

综述

细菌效应蛋白对宿主细胞Rho小G蛋白 信号通路的调节作用

武艳鸿 李燕如 其格乐很 范丽菲*

(内蒙古大学生命科学学院, 呼和浩特 010021)

摘要 病原体细菌通过自身分泌系统分泌效应蛋白并注入宿主体内, 修饰宿主的信号转导系统, 破坏宿主细胞中天然免疫有关信号通路, 发挥毒性作用使宿主产生疾病。吞噬作用在天然免疫系统中发挥重要作用, 这个过程涉及肌动蛋白细胞骨架的重排。Rho(Ras homolog family)小G蛋白家族成员作为细胞骨架结构的重要调控蛋白可调节这一过程, 其相关信号通路成为细菌效应蛋白的作用靶点。细菌效应蛋白可以模仿Rho的调节因子破坏信号通路, 可以通过剪切Rho C-端的尾部结构使其从细胞膜解离并失去活性, 可以直接模仿Rho发挥调控功能, 可以影响Rho上游的调控事件影响其活性, 也可通过对Rho进行直接的翻译后修饰使其失活, 形成有利于细菌生存、繁殖、毒力释放的环境。由此导致的Rho信号通路功能紊乱使宿主产生智力缺陷、免疫功能障碍、癌症等多种疾病。

关键词 细菌效应蛋白; Rho; 小G蛋白; 细胞骨架; 天然免疫

Regulation of Rho GTPases Signaling Pathways by Bacterial Effectors in Host Cells

Wu Yanhong, Li Yanru, Qigelehen, Fan Lifei*

(School of Life Sciences, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

Abstract Bacterial virulence often relies on secreted effectors that modulate eukaryotic signal transduction. Pathogenic bacteria injects effectors into host cells by secretion systems, infecting and disrupting host innate immune defence. Phagocytosis, a process regulated by actin cytoskeletal rearrangements, plays an indispensable role in innate immune system. As a pivotal regulator of actin cytoskeleton, Rho GTPases are main targets of bacterial effectors. Bacterial effectors could act as a GEF or GAP towards a special Rho GTPase, inactive Rho GTPases by triggering the release of them from membrane by removing carboxyl tail, mimic Rho GTPases directly, act upstream of Rho GTPases, or direct posttranslational modification of Rho GTPases. All of these help

收稿日期: 2015-09-06 接受日期: 2015-11-30

内蒙古自然科学基金(批准号: 2013MS0505)、内蒙古大学高层次引进人才科研任务启动费(批准号: 30105-125128)、中国博士后科学基金第7批特别资助(批准号: 2014T10237)和内蒙古自治区高等学校科学研究项目(批准号: NJZY14005)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0471-4992971, E-mail: lifei.fan@imu.edu.cn

Received: September 6, 2015 Accepted: November 30, 2015

This work was supported by the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (Grant No.2013MS0505), Program of Higher-Level Talents of Inner Mongolia University (Grant No.30105-125128), China Postdoctoral Science Foundation Funded Project (Grant No.2014T10237) and Higher Scientific Research Project of Inner Mongolia Autonomous Region (Grant No.NJZY14005)

*Corresponding author. Tel: +86-471-4992971, E-mail: lifei.fan@imu.edu.cn

网络出版时间: 2016-02-22 16:59:08 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160222.1659.010.html>

to create a favourable environment for bacterial survival, replication, and releasing virulence factors. Dysfunction of Rho-regulated signaling pathways are implicated in severe human diseases, such as mental retardation, immunological disorders and cancers.

Keywords bacterial effectors; Rho GTPases; small molecular weight GTPase; cell cytoskeleton; innate immunity

致病细菌会产生不同的毒性效应因子, 可根据其进入宿主细胞方式不同分为两类, 一类是通过释放系统将细菌效应蛋白(effectors, 又称外在蛋白)注入到宿主细胞中, 另一类是细菌毒素(toxin, 又称外毒素)释放到细胞外, 与宿主细胞表面受体结合, 通过吞噬作用使毒素进入细胞内。一些革兰氏阴性致病菌包含有特殊的分泌系统如III型或IV型分泌系统(type III or IV secretion systems, TTSS or T4SS)可将效应蛋白注入宿主细胞中, 唯一的区别是, DNA只能通过IV型分泌系统运输。TTSS是一种多聚转运通道蛋白, 可以将效应蛋白注入到宿主细胞中, 研究认为, TTSS来源于细菌鞭毛运输系统^[1]。TTSS在革兰氏阴性菌中是高度保守的, 动物、植物和共生细菌的病原体都采用TTSS将效应蛋白运输到宿主细胞中。产生的效应蛋白在细菌中与伴侣结合, 处于失活状态, 通过TTSS进入宿主细胞后被激活, 可调节宿主免疫有关的信号通路, 破坏宿主细胞对其的吞噬作用。

宿主细胞面对病原体的侵染, 第一道防线是天然免疫系统, 通过识别病原体并激活巨噬细胞和树突细胞去吞噬并降解病原体。在吞噬过程中, 肌动蛋白细胞骨架发生变化, Rho家族调节这个过程^[2]。

