

УДК 577.29:579.22

ПРЕНИЛИРОВАНИЕ: ОТ БАКТЕРИЙ К ЭУКАРИОТИЧЕСКИМ ОРГАНИЗМАМ

© 2013 г. Е. С. Маракасова^{1, 2}, Н. К. Ахматова², М. Амава¹, В. Eisenhaber^{3, 4, 5},
F. Eisenhaber³, M. L. van Hoek¹, А. В. Баранова^{1, 6*}

¹Center for the Study of Chronic Metabolic Diseases and School of Systems Biology, David King Hall,
George Mason University, Fairfax, VA 22030, USA

²Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова
Российской академии медицинских наук, Москва 105064

³Bioinformatics Institute, Agency for Science, Technology and Research, Singapore 138671

⁴Department of Biological Sciences, National University of Singapore, Singapore 117597

⁵School of Computer Engineering, Nanyang Technological University, Singapore 637553

⁶Медико-генетический научный центр Российской академии медицинских наук, Москва 115478

Поступила в редакцию 08.02.2013 г.

Принята к печати 18.04.2013 г.

Внутриклеточные паразиты эукариот выработали множество механизмов для защиты от активной среды и внутриклеточных компонентов клетки хозяина, ограничивающих микробные инфекции. В частности, это компоненты так называемых систем секреции прокариотических белков III и IV, способные обеспечивать проникновение эффекторных молекул, производимых микроорганизмами, непосредственно в эукариотическую клетку. Многие из этих белков проходят посттрансляционную модификацию с использованием ферментов клетки хозяина и имитируют функции белков эукариот. Предполагают, что одной из таких посттрансляционных модификаций является пренилирование, которое заключается в присоединении липофильной изопренильной группировки к синтезирующемуся полипептиду. В обзоре представлены современные данные о механизмах пренилирования на примере эукариотических и прокариотических белков, описаны их функции, рассмотрены ингибиторы пренилирования и механизм их действия, а также белки бактерий рода *Francisella* как вероятные мишени пренилирования.

Ключевые слова: пренилирование, механизм, PrePS, ингибиторы пренилирования, *Francisella*, белки SifA, AnkB.

PRENYLATION: FROM BACTERIA TO EUKARYOTES, by E. S. Marakasova^{1, 2}, N. K. Akhmatova², M. Amaya¹, V. Eisenhaber^{3, 4, 5}, F. Eisenhaber³, M. L. van Hoek¹, A. V. Baranova^{1, 6*} ¹Center for the Study of Chronic Metabolic Diseases and School of Systems Biology, David King Hall, George Mason University, Fairfax, VA 22030, USA, *e-mail: abaranov@gmu.edu, aancha@gmail.com; ²Mechnikov Research Institute for Vaccines and Serum, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 105064 Russia; ³Bioinformatics Institute, Agency for Science, Technology and Research, Singapore 138671; ⁴Department of Biological Sciences, National University of Singapore, Singapore 117597; ⁵School of Computer Engineering, Nanyang Technological University, Singapore 637553; ⁶Research Centre for Medical Genetics, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 115478 Russia). For their protection from host cell immune defense, intracellular eukaryotic parasites developed a variety of mechanisms, including secretion systems III and IV which inject bacterial

Принятые сокращения: DPPS (Decaprenyl Pyrophosphate Synthase) – декапренилпирофосфатсинтаза; FGPPS (Farnesyl Pyrophosphate Synthase) – фарнезилгеранилпирофосфатсинтаза; FPP (Farnesyl Pyrophosphate) – фарнезилпирофосфат; FT (Farnesyl Transferase) – фарнезилтрансфераза; FTI (Farnesyl Transferase Inhibitors) – ингибиторы фарнезилтрансфераз; GGPPS (Geranyl Geranyl Pyrophosphate Synthase) – геранилгеранилпирофосфатсинтаза; GGT1 (Geranyl Geranyl Transferase type I) – геранилгеранилтрансфераза 1; GGT2 (Geranyl Geranyl Transferase type II) – геранилгеранилтрансфераза 2; GPP (Geranyl Pyrophosphate) – геранилпирофосфат; HepPPS (Hepaprenyl Pyrophosphate Synthase) – гептапренилпирофосфатсинтаза; HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-Coenzyme A) – 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А; ICMT (Isoprenyl-Cysteine carboxyl Methyltransferase) – изопренил-цистеинкарбоксил-метилтрансфераза; IPP (IsoPentenyl Pyrophosphate) – изопентенилпирофосфат; IPPS (Isoprenyl Pyrophosphate Synthases) – изопренилпирофосфатсинтазы; MVA (Mevalonate) – мевалонат; MVAP (5-PhosphoMevalonate) – 5-фосфомевалонат; OPPS (Octaprenyl Pyrophosphate Synthase) – октапренилпирофосфатсинтаза; RCE1 (Ras-Converting Enzyme 1) – Ras-конвертирующий фермент 1; SCV (*Salmonella*-Containing Vacuole) – вакуоль, содержащая сальмонеллу; SPPS (Solanesyl Pyrophosphate Synthase) – соланезилпирофосфатсинтаза; UPP (Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase) – ундекапренилпирофосфатсинтаза; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

* Эл. почта: abaranov@gmu.edu; aancha@gmail.com

effectors directly into eukaryotic cells. These effectors may be posttranslational modified by host cell machinery and may function inside the host cell. Recently, to the list of possible posttranslational modifications of bacterial proteins the prenylation was added. In this work we describe current state of the knowledge about the prenylation of eukaryotic and prokaryotic proteins and its inhibitors. The bioinformatics analyses suggest possibility of prenylation for a number of *Francisella* genus proteins.

Keywords: prenylation, mechanism, PrePS, prenylation inhibitors, *Francisella*, SifA, AnkB proteins.

DOI: 10.7868/S0026898413050133

ЧТО ТАКОЕ ПРЕНИЛИРОВАНИЕ

Пренилирование — это процесс посттрансляционной модификации белков, при котором липофильная изопренильная группа ковалентно присоединяется к полипептиду, синтезированному *de novo*. В качестве изопренильной группы могут быть использованы природные соединения, отличающиеся друг от друга по числу и составу углеродных IPP-мономеров [1]. Из представителей основных групп организмов — *Eukarya*, *Bacteria* и *Archaea* — выделено более 23000 изопреноидных структур. Среди них стероиды, которые являются циклическими изопреноидами и выполняют функцию гормонов; каротиноиды с конъюгированными двойными связями, составляющими хромофорные структуры для поглощения света и характерные для зеленых растений и ряда фотосинтезирующих бактерий; и ретиноиды, участвующие в морфогенезе и рецепции света [1].

В клетках эукариот предшественники изопреноидов образуются в качестве продуктов цикла синтеза мевалоната (MVA) [2], в котором HMG-CoA (3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А) синтезируется из трех молекул ацетил-CoA. Это соединение превращается в мевалоновую кислоту, которая последовательно фосфорилируется до 5-фосфомевалоната (MVAP), а затем — до 5-пирофосфомевалоната (MVAPP), служащего субстратом для синтеза фарнезилпирофосфата (FPP) и геранилгеранилпирофосфата (GPP) (рис. 1) [2].

В результате пренилирования фарнезиллом или геранилгеранилом белок приобретает гидрофобные свойства и приобретает способность взаимодействовать с клеточными мембранами или мембранами органелл, а нарушение этого процесса приводит к развитию тяжелых заболеваний человека, в том числе злокачественных опухолей, генетически обусловленной слепоты, преждевременного старения и остеопороза [3].

Первое упоминание о пренилированном полипептиде приводится в работе 1978 г. [4]. Из гриба *Rhodospiridium toruloides* был выделен родоторин, на С-конце которого находился S-фарне-

зилцистеин. Десятилетием позднее было показано, что между секретлируемым пептидным феромоном из грибов класса гетеробазидиомецетов и пренилированным α -фактором (половым феромоном) из грибка *Saccharomyces cerevisiae* имеется структурная аналогия [5, 6].

Дальнейшие структурные исследования показали, что 15- и 20-углеродные (фарнезил и геранилгеранил соответственно) группы могут присоединяться к белкам, С-конец которых содержит СааХ-мотив (где С — цистеин, а — любая алифатическая аминокислота, Х — любая аминокислота) [7]. Серин, метионин или аланин в позиции Х обуславливают фарнезилирование, а лейцин — геранилгеранилирование [8, 9]. Некоторые специфические аминокислотные остатки, расположенные за пределами мотива СааХ, также имеют значение для распознавания пренилируемого субстрата. Поэтому наличие СааХ-структуры — необходимое, но не достаточное, условие для пренилирования [9].

