytotoxické například k leukocytům. RTX toxiny potřebují posttranslační modifikaci ke své aktivaci. Tato aktivace je prováděna acylací genu *rtxA* (ten kóduje tzv. protoxin) a vyžaduje účast genu *rtxC* (produkt genu *rtxC* je acyltransferáza) a dále proteinu nesoucí acylovou skupinu (Issartel *et al.*, 1991). Po acylaci jsou RTX toxiny sekretovány ven z bakterie přes sekreční aparát typu I (T1SS, type 1

secretion system) a mohou následně uplatnit svou cytotoxickou aktivitu na různé typy cílových buněk (Fedele *et al.*, 2017).

Po sekreci z buňky jsou RTX toxiny schopné inzerce do membrány hostitelské buňky. Některé RTX toxiny, jako například CyaA toxin bakterie *Bordetella pertussis* nebo HlyA toxin z *Escherichia coli* se preferenčně váží na integrinové receptory na povrchu buněk (Guermontez *et al.*, 2001, Lally *et al.*, 1997). Bylo ukázáno, že k pevné vazbě těchto dvou RTX toxinů na integrinový receptor dochází pouze tehdy, když je receptor posttranslačně modifikován cukernými zbytky. Naprosto zásadní je v interakci integrin-toxin zbytek kyseliny sialové (Morová *et al.*, 2008). Prvním krokem v interakci s cílovou membránou je adsorpce toxinu na povrchu membrány. Druhým krokem je nevratná inzerce části toxinu do lipidové dvouvrstvy spojená s výraznou konformační změnou celé molekuly (Moayeri a Welch, 1997). Aby RTX toxiny vytvořili membránové póry, musí tyto toxiny zaujmout správnou konformaci, která vystavuje hydrofobní aminokyselinové zbytky toxinu směrem k membránovým uhlovodíkům (Lally *et al.*, 1999).

Hemolysin (HlyA), toxin uropatogenní bakterie *Escherichia coli*, je schopen vytvářet póry v membráně cílových buněk. Je jedním z toxinů, který potřebuje aktivovat pomocí posttranslační modifikace. HlyA je aktivován pomocí kovalentní vazby mastné kyseliny na dva specifické lysinové zbytky. Syntéza a sekrece tohoto toxinu je určována operonem hlyCABD (Felmlee *et al.*, 1985). Toxin HlyA je syntetizován jako neaktivní proHlyA. Je aktivován pomocí acyltransferázy HlyC. Bylo prokázáno, že HlyC používá acyl-acyl nosný protein (acyl-ACP) jako donora mastné kyseliny. Hmotností spektrometrie a Edmanova degradace proteolytických produktů z aktivního HlyA, který byl aktivovaný pomocí HlyC a acyl-ACP, odhalily dva lysinové zbytky, které byly acylovány kyselinou myristovou a hydroxymyristovou, a to lysin 564 a lysin 690 (Hardie *et al.*, 1991). Náhradou těchto dvou lysinů se potvrdilo, že se jedná o jediná acylovaná místa v molekule HlyA a ukázalo se, že jeden lysinový zbytek může být acylován bez přítomnosti toho druhého. Pro pórotvornou (hemolytickou aktivitu) HlyA je potřebná acylace obou dvou lysinových zbytků (Stanley *et al.*, 1994). Maturace proHlyA na aktivní toxin je znázorněna na obrázku 11. K molekule HlyA toxinu je připojena kyselina myristová a hydroxymyristová. Mnoho acylovaných proteinů, jako je například onkoprotein Src nebo MARCKS (myristoylated alanine-rich C kinase substrate), je schopno navázat se na membránu vložením řetězce mastné kyseliny přímo do hydrofobní lipidové dvouvrstvy. Neacylované formy těchto proteinů se do membrány nedokážou navázat. Experimenty prováděné s acylovanými proteinovými kinázami MARCKS (Kim *et al.*, 1994) zjistily, že přidání myristátu neposkytne dostatečnou energii k ukotvení proteinu do lipidové dvouvrstvy. To znamená, že je pravděpodobně potřeba dalších faktorů k navázání HlyA k membráně, což může být například zvýšení počtu uhlíkových zbytků v acylovém řetězci,

elektrostatická interakce proteinu s kyselými lipidy biomembrány nebo interakce protein-protein.