天然免疫的激活也给获得性免疫传递信号, 获得性免疫系统的激活有利于进一步清除细菌。

Rho属于Ras小G蛋白超家族的一个亚家族成员, 到目前为止, 已发现了21个Rho家族成员, 这些Rho蛋白可以调节真核生物的多种生理功能。其中, 在Rho家族中RhoA(Ras homolog family member A)、Rac1(Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)、Cdc42(cell division cycle 42)控制着肌动蛋白细胞骨架动力学。具体而言, RhoA调节肌动蛋白/肌球蛋白应力纤维的形成和黏着斑的组织; Rac1主要涉及板状伪足和黏着斑复合体的形成^[3]; Cdc42控制丝状伪足或微突和黏着斑的形成^[4]。在肌动蛋白组织过程中, Rho GTPase通过激活下游效应信号因子, 特别是一些蛋白激酶以及肌动蛋白成核因子, 进而对细胞骨架结构进行调节。对细胞骨架的重要调控作用使Rho成为了细菌效应蛋白的主要作用靶点, 因为这些信号网络的失活可以阻止吞噬作用, 允许细菌在宿主体内生存。细菌效应蛋白可以模仿Rho的调节因子破坏信号通路[例如SopE(*Salmonella* outer protein E)和SptP(*Salmonella* protein tyrosine phosphatase)], 可以通过剪切Rho C-端的尾部结构使其从细胞膜解离并失去活性[例如YopT(*Yersinia* outer protein T)], 可

表1 细菌效应蛋白及其靶蛋白(根据参考文献[41]修改)

Table 1 Bacterial effectors and their targets (modified from reference [41])

病原体 Pathogen	效应蛋白 Effector	作用位点 Target	效应 Activity	分泌系统 Secretion system	参考文献 References
EPEC/EHEC O157:H7	Map	Rho GTPase	GEFs	III	[5]
<i>Vibrioparaahaemolyticus</i> 3	VopS	Rho GTPase	AMPylation	III	[6]
<i>Shiglla</i> spp.	IpgB2	Rac1, RhoA	GEFs	III	[7]
<i>Legionellapneumophila</i>	AnkX	Rab1b	Phosphocholination	IV	[8]
<i>Legionellapneumophila</i>	SidD	Rab1b	DeAMPylation	IV	[9]
<i>Legionellapneumophila</i>	DrrA/SidM	Rab1b	AMPylation, GEFs	IV	[10-11]
<i>Histophilussomni</i>	IbpA	Rho GTPase	AMPylation	III	[12]
<i>Yersinia</i> spp.	YpkA	Gαq, RhoGTPase	Ser/thr kinase, GDI	III	[13]
<i>Yersinia</i> spp.	YopT	Rho GTPase	Cysteine protease	III	[14]
<i>Yersinia</i> spp.	YopE	Rho-likeGTPase	GAPs	III	[15]
<i>Salmonella</i>	SopE	Cdc42, Rac1	GEFs	III	[16]
<i>Salmonella</i>	SptP	Rho GTPase	GAPs	III	[17]

EPEC: 致病性大肠杆菌; EHEC O157:H7: 肠出血性大肠杆菌。

EPEC: enteropathogenic *Escherichia coli*; EHEC O157:H7: enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157.

以直接模仿Rho发挥调控功能[例如Map(major acute phase protein)], 可以影响Rho上游的调控事件影响其活性[例如YpkA(yersinis protein kinase A), 也可通过对Rho进行直接的翻译后修饰使其失活[例如VopS(vibrio outer protein S)], 进而改变宿主肌动蛋白细胞骨架的调控过程(表1)。本文就细菌效应蛋白对宿主Rho介导的信号通路的调节作用作一综述。

1 细菌效应蛋白模仿Rho的调节因子

Rho可以在GTP结合的激活状态和GDP结合的失活状态之间转化, 这个循环过程是由鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)和GTP酶激活蛋白质(GTPase-activating proteins, GAPs)催化(图1)。核苷酸与Rho中两个区域(switch I和II)结合决定了构象的改变。这两个区域是下游效应信号分子激活结合和传递信号的关键结构域。

Salmonella III型分泌系统分泌的效应蛋白SopE、SopE2和SptP都可以模仿调节Rho GTPase辅助蛋白, 不可逆地调节Rho GTPase依赖的信号通路^[17]。SopE和SopE2是宿主细胞Cdc42的鸟嘌呤核苷酸交换因子。鸟嘌呤核苷酸交换实验和表面等离子体共振测量中^[16], SopE是Cdc42和Rac1有效的鸟嘌呤核苷酸交换因子, 然而, SopE2只能和Cdc42有效地作用。SopE和SopE2是同源蛋白, 发挥GEFs功能, 可单独结合并且激活Cdc42, 或者激活Cdc42和Rac1, 诱导细胞膜褶皱, 从而有利于细菌进入细胞。所有细胞的Rho家族特异性GEFs都含有一个保守的Dbl同源结构域(Dbl homology, DH), 这个结构域形成了这些分子催化活性的一部分, 结合到Rho的switch I和II区。SopE和SopE2可直接结合并激活宿主细胞Cdc42, 可催化鸟嘌呤核苷酸交换。生化分析显示, 区别于其他细菌毒素, SopE和SopE2可通过短暂的相互反应激活宿主细胞Rho家族, 而不是通过化学修饰。SopE和SopE2与DH家族蛋白序列相似度很低, 但是可作为GEFs。这些效应蛋白可与没有结合核苷酸的Rho形成二元复合物, 刺激核苷酸交换的速度。Buchwald等^[18]分析了SopE催化片段和Cdc42相互作用的X光晶体结构, 结果发现, SopE的结构完全不同于Dbl样Rho GEFs, 这揭示了SopE虽然与Dbl样蛋白家族在结构上完全不同, 但也可以作为GEFs。相反, 在*Salmonella*的SptP是作为Rho家族的GAPs, 可以与SopE或者SopE2诱导的信号通路相拮抗, 可以在病