Механизм пренилирования

Процесс пренилирования состоит из трех стадий (рис. 2). На первой происходит взаимодействие СааХ-домена белка (а также фарнезил- или геранилгеранил-группы) либо с фарнезилтрансферазой (FT), либо с геранилгеранилтрансферазой 1 (GGT1) [10]. На второй стадии происходит протеолиз с помощью Ras-конвертирующего фермента 1 (RCE1), связанного с эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР); фермент отщепляет аминокислотные остатки aaX. На третьей стадии, происходящей в ЭПР, цистеин подвергается метилированию с помощью изопренилцистеинкарбоксил-метилтрансферазы (ICMT) [9–11].

Большинство линейных изопреноидов клетки образуются путем соединения C15-фарнезилпирофосфата и IPP [1, 12]. В зависимости от стереохимической структуры их продуктов, ферменты, синтезирующие линейные изопренилпирофосфаты, подразделяют на *cis*- и *trans*- изопренилпирофосфатсинтазы (IPPS). Геранилгеранилпирофосфатсинтазы (GGPPS) и фарнезилгеранилпи-

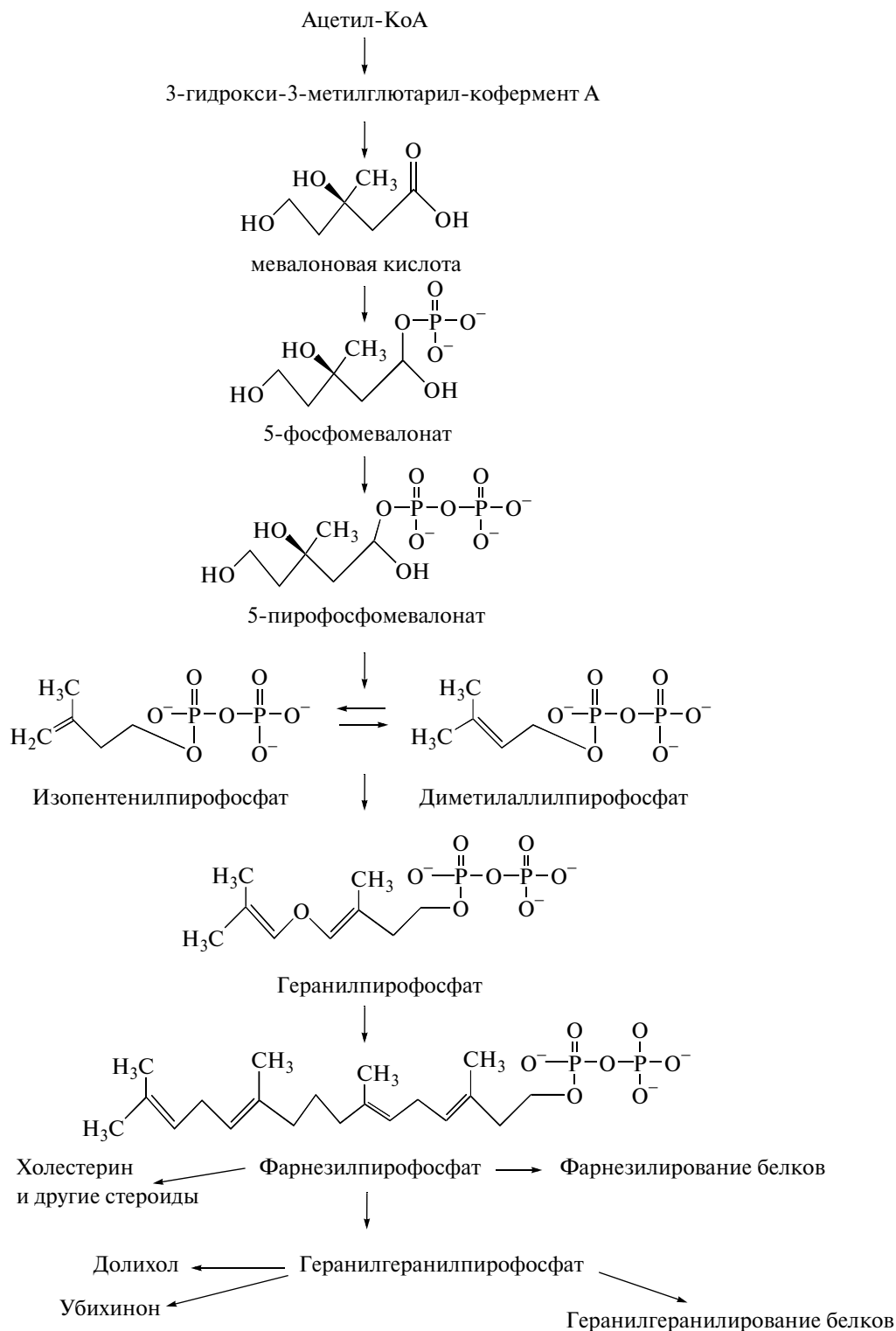


Рис. 1. Биосинтез изопреноидов в эукариотических клетках (цит. по [2]). Синтез фарнезилпирофосфата в эукариотических клетках происходит по пути MVA из ацетил-СоА. Фарнезилпирофосфат используется как для пренилирования, так и для синтеза стероидов, а геранилгеранилпирофосфат также необходим для синтеза долихола и убихинона.

рофосфатсинтазы (FGPPS) синтезируют C20 и C25 *trans*-полипренилпирофосфаты, а также комбинированные липиды C20-C20 и C20-C25 [1, 13].

В клетках *Escherichia coli* октапренилпирофосфатсинтаза (OPPS) формирует изопреноид C40, служащий боковой цепью убихинона. У эукариот и про-

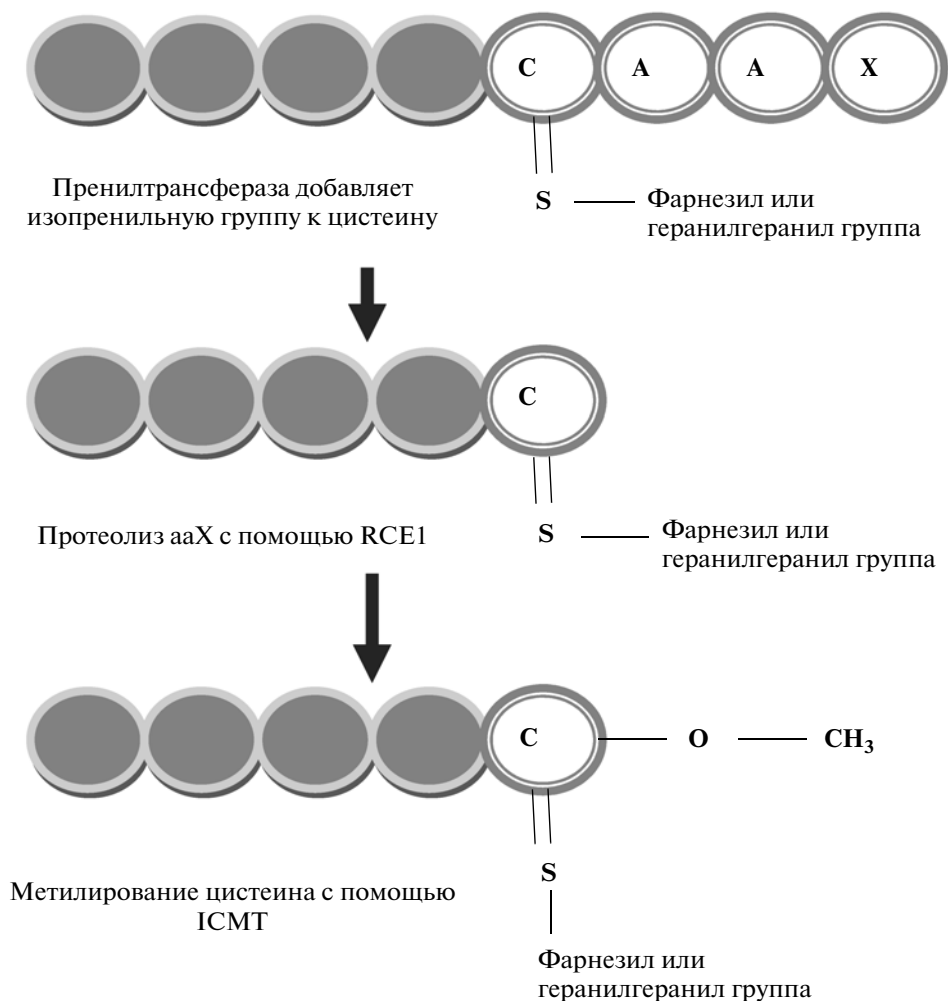


Рис. 2. Процесс пренилирования в эукариотических клетках. Состоит из трех стадий: присоединение изопренильной группы к цистеину, протеолиз aaX и метилирование. Первая стадия происходит в цитоплазме, а вторая и третья — в эндоплазматическом ретикулуме. В результате пренилирования белок приобретает гидрофобные свойства.