**Obrázek 11. Maturace pro-HlyA na aktivní toxin pomocí HlyC a acyl-ACP.** Kladně nabitý homodimer HlyC se asociuje se záporně nabitým ACP. Po navázání na rozpoznávací domény HlyC, FAI a FAII, je acylový řetězec přenesen na odpovídající acylová modifikační místa, K564 (KI) a K690 (KII). Upraveno z Stanley *et al.*, 1998.

Adenylát cyklázový toxin (CyaA) je hlavním faktorem virulence bakterie *Bordetella pertussis*, která způsobuje onemocnění černý kašel. CyaA je, podobně jako HlyA, syntetizován jako protoxin, proCyaA, a převádí se na svou aktivní cytotoxickou formu po acylaci dvou lysinů v molekule toxinu. Oba lysiny jsou modifikovány mastnou kyselinou, a to kyselinou palmitovou a palmitoolejovou na  $\epsilon$ -amino skupině lysinu 983 a 860 (Hackett *et al.*, 1994). Tuto acylaci zprostředkovává acyltransferáza CyaC, která katalyzuje přenos acylového řetězce z acyl-acyl nosného proteinu na  $\epsilon$ -amino skupinu lysinů proCyaA (Hackett *et al.*, 1994). Pro plnou aktivitu CyaA toxinu na buňkách nosoucích receptor, kterou je integrin CD11b/CD18, postačuje modifikace mastnou kyselinou pouze na lysinu 983. Pro plnou aktivitu toxinu na buňkách, které nemají na svém povrchu molekulu CD11b/CD18, je nutná acylace jak na lysinu 860, tak na lysinu 983 (Masin *et al.*, 2005). Po sekreci se CyaA váže na eukaryotické buňky a po translokaci invazivní adenylát cyklázové domény a následné vazbě vnitrobuněčného kalmodulinu konvertuje enzymatická doména toxinu vnitrobuněčné ATP na cAMP. Molekula cAMP působí v cytosolu buňky jako druhý posel. Nadprodukce cAMP proto vede k destrukci velkého množství signálních drah, což vede v konečném důsledku k apoptóze nebo nekróze napadené buňky, případně ke ztrátě schopnosti buněk imunitního systému bojovat s infekcí způsobenou bakterií. Pro tento toxin je acylace nezbytně důležitá k tomu, aby se mohl vázat na receptor, mohl se inzertovat do

cílové membrány, vytvářet v ní póry a také k translokaci enzymatické adenylát cyklázové domény do cytosolu buněk (Veneziano *et al.*, 2013). O'Brien *et al.*, (2019) porovnali funkční a strukturní rozdíly mezi proCyaA a CyaA. Ukázali, že přítomnost acylového řetězce je velmi důležitá při sbalování CyaA toxinu do aktivní konformace. Nedávno bylo ukázáno, že každá RTX acyltransferáza si selektivně vybírá acylový řetězec specifické délky pro kovalentní vazbu na protoxin. HlyC acyltransferáza, aktivující HlyA, selektivně vybírá 14-ti uhlíkové řetězce (kyselinu myristovou a hydroxymyristovou), kdežto CyaC acyltransferáza, aktivující CyaA toxin, selektivně vybírá hlavně kyselinu palmitovou a palmitoolejovou (Osickova *et al.*, 2020). Ve stejné publikaci bylo také ukázáno, že příslušná acyltransferáza selektivně vybírá, zda bude acylován jeden nebo oba specifické lysiny proHlyA nebo proCyaA.

## 5. Závěr

Posttranslační modifikace jsou velmi důležitým buněčným procesem. Některé posttranslační modifikace jsou prominentní u eukaryot a u prokaryot se nevyskytují tak často, jako je například N-glykosylace. Některé probíhají na stejném základu, mají stejný cíl, ale enzymologie se liší. Tak je tomu například u eukaryotní ubikvitinace a prokaryotní pupylace. Nejběžnější modifikace vyskytující se u bakterií je fosforylace. Při fosforylaci využívají bakterie tzv. dvousložkový systém, který dokáže spouštět mechanismy virulence, nebo mechanismy úniku před imunitním systémem hostitele.

Posttranslační modifikace mohou hrát také roli v aktivitě bakteriálních toxinů. Zajímavým toxinem je například listeriolysin O. Pokud se LLO dostane do cytoplazmy je označen ubikvitinem a poslán k degradaci, čemuž se snaží vyhnout tím, že svou aktivitu omezil jen na vakuolární membránu. Tento toxin ale také dokáže některé hostitelské posttranslační modifikace zablokovat. Jedná se například o modifikace na histonech, čímž se následně snižuje odpověď imunitního systému na infekci tímto toxinem.