原菌进入后, 恢复正常的细胞骨架结构。SptP-Rac1复合物晶体结构显示, 复合物尽管序列和结构不同于哺乳动物Rho-GAPs, 但SptP保留有关键的残基, 可诱发GAPs的GTP水解功能。

最近有研究指出, 缺乏SopE或者SopE2菌株中细菌的复制作用受到抑制, 回复突变可以逆转这种现象^[19]。效应蛋白不仅有辅助细菌进入宿主细胞的作用, 而且为细菌在宿主中的生存提供有利条件。

2 细菌效应蛋白对Rho进行剪切修饰(内切蛋白酶解修饰)

耶尔森氏菌属(*Yersinia*)使用TTSS将六种Yop效应蛋白(YopH、YpkA/YopO、YopE、YopT、YopJ和YopM)呈递到宿主细胞中, 这六种蛋白有不同的活性^[20]。这些效应蛋白作用的宿主靶蛋白均会参与一些关键的信号通路(例如G蛋白及其激酶), 因此作用模型是复杂多样的。这些效应蛋白的功能是破坏宿主免疫应答, 包括细胞骨架结构的改变、抑制噬菌体的清除、阻止细胞因子的产生, 还可以诱导凋亡。这些效应蛋白也可以干扰天然和获得性免疫应答, 因此可以帮助建立系统性感染。其中, 有三种效应蛋白(YopE、YopT、YpkA)作用于Rho, 并且可以改变在吞噬过程中的细胞骨架重排。

效应蛋白YopT可剪切Rho家族蛋白酶, 阻止Rho的GDP/GTP循环。YopT剪切N-末端异戊烯化半胱氨酸的RhoA、Rac和Cdc42, 被剪切后的GTPase成为香叶基香叶基半胱氨酸甲酯(geranylgeranyl cysteine methyl ester)^[21], 造成肌动蛋白细胞骨架破坏, 宿主细胞变圆。在酵母多拷贝抑制子SCREEN中观察发现, Cdc42可抑制YopT的毒性, 说明Cdc42是YopT的作用位点。在切割位点用放射性同位素标记的³⁵S Cys和¹⁴C Gly标记, 使用基质辅助激光解析电离(matrix assisted laser desorption/ionization, MALDI)分析, 结果显示, 在切割位点前的异戊烯化修饰的半胱氨酸可被准确切割^[14]。

实验表明, YopT可剪切结合GTP或GDP的RhoA, 说明该剪切过程不依赖于RhoA的构象。在体外, YopT特异性识别翻译后修饰的异戊烯化Rho。在体内的研究表明, YopT和RhoA的相互作用可以使RhoA失活, 使得定位于细胞膜上的RhoA从细胞膜中释放^[22]。双向蛋白质电泳显示, YopT的剪切位点在RhoA C-末端被修饰的半胱氨酸附近。C-末端

有CAAX盒子(C: 半胱氨酸残基; A: 脂肪族氨基酸残基; X: 任意氨基酸残基)的小G蛋白可被翻译后修饰, 其中, 异戊烯基转移酶可催化半胱氨酸, 使其异戊烯化^[23]。YopT可完全将Rho修饰的羧基移除而使其Rho失活。

对YopT结构的预测中, 发现YopT是一种半胱氨酸蛋白酶, 在蛋白质折叠中包含有三个关键的催化氨基酸残基 Cys139、His258 和 Asp174, 这三个催化残基(C/H/D)不变的位置和固定的二级结构决定了YopT是半胱氨酸蛋白酶“碳酸酐酶(carbonic anhydrase, CA)”家族的成员, YopT中半胱氨酸位于 α 螺旋的起始部分^[24]。

3 WxxxE模体效应蛋白模仿Rho的功能

最近的研究发现, 有些效应蛋白可直接模仿Rho调控下游信号应答^[7]。这些效应蛋白有Map、IpgB1、IpgB2和SifA(*Salmonella*-induced filament A), 它们的序列相似性很低, 但是都含有一个保守的WxxxE模体, 对于发挥其活性有重要作用。WxxxE模体位于C-末端, 可引起特异的信号应答, 其效应蛋白也被称为WxxxE效应蛋白^[25], 这些效应蛋白可模仿Rho。WxxxE效应蛋白产生的效应很多。Map可诱导丝状伪足的形成, 并且可模仿Cdc42诱导激活的细胞核内应答。IpgB1模仿RhoG, 诱导细胞膜褶皱的形成^[26]。IpgB2可以模仿RhoA, 体外ROCK实验证明, IpgB2直接可激活RhoA下游效应子ROCK(Rho coiled-coil p160 serine/threonine kinases), 破坏RhoA信号通路, 以诱导应力纤维产生^[7]。