кариот описано множество *cis*-изопренилпирофосфатсинтаз, включая соланезилпирофосфатсинтазы (SPPS), декапренилпирофосфатсинтазы (DPPS), гептапренилпирофосфатсинтазы (HePpps из *Mycobacterium tuberculosis*) и гексапренилпирофосфатсинтазы (HexPps из *Bacillus stearothermophilus* и дрожжей). Эти ферменты отвечают за образование боковых цепей убихинона длиной C45, C50, C35 и C30 соответственно [1].

Из *cis*-полипренилпирофосфатов интересен фосфат с длиной C55 — продукт ундекарпенилпирофосфатсинтазы UPPS из *E. coli*, который служит липидным носителем для синтеза пептидогликана. Эукариотический гомолог этого фермента — дегидродолихолпирофосфатсинтаза (DDPPS) — отвечает за синтез C55–C100-долихолов для биосинтеза гликопротеинов, образующихся в результате цикла, сходного с циклом синтеза бактериального пептидогликана [1]. Самый длинный полимер такого типа, включающий 120 углеродов, представляет собой

конечный продукт изопренилпирофосфатсинтазы арабидопсиса (*Arabidopsis thaliana*). Функция этого полимера пока неизвестна. У *M. tuberculosis* имеется уникальная короткоцепочечная *cis,trans*-FPP, которая превращает C10-GPP и IPP в FPP с двойной *cis*-связью [14]. Геном этой бактерии кодирует также декапренилпирофосфатсинтазу (DPPS) для синтеза C50-декапренилпирофосфата, который используется в качестве липидного носителя и содержит на одну единицу IPP меньше, чем UPP у других бактерий. Для каждого продукта пренилирования характерна специфическая длина цепи, определяющая биологическую функцию продукта. Определены кристаллические структуры *cis*-типов UPPS из *Micrococcus luteus* и *E. coli* [15, 16].

К пренилтрансферазам другого семейства относят ферменты, катализирующие перенос углеродного компонента с FPP или GGPP на консервативный цистеиновый остаток, расположенный на C-конце белка или полипептида [1]. Клетки человека

содержат три таких пренилтрансферазы – FT, GGT1 и GGT2 [17, 18].

Ферменты FT и GGT1 узнают С-концевые СааХ-последовательности, их называют СааХ-пренилтрансферазами [18], в то время как GGT2 (Rab-геранилгеранилтрансфераза) взаимодействует с аминокислотными остатками СС или СХС [8]. GGT2 специфична для белков Rab-семейства [8, 17, 19]. Тип пренилирования определяет СааХ-последовательность. Фермент FT чаще взаимодействует с полярными гидрофобными аминокислотами небольшого размера, расположенными в “Х”-позиции [11], в то время как GGT1 предпочитает лейцин. Следует отметить, что пренилтрансферазы могут распознавать и другие аминокислоты, в том числе метионин, фенилаланин, изолейцин и валин [11]. Для субстратной специфичности пренилтрансфераз обнаружено немало исключений. Так, для взаимодействия с FT и GGT1 в первой позиции “а” может находиться практически любая аминокислота [17], но во второй позиции “а” необходимо присутствие гидрофобного аминокислотного остатка, например, лейцина, изолейцина, валина, фенилаланина или триптофана. В позиции “Х” для взаимодействия с GGT1 предпочтительна гидрофобная аминокислота, поскольку белок-связывающий домен GGT1 обладает гидрофобными свойствами [17]. Фермент FT имеет два субстрат-специфичных кармана, имеющих высокую степень сродства к метионину, серину и глутамину. Кинетические расчеты показали, что FT может взаимодействовать и с другими аминокислотными остатками, например, с аланином, лейцином, гистидином или аспарагином [17].

Поскольку в результате пренилирования на С-конце аминокислотной цепочки появляется гидрофобная группа, эта модификация позволяет белку локализоваться в плазматической мембране [10].

Предсказание пренилирования белков

Очевидно, что С-концевая последовательность аминокислот белка чрезвычайно важна для его клеточной судьбы, в частности, определяет, будет ли белок пренилирован и какой тип изопренильной группы будет присоединен [20]. Ранее работы по предсказанию пренилирования были основаны на сравнении С-концевого участка, расположенного рядом с потенциально модифицируемым цистеином белка-субстрата, с известными последовательностями белков-субстратов, описанных экспериментально, а также и на сравнении с результатами опытов по пренилированию коротких пептидов. Были установлены так называемые мотивы модификации (например, мотив СааХ). С увеличением числа экспериментально охарактеризованных субстратов разнооб-

разии С-концевых последовательностей также увеличилось. Стало ясно, что в отличие от пептидов, в реальных белках немалую роль играют аминокислотные остатки, окружающие модифицируемый цистеин.

Связывание С-концевой последовательности белка-субстрата с пренилтрансферазой – абсолютно необходимое условие для присоединения липидного остатка. Для этого взаимодействия необходимы два сигнальных участка [21]. Первый из них находится на конце пептида (обычно это четыре последних остатка). Концевой участок погружен в каталитическую расщелину активного центра фермента и плотно взаимодействуют с пренилтрансферазой. Этот участок наиболее консервативен. Второй участок представляет собой сегмент из примерно 10 аминокислотных остатков, которые служат механическим линкером, соединяющим связанный с С-концевой частью фермент и оставшуюся часть белка-субстрата. Как правило, этот регион состоит из аминокислотных остатков, имеющих небольшие полярные группы и гибкую основу. Если такие остатки в составе участка имеются, то он способен функционировать в качестве линкера и, при этом допускает присутствие и других, менее гибких аминокислотных остатков [21].

Линкерный регион обеспечивает доступ к С-концевой последовательности для пренилтрансферазы любого типа. Тип изопренильной группы, которая будет присоединена к субстрату, определяется свойствами как С-концевой последовательности (первого участка), так и нескольких специфичных остатков второго участка, находящихся в устье каталитической полости [21]. Например, участок СааХ состоит из подвергающегося модификации цистеина и трех других аминокислотных остатков. Ранее считалось, что эта последовательность должна обязательно состоять из двух алифатических остатков. Сейчас же мы знаем, что эти аминокислотные остатки могут быть самыми разными, особенно первый из них. Если в последней позиции СааХ-последовательности находится метионин, серин, аланин, глутамин или цистеин, то фарнезилирование происходит более эффективно. Однако оно происходит и в случае треонина, гистидина, валина, аспарагина, фенилаланина, глицина и изолейцина. Фермент GGT немного более избирателен: лучше всего он работает с субстратами, на С-конце которых расположен лейцин, однако и другие остатки с длинными гидрофобными группами или ароматической структурой также будут распознаны. Таким образом, СааХ-мотив было бы лучше назвать СХХХ, поскольку эту последовательность узнают и FT и GGT1.

Важно отметить, что экспериментальное подтверждение самого факта пренилирования того или иного белка – трудоемкая задача. Типичный

процесс экспериментального анализа выбранных кандидатов включает клонирование гена белка-субстрата, его экспрессию и доказательство пренилирования в присутствии ^3H -меченного липидного предшественника. Недавно описан более эффективный метод, в котором для детекции радиоактивного ^3H используется тонкослойная хроматография [18].