Některé bakteriální toxiny dokáží posttranslačně modifikovat cílové proteiny, a tím je buď vyřadit ze své funkce, nebo naopak díky posttranslační modifikaci dosáhnout toho, že modifikovaný protein zůstává stále aktivní.

Pro RTX toxiny gramnegativních patogenních bakterií je důležitá lipidace, neboli posttranslační modifikace mastnou kyselinou. Neacylované toxiny ztrácejí schopnost vázat se na receptorovou molekulu na povrchu buňky, insertovat se do membrány, případně membránou dále penetrovat do cytosolu napadené buňky. To znamená, že posttranslační modifikace faktorů virulence je naprosto zásadní pro plnou virulenci patogenních bakterií.



## 6. Seznam použité literatury

- Abrami, L., Liu, S., Cosson, P., Leppla, S. H., van der Goot, F.G. (2003). Anthrax toxin triggers endocytosis of its receptor via a lipid raft-mediated clathrin-dependent process. *J. Cell Biol.* 160, 321–328
- Aktories, K. and Barbieri, J. T. (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 397–410.
- Aktories, K., Barmann, M., Ohishi, I., Tsuyama, S., Jakobs, K. H. and Habermann, E. (1986) Botulinum C2 toxin ADP-ribosylates actin. *Nature* 322, 390–392
- Aktories, K., Weller, U. and Chatwal, G.S. (1987) *Clostridium botulinum* type C produces a novel ADP-ribosyltransferase distinct from botulinum C2 toxin. *FEBS Lett.* 212, 109–113
- Allfrey, V. G., Faulkner, R., & Mirsky, A. E. (1964). Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 51(5), 786–794.
- Bae, H. J., Lee, H. N., Baek, M. N., Park, E. J., Eom, C. Y., Ko, I. J., Kang, H. Y., & Oh, J. I. (2017). Inhibition of the DevSR Two-Component System by Overexpression of *Mycobacterium tuberculosis* PknB in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecules and cells*, 40(9), 632–642.
- Ballard, J., Y. Sokolov, W. L. Yuan, B. L. Kagan, and R. K. Tweten. (1993). Activation and mechanism of *Clostridium septicum*  $\alpha$ -toxin. *Mol. Microbiol.* 10:627–634
- Becker S. H., Darwin K. H. (2016) Bacterial Proteasomes: Mechanistic and Functional Insights *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81 (1) e00036-16
- Bliska, J. B., & Black, D. S. (1995). Inhibition of the Fc receptor-mediated oxidative burst in macrophages by the *Yersinia pseudotuberculosis* tyrosine phosphatase. *Infection and Immunity*, 63(2), 681 LP – 685.
- Boggio, R. and Chiocca, S. (2006) Viruses and sumoylation: recent highlights. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 430–436.
- Bonazzi, M., Veiga, E., Cerda, J.P. and Cossart, P. (2008) Successive posttranslational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalisation of *Listeria monocytogenes*. *Cell Microbiol.* 10, 2208–2222
- Bray, B. A., Sutcliffe, I. C. & Harrington, D. J. (2009). Impact of Igt mutation on lipoprotein biosynthesis and in vitro phenotypes of *Streptococcus agalactiae*. *Microbiology* 155, 1451–1458
- Brennan, D.F. and Barford, D. (2009) Eliminylation: a post-translational modification catalyzed by phosphothreonine lyases. *Trends Biochem. Sci.* 34, 108–114.
- Burns, K. E., Cerda-Maira, F. A., Wang, T., Li, H., Bishai, W. R., & Darwin, K. H. (2010). “Depupylation” of Prokaryotic Ubiquitin-like Protein from *Mycobacterial* Proteasome Substrates. *Molecular Cell*, 39(5), 821–827.
- Carabetta, V. J., & Cristea, I. M. (2017). Regulation, Function, and Detection of Protein Acetylation in Bacteria. *Journal of Bacteriology*, 199(16), e00107-17.
- Colak, G., Xie, Z., Zhu, A. Y., Dai, L., Lu, Z., Zhang, Y., Wan, X., Chen, Y., Cha, Y. H., Lin, H., Zhao, Y., & Tan, M. (2013). Identification of lysine succinylation substrates and the succinylation regulatory enzyme CobB in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 12(12), 3509–3520.

