

病原菌效应蛋白翻译后修饰宿主免疫防御通路

张 丽 邵 峰*

(北京生命科学研究所, 北京 102206)

摘要 病原菌效应蛋白破坏宿主细胞的正常信号转导是病原菌和宿主相互作用的重要体现。效应蛋白往往具有独特的生化活性, 针对宿主细胞内与抗细菌感染相关的重要通路进行阻断。近年来, 在病原菌效应蛋白作用机制的研究中, 人们发现了几种由效应蛋白介导的全新的蛋白质翻译后修饰。OspF(outer Shigella protein F)效应蛋白家族具有磷酸化苏氨酸裂合酶活性, 通过“消去”修饰和失活宿主 MAPK 激酶。NleE(non-LEE encoded effector E)效应蛋白则通过半胱氨酸甲基化修饰来抑制感染诱导 NF- κ B 炎症通路的激活。NleB(non-LEE encoded effector B)蛋白抑制宿主的死亡信号通路, 则依赖于其 N-乙酰葡萄糖胺转移酶活性介导的对死亡结构域蛋白的精氨酸糖基化修饰。而 VopS(Vibrio outer protein S)和 IbpA(Immunoglobulin-binding protein A)等含有 Fic 结构域的蛋白, 则可以将 AMP 基团转移到 Rho 家族小 G 蛋白的保守苏氨酸或酪氨酸上, 导致小 G 蛋白的失活和肌动蛋白细胞骨架的紊乱, 从而引起细胞毒性。以上效应蛋白作用机制及生化活性的阐明, 有助于全方位了解病原菌的致病毒力机制, 也开辟了蛋白质翻译后修饰介导病原-宿主相互作用研究的新方向, 同时对真核生物的信号转导研究也具有重要指导意义。

关键词 病原菌, 三型分泌系统, 效应蛋白, 翻译后修饰, 天然免疫, 信号转导

学科分类号 Q51, Q93

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00236

许多病原菌在感染时都会通过特殊的分泌系统(如三型、四型分泌系统)将一系列毒力蛋白注入到宿主细胞内。这类毒力蛋白, 也被称作效应蛋白(effector), 通常对宿主细胞内正常的信号转导起到非常精致的操纵, 从而破坏宿主细胞的正常功能, 促进病菌自身的感染和增殖^[1]。由于抗感染功能的需求, 效应蛋白往往对宿主细胞的某些信号通路有一定的偏好性。病原菌感染时, 位于细胞膜上的 TLR 受体(toll-like receptor)识别病原体相关分子模式后, 会通过一系列的信号转导来激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)以及 NF- κ B(nuclear factor- κ B)信号通路, 从而启动下游抗感染相关基因和炎症因子的转录。细胞死亡信号通路则在限制病原菌增殖、扩大炎症反应的过程中起着十分重要的作用。近年来的研究显示, 病原菌在与宿主相互作用的进化过程中产生了多种不同的、独特的活性来修饰和抑制上述宿主天然免疫的重要通路。另外, 利用效应蛋白来操控 Rho 家族小 G 蛋白信号通路, 从而破坏宿主细胞的肌动

蛋白细胞骨架系统和抑制宿主细胞对病原菌的吞噬作用, 也在病原菌感染和宿主细胞相互作用中常见。

效应蛋白在实现上述功能时, 通常是借助于其强大和特异的酶学活性来改变宿主信号通路中重要蛋白质的结构和功能, 从而使宿主无法通过正常的信号转导来对抗病原菌的入侵和实现对病原菌的有效清除。因此对效应蛋白作用机制的深入研究, 不仅可以帮助我们深入理解病原菌效应蛋白的毒力作用机制, 同时也可以提供另一个独特的角度去解读宿主细胞的信号转导。而最近几年以来, 研究者发现几种病原菌效应蛋白通过介导新颖的蛋白质翻译后修饰来发挥重要功能, 这些发现不仅增加了蛋白质翻译后修饰的多样性, 同时对其机制的深入研究也将会指导对真核生物信号转导调控的研究, 具有潜在的生物医药开发价值。