SifA C-末端含有WxxxE模体, 与效应蛋白SopE结构一致, SopE是第一个被发现有GEF活性的细菌效应蛋白。对SopE结构进行解析发现, 这种蛋白由六个螺旋组成的, 其中三个螺旋构成一束, 两个束形成V字形结构, 一个小的 β 折叠连接着V的两个手臂, 有一段包含有GAGA模体的多肽。SopE与Cdc42的结合, 诱导switch区的改变, 这是由于GAGA模体插入到switch I和II之间, 产生的推拉型运动可诱导鸟嘌呤核苷酸的释放^[27], 这种作用机制和细胞中鸟嘌呤核苷酸交换因子将GDP交换为GTP的机制类似。具体而言, SopE可结合到含有GDP-Rho GTPase switch I和II上, 最终导致结合GDP的switch I和II构象重排, 使得GDP释放^[28]。随后, Rho GTPase与GTP相互作用, 导致GTP-Rho GTPase构象的改变, 使其处

于激活状态。SifA和SopE两者在催化环部分的结构是相同的, 但是目前在SifA中还没有发现核苷酸交换活性。Map效应蛋白与Cdc42复合体晶体结构中发现, 与SopE和SifA构象相似, 推测在Map中含有将GDP交换为GTP的催化活性。天然免疫无法清除存在于宿主细胞质中的微生物产物, 例如由致病微生物产生的效应蛋白。SopE可激活Rac1和Cdc42, 触发NOD1(nucleotide-binding oligomerization domain containing 1)信号通路, NOD1可以感知细胞质中微生物产物, 随之诱导PIP2(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate)介导的NF- κ B依赖的炎症反应发生。有关数据表明, 病原体诱导的Rho小G蛋白的激活可通过NOD1信号通路被宿主感知。哺乳动物可通过NOD1信号途径检测病原体^[29]。

有研究发现, Map可特异性地结合到没有核苷酸的Cdc42, 能够诱导GDP的释放或GTP的加入, 另外, 对Map和Cdc42复合体晶体结构解析发现, 有七个螺旋排列成了一个三螺旋束和一个四螺旋束, 形成了V型结构, 一个假定的催化环连接着两个V的手臂。这种结构与SopE结构相似, 尽管在序列上没有同源性, 但Map及SopE与Cdc42结合后构象是相似的, 说明这两者之间有相似的GEF催化机制。Map可与Cdc42中的switch I相互作用, 在Map催化环中的丙氨酸残基是与其疏水相关的, 谷氨酸残基与氢键的连接有关^[5]。

有研究发现, 在致肠病大肠杆菌(*enteropathogenic Escherichia coli*, EPEC)中的EspM(*Escherichia coli* secreted protein M)^[30]和EspT(*Escherichia coli* secreted protein T)^[31]也具有WxxxE模体。EspM与IpgB2功能相似, 可诱导依赖于ROCK的应力纤维的产生, 这个过程需要借助于激活的RhoA, 并且有实验表明, EspM可诱导RhoA激活。EspT的作用是诱导板状伪足的形成, 这与IpgB1相似, 并且可诱导细胞褶皱的形成, 利用不同机制可以同时激活Rac1和Cdc42。细胞褶皱的作用机制依赖于Rac1效应因子WAVE2(WASP/Verprolin homologous protein 2), WAVE2是一种肌动蛋白调节蛋白, 可调节细胞骨架重排。

4 细菌效应蛋白磷酸化Rho上游分子Gag

在耶尔森氏菌属(*Yersinia*)中, 发现由III型分泌系统分泌的效应蛋白YpkA有丝氨酸/苏氨酸激

酶(Ser/Thr kinase)活性,且在C-末端部分有类似宿主 Rho-GDI(Rho-guanine nucleotide dissociation inhibitor)的活性,定位于细胞膜内侧。YpkA的GDI活性部位可与Rho结合抑制核苷酸交换,改变激动蛋白纤维细胞骨架结构。有研究表明, YpkA的Ser/Thr激酶活性可有效地磷酸化Gαq(G q protein alpha subunit),使N-末端保守的Gα二磷酸结合的区域S47磷酸化,因此可以减少鸟苷酸结合,阻止Gαq的激活。Gαq是G蛋白家族中Gq家族成员,起作用的亚基是α,可激活磷脂酶C等下游效应信号因子。通过YpkA介导的Gαq磷酸化可以抑制多个下游信号通路。在应答细胞外物质时, Gαq可控制RhoA介导的肌动蛋白应力纤维, Gαq的失活可以使YpkA诱导的肌动蛋白纤维骨架改变,这种改变是不依赖于YpkA的Rho GDI活性的。因此, YpkA的C-末端Rho GDI结构域可直接作用于RhoA^[32]。

Pha等^[33]研究了YpkA信号传导机制,通过TTSS注入的YpkA可以结合并且磷酸化Gαq,抑制Gαq信号通路。为了确定YpkA中涉及与底物结合的残基,实验设计了一个N-末端缺失突变的GFP(green fluorescent protein)-YpkA,与底物进行免疫共沉淀实验。实验结果表明, YpkA的第40~49位氨基酸是底物结合结构域,在实验中, YpkA的第40~49位氨基酸的缺失可干扰底物结合,底物磷酸化和底物抑制。为了详细分析YpkA传导信号的机制,利用液相色谱与串联质谱分析,以绘制磷酸化位点。多个丝氨酸磷酸化位点、激酶结构域和YpkA的C-末端区域在分泌、转位过程中的作用被鉴定出来。利用位点突变技术得到了多个包含特异的丝氨酸到丙氨酸点突变的YpkA结构,结果显示,在N-末端的多个自磷酸化位点调节YpkA激酶活性。在YpkA多个位点的自磷酸化,可能是为了避免由宿主蛋白造成的毒性因子失活。