- Dell, A., Galadari, A., Sastre, F., & Hitchen, P. (2010). Similarities and Differences in the Glycosylation Mechanisms in Prokaryotes and Eukaryotes. *International Journal of Microbiology*, 2010, 1–14.
- Deng, L., Mu, R., Weston, T. A., Spencer, B. L., Liles, R. P., & Doran, K. S. (2018). Characterization of a Two-Component System Transcriptional Regulator, LtdR, That Impacts Group B *Streptococcal* Colonization and Disease. *Infection and Immunity*, 86(7).
- Diao, J., Zhang, Y., Huibregtse, J. M., Zhou, D., & Chen, J. (2008). Crystal structure of SopA, a *Salmonella* effector protein mimicking a eukaryotic ubiquitin ligase. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15(1), 65–70.
- Doye, A., Mettouchi, A., Bossis, G., Clément, R., Buisson-Touati, C., Flatau, G., Lemichez, E. (2002). CNF1 Exploits the Ubiquitin-Proteasome Machinery to Restrict Rho GTPase Activation for Bacterial Host Cell Invasion. *Cell*, 111(4), 553–564.
- Fedele, G., Schiavoni, I., Adkins, I., Klimova, N., and Sebo, P. (2017) Invasion of dendritic cells, macrophages and neutrophils by the *Bordetella* adenylate cyclase toxin: a subversive move to fool host immunity. *Toxins (Basel)* 9, E293
- Felmlee, T., S. Pellett, and R. A. Welch. 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *J. Bacteriol.* 163:94–105.
- Filloux, A., Hachani, A., & Blevès, S. (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology*, 154(6), 1570–1583.
- Fu, Y. and Galan, J.E. (1999) A *Salmonella* protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 401,293–297
- Fuhrmann, J., Schmidt, A., Spiess, S., Lehner, A., Turgay, K., Mechtler, K., Charpentier, E., & Clausen, T. (2009). McsB Is a Protein Arginine Kinase That Phosphorylates and Inhibits the Heat-Shock Regulator CtsR. *Science*, 324(5932), 1323 LP – 1327.
- Galán, J. E. (2009). Common Themes in the Design and Function of Bacterial Effectors. *Cell Host & Microbe*, 5(6), 571–579.
- Galán, J. E., & Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature*, 444(7119), 567–573.
- Galyov, E. E., Håkansson, S., Forsberg, Å., & Wolf-Watz, H. (1993). A secreted protein kinase of *Yersinia pseudotuberculosis* is an indispensable virulence determinant. *Nature*, 361(6414), 730–732.
- Guan, K. L., & Dixon, J. E. (1990). Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science*, 249(4968), 553 LP – 556.
- Guermontprez, P., Khelef, N., Blouin, E., Rieu, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Guiso, N., Ladant, D., & Leclerc, C. (2001). The Adenylate Cyclase Toxin of *Bordetella pertussis* Binds to Target Cells via the  $\alpha$ M $\beta$ 2 Integrin (Cd11b/Cd18). *Journal of Experimental Medicine*, 193(9), 1035–1044.
- Guerry, P., Ewing, C. P., Schirm, M., Lorenzo, M., Kelly, J., Pattarini, D., Logan, S. (2006). Changes in flagellin glycosylation affect *Campylobacter* autoagglutination and virulence. *Molecular Microbiology*, 60(2), 299–311.
- Hackett, M., Guo, L., Shabanowitz, J., Hunt, D., & Hewlett, E. (1994). Internal lysine palmitoylation in adenylate cyclase toxin from *Bordetella pertussis*. *Science*, 266(5184), 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*. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20250–20253.
- Hamon, M.A., Batsche, E., Regnault, B., Tham, T.N., Seveau, S., Muchardt, C. and Cossart, P. (2007) Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 13467–13472.
- Hang, H. C., & Linder, M. E. (2011). Exploring Protein Lipidation with Chemical Biology. *Chemical Reviews*, 111(10), 6341–6358.
- Hardie, K. R., J. P. Issartel, E. Koronakis, C. Hughes, and V. Koronakis. (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
- Hardt, W.D., Chen, L.M., Schuebel, K.E., Bustelo, X.R. and Galan, J.E. (1998) *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. *Cell* 93, 815–826.
- Hayoun, M.A., Kong, E.L., Smith, M.E., King, K. C. Ricin Toxicity. [Updated 2021 Jan 20]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441948/>
- Holmes, R. K. (2000). Biology and Molecular Epidemiology of Diphtheria Toxin and the toxin Gene. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(s1), S156–S167.
- Hot, D., Antoine, R., Renaud-Mongénie, G., Caro, V., Henny, B., Levillain, E., Loch, C. (2003). Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Molecular Genetics and Genomics*, 269(4), 475–486.
- Hotson, A., Chosed, R., Shu, H., Orth, K. and Mudgett, M.B. (2003) *Xanthomonas* type III effector XopD targets SUMO-conjugated proteins in planta. *Mol. Microbiol.* 50, 377–389.
- Hug I. and Feldman M. F. (2011) Analogies and homologies in lipopolysaccharide and glycoprotein biosynthesis in bacteria. *Glycobiology*, vol. 21, no. 2, pp. 138–151
- Charbonneau, M.-E., Girard, V., Nikolakakis, A., Campos, M., Berthiaume, F., Dumas, F., Mourez, M. (2007). O-Linked Glycosylation Ensures the Normal Conformation of the Autotransporter Adhesin Involved in Diffuse Adherence. *Journal of Bacteriology*, 189(24), 8880–8889.
- 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 Chemical Biology*, 25(7), 817–831.
- Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., & Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial Type IV secretion systems. *Annual Review of Microbiology*, 59(1), 451–485.
- Iglewski, B.H. and Kabat, D. (1975) NAD-dependent inhibition of protein synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2284–2288.
- Igo, M.M., Ninfa, A.J., Stock, J.B., Silhavy, T.J. (1989). Phosphorylation and dephosphorylation of a bacterial transcriptional activator by a transmembrane receptor. *Genes Dev.* ;3:1725–1734.