Менее перспективные кандидаты можно “отсеять” с помощью предсказаний *in silico*. Так, имеется онлайн-программа для предсказания пренилирования PrePS (Prenylation Prediction Suite), отличающаяся высокой точностью предсказания: ее чувствительность достигает 95% [21], вероятность получения ложноположительного результата для FT алгоритма составляет 0.11%, а для GGT1 алгоритма – 0.02% [21]. FT/GGT1-алгоритм PrePS сравнивает физико-химические свойства и первичную последовательность 15 С-концевых аминокислотных остатков белка-кандидата с последовательностями и свойствами ранее описанных пренилируемых белков [21]. Алгоритм распознавания субстратов GGT2 для поиска гомологичных глобулярных доменов использует скрытые Марковские модели (НММ, hidden Markov models) [21]. В каждом из трех алгоритмов – FT, GGT1, и GGT2 – пакет PrePS оценивает вероятность ложноположительного ответа. Полученные с помощью PrePS результаты поиска пренилируемых белков в геномах животных опубликованы [22].

Точность прогноза PrePS существенно зависит от того, насколько сходны между собой последовательности белков, составляющих обучающий набор, и насколько хорошо этот набор отражает реальный “пренилом” конкретного организма. Никогда нельзя исключать, что имеются некие дополнительные, редкие и пока еще не известные комбинации аминокислот, которые могут быть распознаны той или иной пренилатрансферазой. Поэтому нельзя исключить и то, что PrePS может “пропустить” какой-либо пригодный для пренилирования субстрат.

В таблице представлены результаты предсказания пренилирования бактериальных белков с помощью программы PrePS. Плюсы и минусы означают степень пригодности субстрата для пренилирования. Числа отражают общую ценность предсказания, рассчитанную с учетом физических свойств С-концевых аминокислот. Нужно принимать во внимание, что исследуемый субстрат-кандидат может содержать перекрывающиеся участки распознавания для трех пренилатрансфераз (FT, GGT1, GGT2). Например, если по результатам предсказания белок является пригодным субстратом для GGT2, то он может быть и геранилгеранилирован *in vivo*, и модифицирован с помощью FT или GGT1 *in vitro*.

Пренилируемые белки эукариот

Доля пренилируемых белков в геномах млекопитающих составляет около 2% [9, 10]. Компьютерное моделирование субстрат-ферментного взаимодействия показало, что более 60 белков человека содержат подходящие С-концевые последовательности, которые могут быть распознаны FT или GGT [23]. Экспериментально охарактеризованные пренилируемые белки разделяют на три группы: G белки (H-Ras, K-Ras4B, RhoA, RhoB, RhoC, Rac1/1b, Rac2, Rac3, RhoG, Rnd1, Rnd2, Rnd3/RhoE, Cdc42, TC10/RhoQ, TCL, RhoD, Rif/RhoF, RhoH/TTF, Wrch-1, Chp/Wrch-2, RhoBTB1c, RhoB2/DB2c, Rap1b, Rap2b); ядерные белки (преламин А, ламин В1, ламин В2); внутриклеточные мембранные белки (HsPXF, Cerp-F, Cerp-E, Pharbin, HDJ2) [10]. Представители семейства Ras, Hdj2, ядерных ламинов и RheB подвергаются фарнезилированию [10], а семейств Rac, RhoA, Cdc42 и с-субъединицы гетеротримерных G-белков – геранилгеранилированию [21]. Многие пренилируемые белки хорошо изучены в качестве участников процесса передачи сигналов. Из дополнительных функций можно назвать их участие в процессах клеточной дифференцировки, пролиферации, апоптоза и общего метаболизма. Полное подавление процесса пренилирования приводит к гибели клеток человека [7, 10].

Пренилированные GTPазы семейства Ras прикреплены к мембране клетки и передают сигнал от поверхностных рецепторов к транскрипционным факторам, работающим внутри ядра. Белки семейства GTPаз Rho могут быть расположены в плазматической мембране (Rac1), на эндомембранах (RhoH) или же эндосомах (RhoD) [10, 24]. С-концы белков H-Ras и N-Ras содержат пренилированный цистеин в позиции 186 и пальмитоилированный цистеин в позиции 181 [25], который обуславливает выход этого белка из комплекса Гольджи и его транспорт к мембране клетки [25]. Для пренилирования Rac1 необходимо его пальмитоилирование по цистеину в позиции 178, что и определяет его локализацию в участках мембраны, соответствующих местам прикрепления актинового цитоскелета [25].

Ядерные ламины образуют фибриллярную сеть, поддерживающую внутреннюю мембрану ядра. Эти белки поддерживают также структуру хроматина, участвуют в процессах репликации ДНК и закрепления поровых комплексов в растущей и делящейся клетке [10]. Заякоривание ламина на внутренней мембране ядра является необходимым условием для его нормального функционирования [10, 26]. Большинство мутаций в ламин-кодирующих генах приводят к нарушению нормальной функции этих белков и к развитию первичных ламинопатий, поражающих поперечнополосатую мускулатуру, перифе-

Результаты анализа белков патогенных бактерий и простейших с помощью трех алгоритмов PrePS

Название	С-конец	Алгоритм анализа				
		FT		GGT1	GGT2	
Анализ белков бактерий						
<i>Legionella pneumophila</i> AnkB	EMQEEKIAQSK <u>CLVC</u>	-0.134	+	-6.632	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> RL022	PIVFPDQPAVE <u>CQDE</u>	-9.514	-	-30.815	-	-
<i>Pseudomonas tolaasii</i> locus involved in self protection to the lipodepsipeptide toxin tolaasin	CSKNRRAVLAC <u>CSI</u>	-4.007	-	-10.414	-	-
<i>Escherichia coli</i> 0157:H7 ECs2028	YQEAEEERSKRRC <u>GLL</u>	-1.244	+	-0.840	+	-
<i>Salmonella typhimurium</i> LT2 STM1055	KPLHSSSWKDW <u>CTIL</u>	0.748	++	1.713	++	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 Atu0147	YFFKQRDAETA <u>CTNC</u>	-4.945	-	-16.436	-	-
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA 110 hypothetical protein blr6418	TCLPYIAPSRG <u>CRRC</u>	-8.182	-	-36.029	-	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> RGTB423 proline-rich antigen-like protein	QTLADKIMTTV <u>CVPI</u>	-2.798	-	-8.184	-	-
<i>Mycobacterium leprae</i> TN hypothetical protein ML2395	QTLADKIMTTV <u>CLPI</u>	-3.667		-9.570	-	-
<i>Mycobacterium phlei</i> RIVM601174 Pra	QTLADKTVGTV <u>CRPL</u>	-4.600	-	-14.837	-	-
<i>Francisella tularensis</i> FTT_0502c	ASSLTKSAQSN <u>CYML</u>	-4.502	-	-7.131	-	-
<i>Francisella tularensis</i> FTT_1693c	FNPDFS DENLL <u>CFTR</u>	-6.521		-26.037	-	-
<i>Francisella tularensis</i> FTT_0482c	SNTVSYTWIAG <u>CWQK</u>	-9.103	-	-30.026	-	-
Анализ белков простейших						
<i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 GTPase, putative	NLNARPIKDTKKKCC	н/а	-	н/а	-	+++
<i>Trichomonas vaginalis</i> Rac1-related protein	TQTK EKTGGGC <u>CELI</u>	-2.902	-	-6.111	-	-
Примеры распознанных белков человека						
RAC1 (ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)	CPPPVKKRKRK <u>CLLL</u>	-0.257	+	2.034	+++	-
G-белок, субъединица γ 12	TSENPFKDKKT <u>CIIL</u>	0.387	++	2.696	+++	-
RhoB	RYGSQNGCIN <u>CKVL</u>	-1.087	+	-1.688	+	-

Мотив СааХ выделен полужирным шрифтом и подчеркнут. С обозначает модифицируемый цистеин, к которому присоединяется изопренильная группа. Для сравнения указаны параметры распознавания трех экспериментально описанных пренилируемых белков человека.

рические нервы и жировую ткань. Это приводит к дегенерации внутренних органов и преждевременному старению [10, 26].

HsPxF – единственный известный на сегодняшний день фарнезилированный пероксисомный белок, необходимый для биогенеза этой органеллы. Мутации в генах, кодирующих этот белок, приводят к развитию синдрома Зельвегера – прогрессивному неврологическому заболеванию, которое выражается в нарушении функции печени и приводит к смерти в младенческом возрасте [27]. Из других пренилированных белков эукариот назовем простациклиновый рецептор (GPI receptor), контролирующей пролиферацию клеток, и центральный белок F (Cenp-F) – компонент кинетохоры, участвующий в процессе нормального клеточного деления и необходимый для своевременного прохождения фазы G2/M [28]. Еще один пример – инозитол-1,4,5-трифосфат-5-фосфатаза, которая осуществляет гидролиз вторичного мессенджера InsP3 в тканях мозга [29]. На C-конце этого белка находится фарнезилируемый участок CVVQ. Предполагается, что пренилирование этого белка необходимо для правильной регуляции синтеза InsP3 [29].