5 细菌效应蛋白对Rho的直接的翻译后修饰

一些效应蛋白还可以对Rho进行直接的翻译后修饰,目前报道的只有一种腺苷酰化修饰,即可在RhoA中第37位苏氨酸、Rac1和Cdc42中第35位苏氨酸羟基上特异性地添加一个腺苷一磷酸基团(AMP),这些苏氨酸都是switch I上的保守的氨基酸。一般而言,病原体使Rho失活是通过阻止其与

效应蛋白的结合, Rho GTPase在switch I区的氨基酸残基可交联体积较大的分子,是效应蛋白结合的部位^[34]。RhoA的第37位苏氨酸(Rac1和Cdc42的第35位苏氨酸)是效应蛋白修饰的主要氨基酸残基,从另一方面证明了这些氨基酸残基是Rho发挥作用的重要组成部分。VopS是来自于病原体副溶血孤菌(*Vibrio parahaemolyticus*)III型释放系统(TTSS)的效应蛋白,可以通过使Rho GTPase失活来调节宿主肌动蛋白骨架。VopS可在switch I保守的苏氨酸(RhoA中第37位苏氨酸, Rac1和Cdc42中第35位苏氨酸)羟基上特异性地添加一个腺苷一磷酸基团(AMP),使其失活。经预测, AMP的磷酸二酯键共价连接是可逆的。VopS包含有C-末端Fic结构域(cAMP诱导的丝状物),这个结构域对于其催化活性有重要作用。其活性依赖于在Fic结构域信号模体([HPFX(D/E)GN(G/K)R])上有一个保守的组氨酸^[6]。最新研究表明, VopS可抑制NF-κB信号途径的激活,腺苷酰化Rho会产生多种抑制效果,最明显的表型是肌动蛋白细胞骨架的破坏^[35]。

在呼吸系统致病菌嗜睡嗜组织菌(*Histophilus somni*)中发现,其释放的IbpA中Fic结构域也对Rho有腺苷酰化转移酶的活性^[12]。IbpA(immunoglobulin-binding protein A)在其C-末端包含有两个Fic结构域。与VopS相似, IbpA中Fic结构域更趋向于修饰Rho-GTP,并且这种酶的活性也依赖于信号模体中的组氨酸。IbpA与VopS不同的是,存在于IbpA中的一个Fic结构域可以腺苷酰化RhoA中第37位苏氨酸, Rac1和Cdc42中第35位苏氨酸。但是, AMP也可交联(cross-linked)到RhoA switch I区域另一个34位保守的酪氨酸残基。在RhoA中, Thr34和Thr37在switch I区是保守的, AMP修饰会阻碍Rho GTPase对下游信号分子的识别。对IbpA和VopS的晶体结构解析发现(图2和图3),两者有相似的螺旋Fic结构域折叠,尽管序列同源性的端点在[HPFX(D/E)GN(G/K)R]模体的外侧。IbpA Fic-Cdc42复合体结构反映了Cdc42连接区域I和II提供了和IbpA Fic2主要的相互作用表面^[36]。

在IbpA Fic2中,观察到switch II的疏水接触(hydrophobic contact)同样适用于VopS,因为在Cdc42连接II区的突变可以影响IbpA Fic2和VopS的腺苷酰化。更细致的晶体结构对比预测了IbpA Fic2和VopS采取不同的switch I区结合模式,这也就解释了为什么两种酶可以腺苷酰化switch I区不同的残基。晶体