- Issartel, JP., Koronakis, V. & Hughes, C. (1991). Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature* 351, 759–761
- Junker, S., Maa, S., Otto, A., Michalik, S., Morgenroth, F., Gerth, U., Hecker, M., & Becher, D. (2018). Spectral Library Based Analysis of Arginine Phosphorylations in *Staphylococcus aureus*. *Molecular and Cellular Proteomics*, 17(2), 335–348.
- Just, I., Selzer, J., Wilm, M., Eichel-Streiber, C. von, Mann, M., & Aktories, K. (1995). Glucosylation of Rho proteins by *Clostridium difficile* toxin B. *Nature*, 375(6531), 500–503.
- Kim, D. W., Lenzen, G., Page, A.-L., Legrain, P., Sansonetti, P. J., & Parsot, C. (2005). The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 14046 LP – 14051.
- Kim, J., Shishido, T., Jiang, X., Aderem, A., McLaughlin, S. (1994) Phosphorylation, high ionic strength, and calmodulin reverse the binding of MARCKS to phospholipid vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 269, Issue 45, Pages 28214-28219
- Kim, J.G., Taylor, K.W., Hotson, A., Keegan, M., Schmelz, E.A. and Mudgett, M.B. (2008) XopD SUMO protease affects host transcription, promotes pathogen growth, and delays symptom development in *Xanthomonas* infected tomato leaves. *Plant Cell* 20, 1915–1929.
- Knodler, L.A., Winfree, S., Drecktrah, D., Ireland, R. and Steele-Mortimer, O. (2009) Ubiquitination of the bacterial inositol phosphatase, SopB, regulates its biological activity at the plasma membrane. *Cell Microbiol.* 11, 1652–1670.
- Kubori, T. and Galan, J.E. (2003) Temporal regulation of *Salmonella* virulence effector function by proteasome-dependent protein degradation. *Cell* 115, 333–342.
- Kuhn, M. L., Zemaitaitis, B., Hu, L. I., Sahu, A., Sorensen, D., Minasov, G., Wolfe, A. J. (2014). Structural, Kinetic and Proteomic Characterization of Acetyl Phosphate-Dependent Bacterial Protein Acetylation. *PLoS ONE*, 9(4), e94816.
- Lally, E. T., Hill, R. B., Kieba, I. R., & Korostoff, J. (1999). The interaction between RTX toxins and target cells. *Trends in Microbiology*, 7(9), 356–361.
- Lally, E. T., Kieba, I. R., Sato, A., Green, C. L., Rosenbloom, J., Korostoff, J., Wang, J. F., Shenker, B. J., Ortlepp, S., Robinson, M. K., & Billings, P. C. (1997). RTX toxins recognize a  $\beta 2$  integrin on the surface of human target cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(48), 30463–20469.
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Shao, F. (2007). The Phosphothreonine Lyase Activity of a Bacterial Type III Effector Family. *Science*, 315(5814), 1000–1003.
- Libby, E. A., Goss, L. A. & Dworkin, J. (2015). The eukaryoticlike Ser/Thr kinase PrkC regulates the essential WalRK two- component system in *Bacillus subtilis*. *PLOS Genet.* 11, e1005275
- Logan, S. M. (2006). Flagellar glycosylation - a new component of the motility repertoire? *Microbiology* 152, 1249–1262
- Loi, V. V., Rossius, M. & Antelmann, H. (2015). Redox regulation by reversible protein S- thiolation in bacteria. *Front. Microbiol.* 6, 187.
- Macek, B., Forchhammer, K., Hardouin, J., Weber-Ban, E., Grangeasse, C., & Mijakovic, I. (2019). Protein post-translational modifications in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*.