Пренилированные белки обнаружены также у некоторых патогенных простейших одноклеточных, в том числе у лямблии (*Giardia lamblia*), шистосомы (*Schistosoma mansoni*), трипаносом (*Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*), лейшмании (*Leishmania mexicana*), токсоплазмы (*Toxoplasma gondii*) и плазмодия (*Plasmodium falciparum*) [30]. Обнаружена энзиматическая активность FT и GGT1 в клетках *T. brucei* [31], клонирован ген FT из этого организма и изучена его субстратная специфичность [32, 33]. FT из трипаносомы взаимодействует с C-концевыми последовательностями, содержащими мотив CVIM, в то время как геранилгеранилирующий фермент GGT1 узнает последовательность CVLL [31]. Одним из субстратов FT этого организма является кинезин эукариот, в составе которого также распознается C-концевая последовательность CVIM [34]. Фарнезилирование кинезина клетки-хозяина необходимо для успешного размножения трипаносомы [34]. Клонированы гены FT из другой трипаносомы (*T. cruzi*), из лейшмании (*Leishmania major*) [31], а также из плазмодия (*P. falciparum*) [30], субстратами пренилирования для FT и GGT1 которого служат последовательности NRSCAIM и NRSCAIQЮ соответственно [30].

Аналоги FT, GGT1 и GGT2 обнаружены у растений [35], которые способны производить небелковые пренилированные вещества, обладающие антимикробными и цитотоксичными свойствами. К их числу относятся пренилированные флавоноиды из семейства тутовых (*Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera*

Vent), бобовых (*Sophora flavescens* Ait, *Echinosophora koreensis* Nakai) [36] и симарубовых (*Harrisonia abyssinica*) [37].

Белки патогенных микроорганизмов, подвергающиеся пренилированию в клетках эукариот

Главная задача патогенной бактерии, попавшей в клетку хозяина, – размножение [38], для чего необходимо преодолеть сопротивление клетки-хозяина. Микроорганизм секретирует в среду или вводит непосредственно в клетку ряд эффекторных молекул, которые, в свою очередь, могут вступать во взаимодействия с белками клетки-хозяина, а также служить субстратами для посттрансляционных модификаций клеточными ферментами. Так, бактериальные белки, содержащие мотив SaaX, могут подвергаться пренилированию с помощью системы пренилирования хозяина, что приводит к изменению свойства этих белков. Это экспериментально показано на примере прокариотических белков SifA и AnkB.

Пренилированный белок SifA из граммотрицательного факультативного внутриклеточного паразита *Salmonella typhimurium* участвует в формировании тубулярных мембранных структур, которые являются продолжением формирующейся вокруг бактерии внутриклеточной вакуоли, необходимой для ее выживания внутри эукариотической клетки. C-конец белка SifA содержит последовательность CLCCFL, необходимую для его геранилгеранилирования с последующим S-ацилированием [39]. Интересно, что C-концевая последовательность SifA сходна с последовательностью эукариотических пренилируемых белков семейства Rab, в том числе с последовательностью белка Rab7 (небольшой GTPазы, отвечающей за слияние поздних эндосом с лизосомами) и RILP – эффектора Rab7, который направляет моторные белки динеин/динактин к вакуоли, содержащей клетку сальмонеллы, и впоследствии сливается с лизосомой. Пренилированный белок SifA взаимодействует с белком Rab7, выполняя функцию “разъединителя” Rab7 и RILP [39]. Модификация необходима для локализации этого белка в сформированной вокруг бактерии вакуоли и для успешной инфекции организма сальмонеллой [39, 40].

Пренилируемый белок легионеллы (*L. pneumophila*) – анкирин В (AnkB) – позволяет проникать этой бактерии внутрь альвеолярных макрофагов [41–43]. Молекулы AnkB впрыскиваются в клетку хозяина с помощью системы секреции Dot/Icm в момент присоединения бактерии к плазматической мембране [44]. Интересно, что AnkB необходим для размножения этой бактерии как в клетках млекопитающих, так и в клетках простейших [38, 43]. Для выполнения собственной биологической функции белку AnkB необхо-

димы и F-бокс, и два анкирин-домена, участвующих в белок-белковых взаимодействиях [41, 43]. На С-конце AnkB есть последовательность CVLC [3], опосредующая фарнезилирование этого белка с помощью FT клетки-хозяина [3, 43]. В процессе пренилирования AnkB участвуют три белка клетки-хозяина – FT, ICMT и RCE-1 [38]. Пренилирование AnkB способствует его закреплению на мембране окружающей легионеллу вакуоли и стыковке с эукариотическим белком SKP1 убиквитин-лигазного комплекса SCF1, который осуществляет убиквитинирование и деградацию белков клетки-хозяина. Образующиеся при этом свободные аминокислоты транспортируются внутрь вакуоли и используются легионеллой для роста и размножения [46]. Полагают, что важную роль в эволюции легионеллы и ее эффекторных белков сыграл горизонтальный перенос генов между разными штаммами этой бактерии, а также перенос из геномов многоклеточных организмов и простейших [45]. Интересно, что в геномах некоторых изолятов этого микроорганизма ген AnkB не содержит SaaX-кодирующей последовательности [46].

Жизненный цикл граммотрицательных патогенных бактерий рода *Francisella*, включающего возбудитель туляремии *F. tularensis*, а также малопатогенные виды *F. novicida* и *F. philomiragia* (ранее *Yersinia philomiragia*), весьма сходен с циклом легионеллы. При попадании в организм хозяина бактерия поглощается макрофагами и оказывается в цитозоле этих клеток. В течение 5–15 мин после инвазии бактерии активируют сигнальный каскад Ras [27] и размножаются. Большинство генов, необходимых для вирулентности, находятся в составе так называемых геномных островков патогенности франциселлы [27], которые состоят из 16–18 генов, отвечающих как за выход бактерии из патоген-содержащей фагосомы, так и за ее внутриклеточную репродукцию [27].

Возможные “мишени” пренилирования патогенных микроорганизмов впервые описаны в работе Аль-Кадана (Al-Quadan) и соавт [3], в которой С-концевые последовательности белков легионеллы и сальмонеллы анализировали с помощью программы “FTase FlexPepBind predictor”. В нашей работе этот анализ дополнен с помощью алгоритма PrePS, описанного выше. Результаты анализа представлены в таблице.

Список бактериальных белков, которые могут служить субстратами пренилирования, включают белки *E. coli* 0157:H7 ECs2028, *S. typhimurium* LT2 STM1055 и *Legionella* AnkB, а также белки *Francisella* FTT_1693c, FTT_0502c, FTT_0482c, ранее не упоминавшиеся в качестве кандидатов для пренилирования [3].

Белок FTT_0482c, состоящий из 271 аминокислотного остатка, также является одним из по-

тенциальных факторов вирулентности франциселлы [47]. Мембранный белок FTT_0502c, состоящий из 151 аминокислоты, содержит три предсказанных трансмембранных домена. Функция белка FTT_1693c, состоящего из 254 аминокислотных остатков, не известна.

Следует отметить, что белок SifA, геранилгеранилирование которого доказано экспериментально, не был предсказан как субстрат пренилирования с помощью программы PrePS (FT score: 5,1 GGT1 score: 5.3, таблица). Отличие экспериментальных результатов от предсказанных *in silico* может быть связано как с природой, зарядом и характеристиками SaaX-последовательности этих белков, так и с особенностями расположения аминокислотных остатков выше сайта пренилирования.

Ранее для предсказания пренилируемых белков четырех штаммов легионеллы использовали программу PrePS [44]. При сравнении разных штаммов из десяти предсказанных пренилируемых белков шесть оказались высококонсервативными [44]. Пренилирование некоторых из этих белков было подтверждено экспериментально. Lpg2144, Lpl2806 и Lpl2477 распознавались только FT, в то время как Lpg0254, Lpg1976, Lpg2375, Lpg2525 и Lpg2541 распознавались и FT, и GGT1 [44].

Мы сравнили последовательности прокариотических белков с эукариотическими компонентами системы пренилирования RCE1 и ICMT. В результате никаких гомологов этих ферментов у прокариот найдено не было. Однако некоторые бактерии кодируют собственные ферменты пренилирования: например, геном *L. pneumophila* кодирует геранилгеранилпирофосфатсинтазу (Ipa_03339). Роль бактериальных пренилирующих ферментов не изучена, но считают, что эти белки важны для репродукции бактерий и их вирулентности.