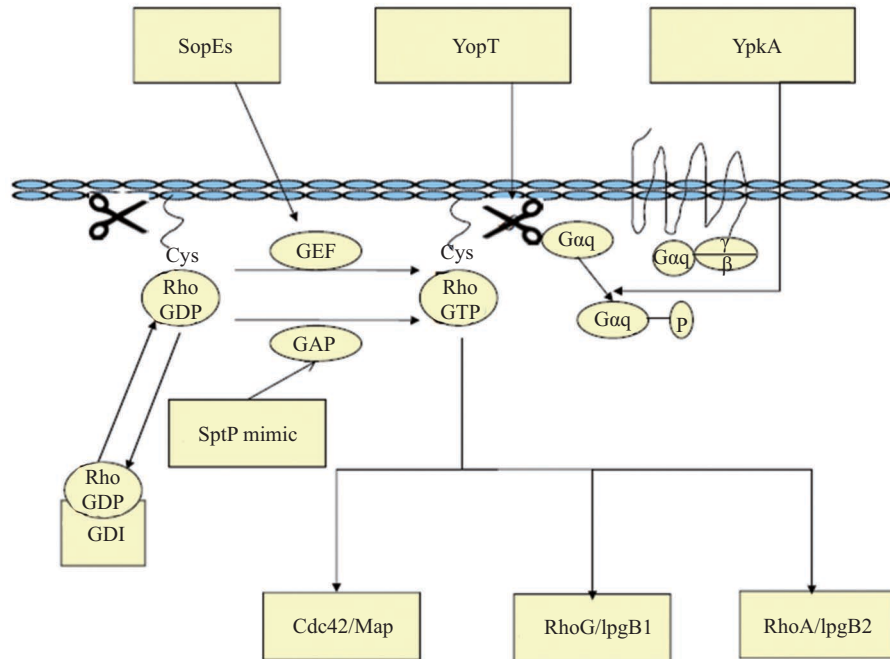
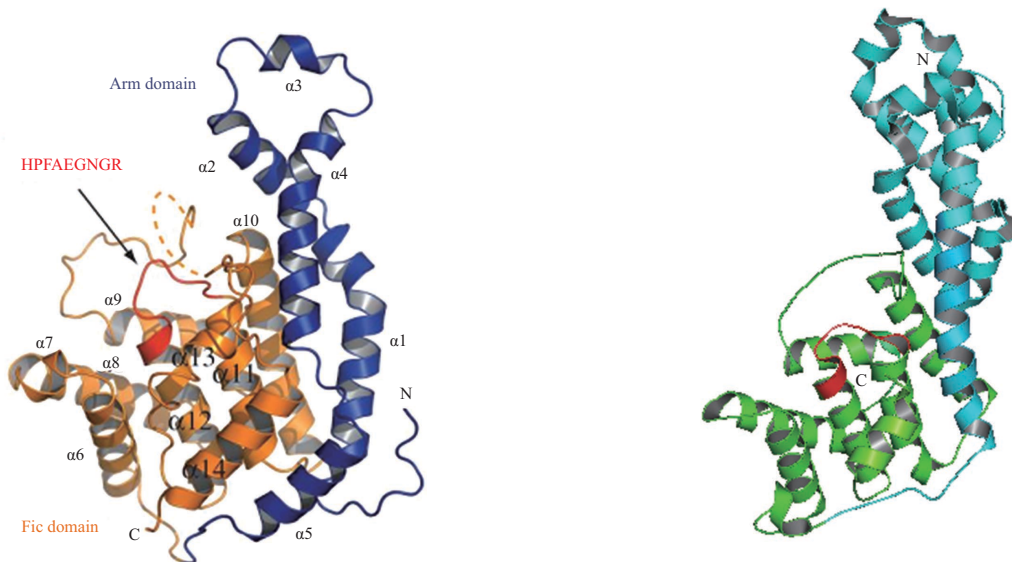


图1 效应蛋白对宿主Rho信号通路的调节作用(根据参考文献[42]修改)

Fig.1 Regulation of Rho GTPases signaling pathways by bacterial effectors (modified from reference [42])



N-末端螺旋模体包括手臂的结构域用蓝色表示。Fic结构域用橙色表示,红色表示HPFAEGNGR模体。二级结构元件和结构的N-末端和C-末端已在图中标记出。 α_9 和 α_{10} 环被破坏,图中用虚线表示。

The N-terminal helical motif including the arm domain is colored in blue. The Fic domain is colored in orange. The HPFAEGNGR motif is highlighted in red. Secondary structure elements and the N- and C-termini of the structure are labeled. Part of the α_9 and α_{10} loop is disordered and shown as dash lines.

图2 带状图形代表IbpA Fic2的结构(根据参考文献[36]修改)

Fig.2 Ribbon representation of IbpA Fic2 structure (modified from reference [36])

活性位点组氨酸被突变后, IbpA Fic2结构还可以捕获腺苷酰化反应中的终产物。这支持了研究人员提

出的酶作用机制,即Fic结构域催化腺苷酰化,在这个过程中,底物酪氨酸亲核攻击ATP- α 磷酸基团,在HPFX(D/E)GN(G/K)R模体中的组氨酸,可吸引酪氨酸中的质子以完成该过程^[37]。最近也有研究报道,另一个Fic结构域腺苷酰化转移酶的结构可以识别底物和ATP的 β 、 γ 磷酸基团的结合表面^[38]。

图中已标C-端、N-端。C-末端包含有绿色表示结构上保守的Fic模体, (HPFX(D/E)GN(G/K)R)残基用红色表示。

The C-terminal, N-terminal are labeled. The C-terminal conserved Fic domain is colored in green. The (HPFX(D/E)GN(G/K)R) is colored in red.

图3 VopS Fic结构域(根据参考文献[43]修改)

Fig.3 Fic domain of VopS (modified from reference [43])

出的酶作用机制,即Fic结构域催化腺苷酰化,在这个过程中,底物酪氨酸亲核攻击ATP- α 磷酸基团,在HPFX(D/E)GN(G/K)R模体中的组氨酸,可吸引酪氨酸中的质子以完成该过程^[37]。最近也有研究报道,另一个Fic结构域腺苷酰化转移酶的结构可以识别底物和ATP的 β 、 γ 磷酸基团的结合表面^[38]。

来源于果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 包含类似于Fic结构域的蛋白质在体外实验中显示, 有自腺苷酰化活性。由大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 噬菌体P1编码的蛋白质和丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 的AvrB (avirulence protein B) 中发现的两个其他结构域, 称为Doc, 均与Fic结构域在序列和结构上有同源性。Kinch等^[39]提出这些结构域和Fic结构域的统一性, 构成了一个功能结构域的超家族, 命名为Fido (Fic、Doc和AvrB)。目前尚待证明, Doc和AvrB是否也有腺苷酰化作用, 这种活性是否也是针对Rho的。