- 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(38), 12759–12766.
- Mescher M. F. and Strominger J. L. (1976). Purification and characterization of a prokaryotic glycoprotein from the cell envelope of *Halobacterium salinarium*. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 251, no. 7, pp. 2005–2014.
- Mijakovic, I., Grangeasse, C. & Turgay, K. (2016). Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 398–417
- Mijakovic, I., Grangeasse, C., & Turgay, K. (2016). Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(3), 398–417.
- Mittal, R., Peak-Chew, S.Y. and McMahon, H.T. (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 18574–18579
- Moayeri, M., Welch, R.A. (1997). Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infection and Immunity* Jun 1997, 65 (6) 2233-2239
- Mohamadzadeh, M. (2009). Microbial Toxins: Current Research and Future Trends. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(6), 695–696.
- Morova, J., Osicka, R., Masin, J., & Sebo, P. (2008). RTX cytotoxins recognize  $\beta 2$  integrin receptors through N-linked oligosaccharides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(14), 5355 LP – 5360.
- Moss, J. and Richardson, S.H. (1978) Activation of adenylate cyclase by heatlabile *Escherichia coli* enterotoxin. Evidence for ADP-ribosyltransferase activity similar to that of cholera toxin. *J. Clin. Invest.* 62, 281–285
- Mukherjee, S., Keitany, G., Li, Y., Wang, Y., Ball, H.L., Goldsmith, E.J. and Orth, K. (2006) *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312, 1211–1214.
- Nadolski, M. J., & Linder, M. E. (2007). Protein lipidation. *FEBS Journal*, 274(20), 5202–5210.
- Nagamune, K., Yamamoto, A., Naka, J., Matsuyama, T., Miwatani, and T. Honda. (1996). In vitro proteolytic processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (proHlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *Vibrio cholerae*, trypsin, and other proteases. *Infect. Immun.* 64:4655–4658.
- Namugenyi, S. B., Aagesen, A. M., Elliott, S. R. & Tischler, A. D. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* PhoY proteins promote persister formation by mediating Pst/SenX3-RegX3 phosphate sensing. *MBio* 8, e00494–17
- Nothaft, H., & Szymanski, C. M. (2010). Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nature Reviews Microbiology*, 8(11), 765–778.
- O'Brien, D. P., Cannella, S. E., Voegelé, A., Raoux-Barbot, D., Davi, M., Douché, T., Matondo, M., Brier, S., Ladant, D., Chenal, A. (2019). Post-translational acylation controls the folding and functions of the CyaA RTX toxin. *The FASEB Journal*, 33: 10065-10076
- Olsen, J. V. & Mann, M. (2013). Status of large- scale analysis of post- translational modifications by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 12, 3444–3452