ПРОЦЕСС ПРЕНИЛИРОВАНИЯ У БАКТЕРИЙ НЕ ОГРАНИЧЕН БЕЛКАМИ

Ундекапренилдифосфатсинтаза (UPP-синтаза) играет важную роль в биосинтезе пептидогликана клеточной стенки. Она катализирует последовательную *cis*-конденсацию восьми молекул IPP с FPP. Образующийся при этом UPP обладает смешанной *цис/транс* стереохимией [48]. Экспериментально показано, что субстратами UPP-синтазы, выделенной из *Micrococcus luteus* В-Р 26, могут служить как фарнезилдифосфат, так и аллильный дифосфат, содержащий *cis*-пренильный компонент [48].

Респираторные хинин-изопреноловые (respiratory quinine isoprenologue lipids) липиды плазматической мембраны бактериальных клеток содержат две основные структуры: во-первых, убихиноновую (UQ, 1-метил-2-изопренил-3,4-диметоксипара-

бензохинон) с 2-изопренил-цепями, состоящими из 1-14 единиц; и, во-вторых, менахиноновую (МК, 1-изопренил-2-метилнафтохинон) и дезметилменахиноновую (DMK, 1-изопренил нафтохинон) [49]. Убихинон-содержащие изопренологические липиды найдены у аэробных протеобактерий и в эукариотических клетках, но их нет у грамотрицательных бактерий. В грамположительных бактериях обнаружены и менахиноновые, и дезметилменахиноновые структуры. Факультативные анаэробные грамотрицательные бактерии содержат разные структурные варианты трех дыхательных хинонов. Менахиноновые производные найдены у архей, а также у грамположительных и грамотрицательных бактерий, а дезметилменахиноновые — у некоторых известных патогенных бактерий, в том числе, у стрептококка (*S. faecalis*) [49]. В клетках *E. coli* производные убихинона участвуют в процессах регуляции генной экспрессии, защиты от окислительного стресса и метаболизма кислорода [49].

Еще один пример бактерий, использующих FT, — это представители рода *Streptomyces*. Эти бактерии продуцируют более трети всех известных в медицинской практике антибиотиков. Стрептомицеты используют FT во вторичном метаболизме для синтеза ароматических соединений, например, липохинонов. Ароматические FT липохинонового биосинтеза интегрированы в мембрану клетки. Описана также FT UbiA, которая участвует в биосинтезе убихинона [50] и CloQ и синтезирует хлоробиоцин в стрептомиците (*S. roseochromogenes*) [51]. CloQ отличается от UbiA: в нем отсутствует домен NDxxD, а его функция не зависит от двухвалентных катионов (Mg^{2+}).

У бактерии *Streptomyces* sp. CL190 обнаружена ароматическая пренилтрансфераза NphB, участвующая в процессе биосинтеза пренилированного поликетидного нафтерпина [50], который образуется в качестве продукта биосинтеза поликетидов и мевалоната. NphB может пренилировать 1,6-дигидроксиафталин (DHN) и 4-гидроксибензилпириват [52].

Два других FT-гена, *SCO7190* и *NovQ*, обнаружены в геномах стрептомицетов *S. coelicolor* A3 и *S. niveus* соответственно [53, 54]. Первый из них кодирует белок SCO7190, который пренилирует 1,6-DHN (1,6-дигидроксиафталин), 2,7-DHN (2,7-дигидроксиафталин) и нарингенин, а второй — белок NovQ, пренилирующий фенилпропаноиды [52]. Эти пренилтрансферазы способны также модифицировать L-триптофан с образованием 5-диметилаллил-L-триптофана [55].

По одной из гипотез, золотистый стафилококк (*S. aureus*) использует систему пренилирования клетки хозяина для собственной инвазии [56]. Известно, что в клеточной мембране человека взаимодействие между СааХ-доменами белков Ras и CDC42 и регуляторной субъединицей p85

фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) приводит увеличению скорости синтеза и деградации актиновых филаментов и к активации внутриклеточного транспорта. [57]. В начале инвазии адгезины стафилококка связываются с внеклеточными белками. Рост этого кокка можно подавить симвастатином, ингибитором пренилирования [56]. В работе предложена гипотеза, допускающая что, уменьшая уровень пренилирования белка, симвастин разъединяет СааХ-содержащие белки от PI3K в цитозоле, вследствие чего и угнетается динамика функционирования актина, необходимая для инвазии стафилококка. Как именно симвастин влияет на пренилирование, пока не ясно, однако известно, что в клетках человека симвастин гидролизует до гидроксикислотного производного, которое подавляет HMG-CoA-редуктазу, а, следовательно, влияет и на кинетику образования мевалоната из HMG-CoA.

Олигопептидный феромон бациллы *Bacillus subtilis* — ComX — способен стимулировать естественную компетентность бактерий по достижении определенной плотности популяции [58]. ComX содержит пренилированный триптофан, и эта модификация осуществляется ферментом ComQ [58]. Затем показали, что ComX не содержит консенсусной последовательности для пренилирования триптофана, а вместо этого, скорее всего, в ComX-пептиде геранилированию подвергается цистеин на C-конце белка [59].

Особенно интересно сообщение, опубликованное авторами из Гарвардского университета, которые обнаружили у некоторых бактерий (*E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Salmonella enterica* var. *typhimurium*) геранилирование РНК [60]. Геранильная группа может присоединяться к атому серы в двух 5-метиламинометил-2-тиоуридин-нуклеотидах РНК. Общее число геранилированных нуклеотидов в клетке составляет около 7%. Такие модифицированные нуклеотиды чаще всего встречаются в первой позиции антикодона тРНК — UUC, UUU или UUG, а их наличие или отсутствие влияет на эффективность смещения кодонов в открытой рамке считывания в процессе трансляции [60].

Ингибиторы пренилирования

Интерес к ингибиторам пренилирования растет с каждым годом, так как эти соединения могут быть использованы для лечения ряда заболеваний, в том числе, опухолевых [6, 61]. Поэтому поисками и изучением естественных ингибиторов пренилирования заняты многие исследовательские группы [62]. Например, показано, что свойствами ингибитора пренилтрансфераз обладают органическое серосодержащее соединение из чеснока (диаллилдисульфид) и глиотоксин из гриба (*Gliocladium fimbriatum*). Глиотоксин — это

серосодержащее соединение, которое ингибирует FT и GGT. Достаточно безопасный для нормальных клеток глиотоксин обладает выраженной противоопухолевой активностью в отношении клеточных линий лимфомы и карциномы молочной железы [10].

В последние годы создано множество синтетических низкомолекулярных ингибиторов FT. К ним относятся молекулы, которые конкурируют с субстратами, а именно, — с СааХ-мотивом и FPP, а также соединения, которые связывают необходимый для катализа цинк. Три молекулы — R115777 (типифарниб), SCH66336 (лонафарниб) и BMS214662 — уже проходят клинические испытания в качестве противоопухолевых препаратов [63]. Эти вещества проявили себя как сильные и селективные ингибиторы FT (активнее GGT1 более чем на три порядка). Высокая специфичность этих соединений, скорее всего, достигается благодаря селективному взаимодействию между веществом и ароматическими остатками сайта связывания FT. Более того, многие ингибиторы FT также активны и в отношении GGT, в том числе — пептидомиметик L-778,123, уже испытанный на больных терминальными солидными опухолями [64, 65]. Другой пример молекул с двойной специфичностью — это препараты, производимые фармацевтической компанией “Bristol-Myers Squibb”, а именно BMS1, BMS2, BMS3 и BMS4, которые ингибируют и FT и GGT-II. Эти соединения стимулируют апоптоз в результате подавления активности PGGT-II, а, следовательно, и функции Rab-белков [10].

Ингибиторы GGT-I разрабатывали, основываясь на С-концевой последовательности СААЛ-белков, подвергающихся геранилгеранилированию [66]. Замена центральной части дипептида на разные мостики приводит к образованию разных серий ингибиторов. Например, GGTI-2154 имеет 2-арил-1-4-аминобензойный кислотный мостик, а GGTI-2418 содержит пиперазиновый мостик. Ингибиторы GGT-I подавляют сигнальный каскад Rho, останавливают клеточный цикл в G0 и G1, а также индуцируют апоптоз.