VopS修饰的苏氨酸也是艰难梭状芽胞杆菌 (*Clostridium difficile*) 毒素B的识别位点, 通过糖基化使Rho GTPase失活, 这也强调了在Rho信号通路中苏氨酸的重要性^[40]。在Cdc42中, IbpA Fic修饰的苏氨酸会使构象改变并允许腺苷酰化转移, 这也强调了在Rho GTPase中switch I构象的可塑性。在原核生物中, Fic结构域广泛存在, 可以推测在原核生物中存在大量腺苷酰化现象。

在嗜肺性军团病杆菌 (*Legionella pneumophila*) 中也发现, DrrA可对Rab1b switch II区域中酪氨酸 (Tyr) 残基腺苷酰化^[10]。但DrrA效应蛋白中不含有Fic结构域, 有类似细菌谷氨酰胺合成腺苷酰化转移酶 (glutamine-synthetase adenylyltransferase, GS-ATase) 活性, 这也是一种异于Fic蛋白质的腺苷酰化作用机制。

6 讨论与展望

病原体产生多种效应蛋白进入宿主细胞中调节Rho, 效应蛋白可对Rho信号通路进行多方位的调节。Rho作为分子开关, 其状态的改变可直接影响下游效应因子。细菌效应蛋白扰乱下游效应因子与Rho发生的相互作用, 破坏相关信号通路, 创造出有利于病原菌生存的环境。病原菌效应蛋白可模仿Rho的调节因子破坏信号通路; 或剪切、翻译修饰后的Rho, 使其失活; 也可以直接模仿宿主细胞中的Rho, 调节下游信号通路; 或磷酸化修饰信号通路中的Gαq, 间接对Rho进行调节; 或对Rho进行腺苷酰化等翻译后修饰。Rho不仅可以改变肌动蛋白细胞骨架, 还涉及与癌症有关的多方面的调控, 如细胞周期、细胞迁移、基因表达等。探明病原菌效应蛋白调节Rho的作用机制, 可以为治疗与Rho异常相关的

疾病提供一种新思路, 并且可通过联合用药对由病原体造成的疾病进行有效治疗, 以阻断病原菌效应蛋白对信号通路的破坏作用。病原菌效应蛋白也可以作为探明宿主细胞中信号通路的工具, 还可以使细胞中的信号通路相关蛋白失活或激活, 从而研究该蛋白质在信号通路中的作用及影响。

参考文献 (Reference)

- 1 Enninga J, Rosenshine I. Imaging the assembly, structure and activity of type III secretion systems. *Cell Microbiol* 2009; 11(10): 1462-70.
- 2 Aspenstrom P. The Rho GTPases have multiple effects on the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 1999; 246(1): 20-5.
- 3 Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; 70(3): 389-99.
- 4 Nobes CD, Hall A. Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; 81(1): 53-62.
- 5 Huang Z, Sutton SE, Wallenfang AJ, Orchard RC, Wu X, Feng Y, *et al.* Structural insights into host GTPase isoform selection by a family of bacterial GEF mimics. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(8): 853-60.
- 6 Yarbrough ML, Li Y, Kinch LN, Grishin NV, Ball HL, Orth K. AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science* 2009; 323(5911): 269-72.
- 7 Alto NM, Shao F, Lazar CS, Brost RL, Chua G, Mattoo S, *et al.* Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions. *Cell* 2006; 124(1): 133-45.
- 8 Pan X, Lührmann A, Satoh A, Laskowski-Arce MA, Roy CR. Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science* 2008; 320(5883): 1651-4.
- 9 Neunuebel MR, Chen Y, Gaspar AH, Backlund PS Jr, Yergey A, Machner MP. De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*. *Science* 2011; 333(6041): 453-6.
- 10 Müller MP, Peters H, Blümer J, Blankenfeldt W, Goody RS, Itzen A. The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b. *Science* 2010; 329(5994): 946-9.
- 11 Machner MP, Isberg RR. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation. *Science* 2007; 318(5852): 974-7.
- 12 Worby CA, Mattoo S, Kruger RP, Corbeil LB, Koller A, Mendez JC. *et al.* The fic domain: Regulation of cell signaling by adenylylation. *Mol Cell* 2009; 34(1): 93-103.
- 13 Dukuzumuremyi JM, Rosqvist R, Hallberg B, Akerström B, Wolf-Watz H, Schesser K. The *Yersinia* protein kinase A is a host factor inducible RhoA/Rac-binding virulence factor. *Biol Chem* 2000; 275(45): 35281-90.
- 14 Shao F, Vaccratsis PO, Bao Z, Bowers KE, Fierke CA, Dixon JE. Biochemical characterization of the *Yersinia* YopT protease:

- Cleavage site and recognition elements in Rho GTPases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(3): 904-9.
- 15 Black DS, Bliska JB. The RhoGAP activity of the *Yersinia* pseudotuberculosis cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol* 2000; 37(3): 515-27.
- 16 Friebe A, Ilchmann H, Aepfelbacher M, Ehrbar K, Machleidt W, Hardt WD. SopE and SopE2 from *Salmonella* typhimurium activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* 2001; 276(36): 34035-40.
- 17 Mattoo S, Lee YM, Dixon JE. Interactions of bacterial effector proteins with host proteins. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(4): 392-401.
- 18 Buchwald G, Friebe A, Galán JE, Hardt WD, Wittinghofer A, Scheffzek K. Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO J* 2002; 21(13): 3286-95.
- 19 Vonaesch P, Sellin ME, Cardini S, Singh V, Barthel M, Hardt WD. The *Salmonella* typhimurium effector protein SopE transiently localizes to the early SCV and contributes to intracellular replication. *Cell Microbiol* 2014; 16(12): 1723-35.
- 20 Shao F. Biochemical functions of *Yersinia* type III effectors. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11(1): 21-9.
- 21 Popoff MR. Bacterial factors exploit eukaryotic Rho GTPase signaling cascades to promote invasion and proliferation within their host. *Small GTPases* 2014; doi: 10.4161/sgtp.28209.
- 22 Seema M, Yvonne ML, Jack ED. Interactions of bacterial effector proteins with host proteins. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(4): 392-401.
- 23 Zumbihl R, Aepfelbacher M, Andor A, Jacobi CA, Ruckdeschel K, Rouot B, *et al.* The cytotoxin YopT of *Yersinia enterocolitica* induces modification and cellular redistribution of the small GTP-binding protein RhoA. *J Biol Chem* 1999; 274(41): 29289-93.
- 24 Schmidt G. *Yersinia enterocolitica* outer protein T (YopT). *Eur J Cell Biol* 2011; 90(11): 955-8.
- 25 Orchard RC, Alto NM. Mimicking GEFs: A common theme for bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 2012; 14(1): 10-8.
- 26 Handa Y, Suzuki M, Ohya K, Iwai H, Ishijima N, Koleske AJ, *et al.* Shigella IpgB1 promotes bacterial entry through the ELMO-Dock180 machinery. *Nat Cell Biol* 2007; 9(1): 121-8.
- 27 Buchwald G, Friebe A, Galan JE, Hardt WD, Wittinghofer A, Scheffzek K. Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO J* 2002; 21(36): 3286-95.
- 28 Bulgin R, Raymond B, Garnett JA, Frankel G, Crepin VF, Berger CN, *et al.* Bacterial guanine nucleotide exchange factors SopE-like and WxxxE effectors. *Infect Immun* 2010; 78(4): 1417-25.
- 29 Keestra AM, Winter MG, Auburger JJ, Frässle SP, Xavier MN, Winter SE, *et al.* Manipulation of small Rho GTPases is a pathogen-induced process detected by NOD1. *Nature* 2013; 496(7444): 233-7.
- 30 Arbeloa A, Bulgin RR, MacKenzie G, Shaw RK, Pallen MJ, Crepin VF, *et al.* Subversion of actin dynamics by EspM effectors of attaching and effacing bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 2008; 10(7): 1429-41.
- 31 Bulgin RR, Arbeloa A, Chung JC, Frankel G. EspT triggers formation of lamellipodia and membrane ruffles through activation of Rac-1 and Cdc42. *Cell Microbiol* 2009; 11(2): 217-29.
- 32 Navarro L, Koller A, Nordfelth R, Wolf-Watz H, Taylor S, Dixon JE. Identification of a molecular target for the *Yersinia* protein kinase A. *Mol Cell* 2007; 26(4): 465-77.
- 33 Pha K, Wright ME, Barr TM, Eigenheer RA, Navarro L. Regulation of *Yersinia* protein kinase A (YpkA) kinase activity by multisite autophosphorylation and identification of an N-terminal substrate-binding domain in YpkA. *J Biol Chem* 2014; 289(38): 26167-77.
- 34 Visvikis O, Maddugoda MP, Lemichez E. Direct modifications of Rho proteins: Deconstructing GTPase regulation. *J Biol Cell* 2010; 102(7): 377-89.
- 35 Woolery AR, Yu X, LaBaer J, Orth K. AMPylation of Rho GTPases subverts multiple host signaling processes. *J Biol Chem* 2014; 289(47): 32977-88.
- 36 Xiao J, Worby CA, Mattoo S, Sankaran B, Dixon JE. Structural basis of Fic-mediated adenylylation. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17(8): 1004-10.
- 37 Mattoo S, Durrant E, Chen MJ, Xiao J, Lazar CS, Manning G, *et al.* Comparative analysis of *Histophilus somni* immunoglobulin-binding protein A (IbpA) with other fic domain-containing enzymes reveals differences in substrate and nucleotide specificities. *J Biol Chem* 2011; 286(37): 32834-42.
- 38 Cui J, Shao F. Biochemistry and cell signaling taught by bacterial effectors. *Trends Biochem Sci* 2011; 36(10): 532-40.
- 39 Kinch LN, Yarbrough ML, Orth K, Grishin NV. Fido, a novel AMPylation domain common to fic, doc, and AvrB. *PLoS One* 2009; 4(6): e5818.
- 40 Aktories K, Barbieri JT. Bacterial cytotoxins: Targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(5): 397-410.
- 41 Alto NM, Orth K. Subversion of cell signaling by pathogens. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012; 4(9): a006114.
- 42 Aktories K, Barbieri JT. Bacterial cytotoxins: Targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* 2005; 3(5): 397-410.
- 43 Luong P, Kinch LN, Brautigam CA, Grishin NV, Tomchick DR, Orth K. Kinetic and structural insights into the mechanism of AMPylation by VopS Fic domain. *J Biol Chem* 2010; 285(26): 20155-63.