- Olsnes, S., & Pihl, A. (1973). Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry*, 12(16), 3121–3126.
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 295(28), 9268–9280.
- Patel, K., Cai, S., & Singh, B. R. (2014). Current strategies for designing antidotes against botulinum neurotoxins. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 9(3), 319–333.
- Pearce, M. J., Mintseris, J., Ferreyra, J., Gygi, S. P. & Darwin, K. H. (2008). Ubiquitin-like protein involved in then proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 322, 1104–1107
- Peng, Z., Fives-Taylor, P., Ruiz, T., Zhou, M., Sun, B., Chen, Q., & Wu, H. (2008). Identification of critical residues in Gap3 of *Streptococcus parasanguinis* involved in Fap1 glycosylation, fimbrial formation and in vitro adhesion. *BMC Microbiology*, 8(1), 52.
- Pereira, S. F. F., Goss, L., & Dworkin, J. (2011). Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 75(1), 192 LP – 212.
- Pickart, C.M. (2001). Mechanisms underlying ubiquitylation. *Annual Review of Biochemistry*. 70: 503–33.
- Pickart, C.M., Eddins M.J. ( 2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1695 (1–3): 55–72.
- Polito, L., Bortolotti, M., Battelli, M.G., Calafato, G., Bolognesi, A. (2019). Ricin: An Ancient Story for a Timeless Plant Toxin. *Toxins (Basel)*. 2019;11(6):324.
- Power, P.M. , Seib K. L., and Jennings, M. P.(2006). Pilin glycosylation in *Neisseria meningitidis* occurs by a similar pathway to wzy-dependent O-antigen biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 347, no. 4, pp. 904–908
- Ribet , D., Cossart, P. (2010). Post-translational modifications in host cells during bacterial infection, *FEBS Letters* Volume 584, Issue 13, Pages 2748-2758
- Roden, J., Eardley, L., Hotson, A., Cao, Y. and Mudgett, M.B. (2004) Characterization of the *Xanthomonas* AvrXv4 effector, a SUMO protease translocated into plant cells. *Mol. Plant Microbe Interact*. 17, 633–643.
- Sanchez, J., & Holmgren, J. (2011). Cholera toxin - a foe & a friend. *The Indian journal of medical research*, 133(2), 153–163.
- Sankaran, K. & Wu, H. C. (1994). Lipid modification of bacterial prolipoprotein. Transfer of diacylglycerol moiety from phosphatidylglycerol. *J. Biol. Chem.* 269, 19701–19706
- Shen, Y., Naujokas, M., Park, M. and Ireton, K. (2000) InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell* 103, 501–510
- Schmeck, B., Beermann, W., van Laak, V., Zahlten, J., Opitz, B., Witzenrath, M., Hippenstiel, S. (2005). Intracellular Bacteria Differentially Regulated Endothelial Cytokine Release by MAPK-Dependent Histone Modification. *The Journal of Immunology*, 175(5), 2843–2850.
- Schmidt, A., Trentini, D. B., Spiess, S., Fuhrmann, J., Ammerer, G., Mechtler, K., & Clausen, T. (2014). Quantitative phosphoproteomics reveals the role of protein arginine phosphorylation in the bacterial stress response. *Molecular and Cellular Proteomics*, 13(2), 537–550.