Ингибиторы FT нашли новое применение в лечении малярии и африканской сонной болезни, вызываемых плазмодием (*Plasmodium falciparum*) и трипаносомой (*Trypanosoma brucei*) соответственно. Эти соединения цитотоксичны в отношении данных простейших [67]. В настоящее время серии тетрагидрохинонов, изначально разработанные компанией “Bristol-Myers Squibb” в качестве противораковых агентов, считаются наиболее перспективными именно как противомалярийные средства. В низких наномолярных концентрациях они уничтожают паразитов в культуре и способны вылечивать грызунов от малярии при пероральном введении [66]. Новейшие исследования по-

казали, что эффективность фозмидомидина обусловлена не только ингибированием цикла метилэритрол-4-фосфата у плазмодия, но также и подавлением синтеза мевалоната в клетках организма-хозяина [68].

Метотрексат — хорошо известный терапевтический агент — также клинически испытан как ингибитор ICMT. Этот препарат нарушает обмен фолиевой кислоты, тем самым ингибируя синтез пуринов и пиримидинов, вследствие чего прекращается синтез ДНК и РНК. Метотрексат способствует накоплению S-аденозилгомоцистеина, который подавляет активность многих клеточных метилтрансфераз. Ингибирование метилирования с помощью метотрексата приводит также к изменению клеточной локализации фарнезилированных белков, при этом в случае геранилгеранилированных белков такого эффекта не наблюдали [69]. Оказалось, что метотрексат непосредственно, хоть и неспецифично, ингибирует ICMT [69] и, таким образом, подавляет процесс фарнезилирования. Угнетение пренилирования может быть также достигнуто путем обработки клеток ингибиторами редуктазы HMG-CoA, к которым относятся гиполипидемические средства ловастатин, правастатин и симвастатин [70]. Именно поэтому профилактическое применение статинов приводит не только к снижению риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, но и к снижению риска развития многих опухолей [71].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, очевидно, что пренилирование — это важный процесс посттрансляционной модификации, вследствие которого пренилированные белки приобретают способность локализоваться в плазматической мембране и/или мембране органелл. Хорошо изученные пренилированные белки человека (например, Rac, Rho, Ras) играют ключевую роль в процессах клеточной дифференцировки, пролиферации, апоптоза и общего метаболизма. Изучение процесса пренилирования открыло новые перспективы в лечении некоторых тяжелых заболеваний, в том числе злокачественных новообразований.

При помощи биоинформатического анализа предсказан ряд бактериальных белков, которые могли бы подвергаться пренилированию в клетках хозяина. На данный момент, использование аппарата пренилирования хозяина экспериментально доказано лишь при исследовании двух белков, SifA сальмонеллы и AnkV легионеллы. Необходимо дальнейшее изучение механизмов пренилирования бактериальных белков в клетках хозяина, что позволит обнаружить новые мишени для терапевтического воздействия на болезни, вызываемые патогенными микроорганизмами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liang P.H., Ko T.P., Wang A.H. 2002. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem. FEBS*. **269**, 3339–3354.
2. Casey P.J. 1992. Biochemistry of protein prenylation. *J. Lipid Res.* **33**, 1731–1740.
3. Al-Quadan T., Price C.T., London N., Schueler-Furman O., AbuKwaik Y. 2011. Anchoring of bacterial effectors to host membranes through host-mediated lipidation by prenylation: a common paradigm. *Trends Microbiol.* **19**, 573–579.
4. Kamiya Y., Sakurai A., Tamura S., Takahashi N. 1978. Structure of rhodotorucine A, a novel lipopeptide, inducing mating tube formation in *Rhodospiridium toruloides*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **83**, 1077–1083.
5. Anderegg R.J., Betz R., Carr S.A., Crabb J.W., Duntze W. 1988. Structure of *Saccharomyces cerevisiae* mating hormone a-factor. Identification of S-farnesyl cysteine as a structural component. *J. Biol. Chem.* **263**, 18236–18240.
6. Gelb M.H., Scholten J.D., Sebolt-Leopold J.S. 1998. Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 40–48.
7. Zhang F.L., Casey P.J. 1996. Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 241–269.
8. Chan L.N., Hart C., Guo L., et al. 2009. A novel approach to tag and identify geranylgeranylated proteins. *Electrophoresis*. **30**, 3598–3606.
9. Wollack J.W., Zeliadt N.A., Mullen D.G., et al. 2009. Multifunctional prenylated peptides for live cell analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 7293–7303.
10. Gao J., Liao J., Yang G.Y. 2009. CAAX-box protein, prenylation process and carcinogenesis. *Am. J. Translat. Res.* **1**, 312–325.
11. Roberts P.J., Mitin N., Keller P.J., et al. 2008. Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J. Biol. Chem.* **283**, 5150–5163.
12. Kellogg B.A., Poulter C.D. 1997. Chain elongation in the isoprenoid biosynthetic pathway. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**, 570–578.
13. Ogura K., Koyama T. 1998. Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem. Rev.* **98**, 1263–1276.
14. Wolfe L.M., Mahaffey S.B., Kruh N.A., Dobos K.M. 2010. Proteomic definition of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Proteome Res.* **9**, 5816–5826.
15. Fujihashi M., Zhang Y.W., Higuchi Y., Li X.Y., et al. 2001. Crystal structure of cis-prenyl chain elongating enzyme, undecaprenyl diphosphate synthase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **98**, 4337–4342.
16. Ko T.P., Chen Y.K., Robinson H., et al. 2001. Mechanism of product chain length determination and the role of a flexible loop in *Escherichia coli* undecaprenylpyrophosphate synthase catalysis. *J. Biol. Chem.* **276**, 47474–47482.
17. 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.
18. Benetka W., Koranda M., Maurer-Stroh S., Pittner F., Eisenhaber F. 2006. Farnesylation or geranylgeranylation? Efficient assays for testing protein prenylation in vitro and in vivo. *BMC Bioch.* **7**, 6.
19. Roskoski R., Jr. 2003. Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **303**, 1–7.
20. Eisenhaber B., Eisenhaber F. 2010. Prediction of post-translational modification of proteins from their amino acid sequence. *Methods Mol. Biol.* **609**, 365–384.
21. Maurer-Stroh S., Eisenhaber F. 2005. Refinement and prediction of protein prenylation motifs. *Genome Biol.* **6**, R55.
22. Maurer-Stroh S., Koranda M., Benetka W., et al. 2007. Towards complete sets of farnesylated and geranylgeranylated proteins. *PLoS Comp. Biol.* **3**, e66.
23. Krzysiak A.J., Rawat D.S., Scott S.A., Pais J.E., Handley M., et al. 2007. Combinatorial modulation of protein prenylation. *ACS Chem. Biol.* **2**, 385–389.
24. Trueblood C.E., Ohya Y., Rine J. 1993. Genetic evidence for in vivo cross-specificity of the CaaX-box protein prenyltransferases farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4260–4275.
25. Navarro-Lerida I., Sanchez-Perales S., Calvo M., et al. 2012. A palmitoylation switch mechanism regulates Rac1 function and membrane organization. *EMBO J.* **31**, 534–551.
26. Novelli G., D'Apice M.R. 2012. Protein farnesylation and disease. *J. Inher. Metabol. Dis.* **35**, 917–926.
27. Al-Khodori S., Abu Kwaik Y. 2010. Triggering Ras signalling by intracellular *Francisella tularensis* through recruitment of PKC α and β 1 to the SOS2/GrB2 complex is essential for bacterial proliferation in the cytosol. *Cell. Microbiol.* **12**, 1604–1621.
28. Eastman R.T., Buckner F.S., Yokoyama K., Gelb M.H., van Voorhis W.C. 2006. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Fighting parasitic disease by blocking protein farnesylation. *J. Lipid Res.* **47**, 233–240.
29. De Smedt F., Boom A., Pesesse X., Schiffmann S. N., Erneux C. 1996. Post-translational modification of human brain type I inositol-1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase by farnesylation. *J. Biol.* **271**, 10419–10424.
30. Chakrabarti D., Da Silva T., Barger J., et al. 2002. Protein farnesyltransferase and protein prenylation in *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **277**, 42066–42073.
31. Yokoyama K., Lin Y., Stuart K.D., Gelb M.H. 1997. Prenylation of proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **87**, 61–69.
32. Yokoyama K., Trobridge P., Buckner F.S., et al. 1998. Protein farnesyltransferase from *Trypanosoma brucei*. A heterodimer of 61- and 65-kDa subunits as a new target for antiparasite therapeutics. *J. Biol. Chem.* **273**, 26497–26505.
33. Buckner F.S., Yokoyama K., Nguyen L., et al. 2000. Cloning, heterologous expression, and distinct substrate specificity of protein farnesyltransferase from *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **275**, 21870–21876.
34. Engelson E.J., Buckner F.S., Van Voorhis W.C. 2011. An essential farnesylated kinesin in *Trypanosoma brucei*. *PLoS One.* **6**, e26508.