- Schnupf, P., Portnoy, D.A. and Decatur, A.L. (2006) Phosphorylation, ubiquitination and degradation of listeriolysin O in mammalian cells: role of the PEST-like sequence. *Cell Microbiol.* 8, 353–364.
- Schuerch, D.W., Wilson-Kubalek, E.M. and Tweten, R.K. (2005) Molecular basis of listeriolysin O pH dependence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 12537–12542.
- Spera, J. M., Comerci, D. J., & Ugalde, J. E. (2014). *Brucella* alters the immune response in a prpA-dependent manner. *Microbial Pathogenesis*, 67-68, 8–13.
- Spera, J. M., Guaimas, F., Corvi, M. M. & Ugalde, J. E. (2018). *Brucella* hijacks host-mediated palmitoylation to stabilize and localize PrpA to the plasma membrane. *Infect. Immun.* 86, e00402–18
- Stancik, I. A., Šestak, M. S., Ji, B., Axelson-Fisk, M., Franjevic, D., Jers, C., Domazet-Lošo, T., & Mijakovic, I. (2018). Serine/Threonine Protein Kinases from Bacteria, Archaea and Eukarya Share a Common Evolutionary Origin Deeply Rooted in the Tree of Life. *Journal of Molecular Biology*, 430(1), 27–32.
- Stanley, P., Koronakis V., Hughes C. (1998). Acylation of *Escherichia coli* Hemolysin: A Unique Protein Lipidation Mechanism Underlying Toxin Function *Microbiology and Molecular Biology Reviews* , 62 (2) 309-333;
- Stanley, P., L. C. Packman, V. Koronakis, and C. Hughes. (1994). Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin. *Science* 266:1992–1996
- Stebbins, C. E., & Galán, J. E. (2001). Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature*, 412(6848), 701–705.
- Stimson, E., Virji, M., Makepeace, K., Dell, A., Morris, H. R., Payne, G., Moxon, E. R. (1995). *Meningococcal* pilin: a glycoprotein substituted with digalactosyl 2,4-diacetamido-2,4,6-trideoxyhexose. *Molecular Microbiology*, 17(6), 1201–1214.
- Striebel, F., Hunkeler, M., Summer, H. & Weber-Ban, E. (2010). The mycobacterial Mpa- proteasome unfolds and degrades pupylated substrates by engaging Pup's N- terminus. *EMBO J.* 29, 1262–1271
- Striebel, F., Imkamp, F., Özcelik, D., Weber-Ban E.(2014). Pupylation as a signal for proteasomal degradation in bacteria. *Biochim Biophys Acta.*;1843(1):103-113.
- Striebel, F., Imkamp, F., Sutter, M., Steiner, M., Mamedov, A., & Weber-Ban, E. (2009). Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 16(6), 647–651.
- Thinon, E., Serwa, R.A., Broncel, M., Brannigan, J.A., Brassat, U., Wright, M.H., Heal, W.P., Wilkinson, A.J., Mann, D.J., Tate, E.W.(2014). Global profiling of co- and post-translationally N-myristoylated proteomes in human cells. *Nature Communications*, 5(1).
- Ulrich, L. E., & Zhulin, I. B. (2009). The MiST2 database: a comprehensive genomics resource on microbial signal transduction. *Nucleic Acids Research*, 38, D401–D407.
- Veiga, E. and Cossart, P. (2005). *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 7, 894–900.

- Veneziano, R., Rossi, C., Chenal, A., Devoisselle, J. M., Ladant, D., and Chopineau, J. (2013) *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin translocation across a tethered lipid bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 20473–20478
- Wacker, M. (2002). N-Linked Glycosylation in *Campylobacter jejuni* and Its Functional Transfer into *E. coli*. *Science*, 298(5599), 1790–1793.
- Weiglmeier, P. R., Rösch, P., & Berkner, H. (2010). Cure and Curse: *E. coli* Heat-Stable Enterotoxin and Its Receptor Guanylyl Cyclase C. *Toxins*, 2(9), 2213–2229
- Weinert, B. T., Iesmantavicius, V., Wagner, S. A., Schölz, C., Gummesson, B., Beli, P., Choudhary, C. (2013). Acetyl-Phosphate Is a Critical Determinant of Lysine Acetylation in *E. coli*. *Molecular Cell*, 51(2), 265–272.
- Weinert, B. T., Schölz, C., Wagner, S. A., Iesmantavicius, V., Su, D., Daniel, J. A., & Choudhary, C. (2013). Lysine succinylation is a frequently occurring modification in prokaryotes and eukaryotes and extensively overlaps with acetylation. *Cell Reports*, 4(4), 842–851.
- Williams, C. L., Boucher, P. E., Stibitz, S., & Cotter, P. A. (2005). BvgA functions as both an activator and a repressor to control BvgI phase expression of bipA in *Bordetella pertussis*. *Molecular Microbiology*, 56(1), 175–188.
- Wolfe, A. J. (2016). Bacterial protein acetylation: new discoveries unanswered questions. *Current Genetics*, 62(2), 335–341.
- Young, N. M., Brisson, J.-R., Kelly, J., Watson, D. C., Tessier, L., Lanthier, P. H., Szymanski, C. M. (2002). Structure of the N-Linked Glycan Present on Multiple Glycoproteins in the Gram-negative Bacterium, *Campylobacter jejuni*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(45), 42530–42539.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zhou, J.-M. (2007). A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe*, 1(3), 175–185.
- Zhao, J. (2007) Sumoylation regulates diverse biological processes. *Cell. Mol. Life Sci.* 64, 3017–3033
- Zhu, Y., Li, H., Long, C., Hu, L., Xu, H., Liu, L., Shao, F. (2007). Structural Insights into the Enzymatic Mechanism of the Pathogenic MAPK Phosphothreonine Lyase. *Molecular Cell*, 28(5), 899–913.
- Zschiedrich, P. C., Keidel, V., and Szurmant H. (2016). Molecular mechanisms of two-component signal transduction. *J Mol Biol.*; 428(19): 3752–3775