35. Sorek N., Gutman O., Bar E., et al. 2011. Differential effects of prenylation and s-acylation on type I and II ROPS membrane interaction and function. *Plant Physiol.* **155**, 706–720.
36. Sohn H.Y., Son K.H., Kwon C.S., Kwon G.S., Kang S.S. 2004. Antimicrobial and cytotoxic activity of 18 prenylated flavonoids isolated from medicinal plants: *Morus alba* L., *Morus mongolica* Schneider, *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent, *Sophora flavescens* Ait and *Echinosophora koreensis* Nakai. *Phytomedicine: Int. J. phytotherapy phytopharmacology.* **11**, 666–672.
37. Mayaka R.K., Langat M.K., Omolo J.O., Cheplogoi P.K. 2012. Antimicrobial prenylated acetophenones from berries of *Harrisonia abyssinica*. *Planta Medica.* **78**, 383–386.
38. Price C.T., Jones S.C., Amundson K.E., Kwaik Y.A. 2010. Host-mediated post-translational prenylation of novel dot/icm-translocated effectors of *Legionella pneumophila*. *Frontiers microbiol.* **1**, 131.
39. Reinicke A.T., Hutchinson J.L., Magee A.I., et al. 2005. A *Salmonella typhimurium* effector protein SifA is modified by host cell prenylation and S-acylation machinery. *J. Biol. Chem.* **280**, 4620–4627.
40. Brumell J.H., Goosney D.L., Finlay B.B. 2002. SifA, a type III secreted effector of *Salmonella typhimurium*, directs *Salmonella*-induced filament (Sif) formation along microtubules. *Traffic.* **3**, 407–415.
41. Price C., Al-Quadan 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.
42. Al-Quadan T., Kwaik Y.A. 2011. Molecular characterization of exploitation of the polyubiquitination and farnesylation machineries of *Dictyostelium discoideum* by the AnkB F-box effector of *Legionella pneumophila*. *Frontiers Microbiol.* **2**, 23.
43. Al-Khodor S., Price C.T., Habyarimana F., Kalia A., Abu Kwaik Y. 2008. A Dot/Icm-translocated ankyrin protein of *Legionella pneumophila* is required for intracellular proliferation within human macrophages and protozoa. *Mol. Microbiol.* **70**, 908–923.
44. 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.
45. Al-Quadan T., Price C.T., Abu Kwaik Y. 2012. Exploitation of evolutionarily conserved amoeba and mammalian processes by *Legionella*. *Trends Microbiol.* **20**, 299–306.
46. Richards A.M., Von Dwingelo J.E., Price C.T., Abu Kwaik Y. 2013. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella*-amoeba interaction. *Virulence.* **4**(4), 00–00.
47. Asare R., Abu Kwaik Y. 2010. Molecular complexity orchestrates modulation of phagosome biogenesis and escape to the cytosol of macrophages by *Francisella tularensis*. *Environ.Microbiol.* **12**, 2559–2586.
48. Fujikura K., Maki Y., Ohya N., Satoh M., Koyama T. 2008. Kinetic studies of *Micrococcus luteus* B-P 26 undecaprenyl diphosphate synthase reaction using 3-desmethyl allylic substrate analogs. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **72**, 851–855.
49. Lytle C.A., Gan Y.D., Salone K., White D.C. 2001. Sensitive characterization of microbial ubiquinones from biofilms by electrospray/mass spectrometry. *Environ. Microbiol.* **3** 265–272.
50. Bonitz T., Alva V., Saleh O., Lupas A.N., Heide L. 2011. Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One.* **6**, e27336.
51. Metzger U., Keller S., Stevenson C.E., Heide L., Lawson D.M. 2010. Structure and mechanism of the magnesium-independent aromatic prenyltransferase CloQ from the chlorobiocin biosynthetic pathway. *J. Mol. Biol.* **404**, 611–626.
52. Sugiyama A., Linley P.J., Sasaki K., Kumano T., Yamamoto H., et al. 2011. Metabolic engineering for the production of prenylated polyphenols in transgenic legume plants using bacterial and plant prenyltransferases. *Metab. Eng.* **13**, 629–637.
53. Kumano T., Richard S.B., Noel J.P., Nishiyama M., Kuzuyama T. 2008. Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8117–8126.
54. Ozaki T., Mishima S., Nishiyama M., Kuzuyama T. 2009. NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J. Antibiot. (Tokyo).* **62**, 385–392.
55. Ozaki T., Nishiyama M., Kuzuyama T. 2013. Novel tryptophan metabolism by a potential gene cluster that is widely distributed among *Actinomycetes*. *J. Biol. Chem.* **288**, 9946–9956.
56. Horn M.P., Knecht S.M., Rushing F.L., et al. 2008. Simvastatin inhibits *Staphylococcus aureus* host cell invasion through modulation of isoprenoid intermediates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **326**, 135–143.
57. Vanhaesebroeck B., Waterfield M.D. 1999. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 239–254.
58. Tsuji F., Ishihara A., Kurata K., et al. 2012. Geranyl modification on the tryptophan residue of ComXRO-E-2 pheromone by a cell-free system. *FEBS Letters.* **586**, 174–179.
59. Tsuji F., Ishihara A., Nakagawa A., et al. 2012. Lack of the consensus sequence necessary for tryptophan prenylation in the ComX pheromone precursor. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 1492–1496.
60. Dumelin C.E., Chen Y., Leconte A.M., Chen Y.G., Liu D.R. 2012. Discovery and biological characterization of geranylated RNA in bacteria. *Nature Chem. Biol.* **8**, 913–919.
61. Benetka W., Koranda M., Eisenhaber F. 2006. Protein prenylation: an (almost) comprehensive overview on discovery history, enzymology, and significance in physiology and disease. *Monatsh. Chem.* **137**, 1241–1281.
62. Liang P.H. 2009. Reaction kinetics, catalytic mechanisms, conformational changes, and inhibitor design for prenyltransferases. *Biochemistry.* **48**, 6562–6570.

63. Appels N.M., Beijnen J.H., Schellens J.H. 2005. Development of farnesyl transferase inhibitors: a review. *Oncologist*. **10**, 565–578.
64. Britten C.D., Rowinsky E.K., Soignet S., et al. 2001. A phase I and pharmacological study of the farnesyl protein transferase inhibitor L-778,123 in patients with solid malignancies. *Clin. Cancer Res. Am. Ass. Cancer Res.* **7**, 3894–3903.
65. Reid T.S., Long S.B., Beese L.S. 2004. Crystallographic analysis reveals that anticancer clinical candidate L-778,123 inhibits protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase-I by different binding modes. *Biochemistry*. **43**, 9000–9008.
66. Gelb M.H., Brunsveld L., Hrycyna C.A., et al. 2006. Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nature Chem. Biol.* **2**, 518–528.
67. Hast M.A., Fletcher S., Cummings C.G., et al. 2009. Structural basis for binding and selectivity of antimalarial and anticancer ethylenediamine inhibitors to protein farnesyltransferase. *Chem. Biol.* **16**, 181–192.
68. Howe R., Kelly M., Jimah J., Hodge D., Odom A.R. 2013. Isoprenoid biosynthesis inhibition disrupts Rab5 localization and food vacuolar integrity in *Plasmodium falciparum*. *Eukaryotic cell*. **12**, 215–223.
69. Winter-Vann A.M., Kamen B.A., Bergo M.O., et al. 2003. Targeting Ras signaling through inhibition of carboxyl methylation: an unexpected property of methotrexate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 6529–6534.
70. Thurnher M., Nussbaumer O., Gruenbacher G. 2012. Novel aspects of mevalonate pathway inhibitors as anti-tumor agents. *Clin. Cancer Res. Am. Ass. Cancer Res.* **18**, 3524–3531.
71. Rice K.R., Koch M.O., Cheng L., Masterson T.A. 2012. Dyslipidemia, statins and prostate cancer. *Exp. Rev. Anticancer Therapy*. **12**, 981–990.