* 通讯联系人。

Tel: 010-80726688-8560, Fax: 010-80728046, E-mail: shaofeng@nibs.ac.cn

收稿日期: 2014-08-10, 接受日期: 2014-09-09

1 效应蛋白对天然免疫通路的翻译后修饰和功能阻断

MAPK 和 NF- κ B 是拮抗病原菌感染的重要信号通路^[2-3]. 这两条信号通路都可以将细胞外的信号通过胞内的激酶级联反应转化为细胞核内相应转录因子的激活, 从而调控下游基因的转录, 对抗病原微生物的感染. MAPK 信号通路在植物拮抗病原菌感染的过程中也起到重要作用. 哺乳动物中的 MAPK 包括 p38、JNK 和 Erk, 是一类丝氨酸/苏氨酸激酶. 这条信号通路主要由以下三个层面的激酶组成: MAPKKK(MAPK kinase kinase)、MAPKK(MAPK kinase)以及 MAPK. MAPK 的激活, 依赖于 MAPKK 对其 activation loop 中保守的 T-X-Y 模式(T 为苏氨酸, Y 是酪氨酸, X 则为任意氨基酸; 在 Erk 分子中, X 为谷氨酸, 在 p38 中则为甘氨酸, 在 JNK 中为脯氨酸)进行苏氨酸和酪氨酸的特异性双磷酸化(dual phosphorylation)^[4]. 而 MAPK 磷酸酶(MKP)则可以使 MAPK 去磷酸化, 从而负调控 MAPK 信号通路.

OspF 家族效应蛋白包括 OspF、SpvC、HopAI1 等三型分泌系统效应蛋白, 分别来自于志贺氏菌、沙门氏菌以及植物病原菌丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*). 此家族的效应蛋白具有独特的磷酸化苏氨酸裂合酶(phosphothreonine lyase)

活性, 能够不可逆地“去磷酸化”MAPK 激酶来使之失活, 从而抑制 MAPK 激酶通路的激活^[5-6](图 1). 虽然同样是“去磷酸化”修饰, OspF 家族的作用机理与传统的磷酸酶相比有本质上的区别.

a. OspF 催化的是 β 消去反应. 在反应发生时, 主链 α 质子离去的同时, 磷酸化苏氨酸侧链中的 C—OP 键同时发生断裂. 最终, 苏氨酸残基中的 α 和 β 碳之间形成不饱和双键, 转变为 β 甲基脱氢丙氨酸(β -methyldehydroalanine)(图 1). 与之不同的是, 传统的磷酸酶催化磷酸基团的水解反应, 不产生双键结构. b. 磷酸酶导致的去磷酸化是可逆反应, MAPK 还可以再次被上游激酶磷酸化; 而 OspF 催化的“去磷酸化”是不可逆反应, 去磷酸化后的 MAPK 无法再被相应的激酶磷酸化, 这对病原菌以最有效的方式阻断宿主的防御信号通路显然也更为有利. c. 以 SpvC 为代表, OspF 家族的效应蛋白的三维结构与磷酸酶没有任何相似性^[7-8]. 但有意思的是, 在 OspF 等分子的 N 端含有一个经典的 D 模式(D-motif)^[7], 该模式在 MAPK 的底物、上游激活分子以及调控蛋白等中广泛存在, 用于特异性识别 MAPK 底物. 因此, OspF 家族的效应蛋白一方面具有全新的失活 MAPK 的磷酸化苏氨酸裂合酶活性, 另一方面也模拟了宿主细胞内保守的 MAPK 识别模式, 来特异地锚定底物. 这也是病原菌与宿主长期斗争、共同进化的结果. 在

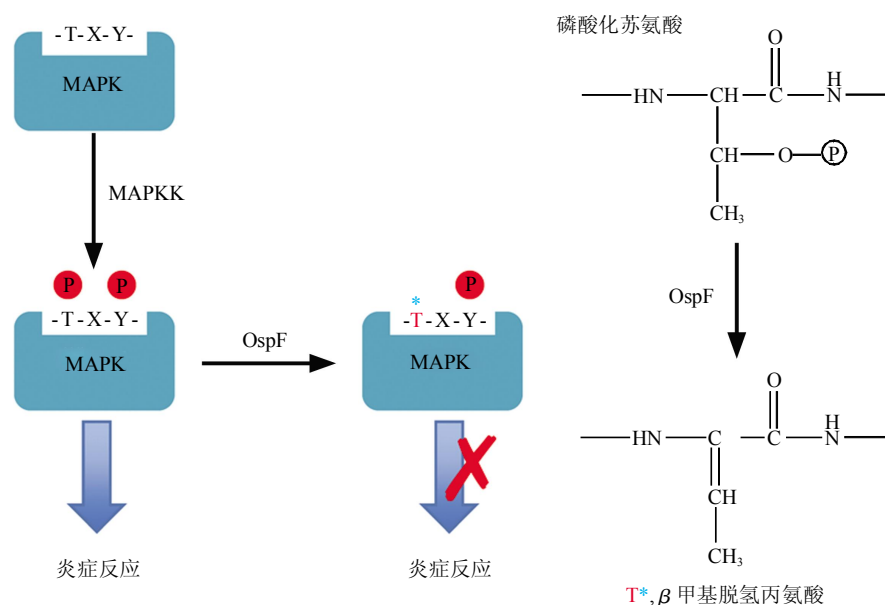


Fig. 1 The *Shigella* OspF effector "dephosphorylates" and inactivates host MAPK by "eliminylation" modification

图 1 痢疾杆菌 OspF 效应蛋白通过“消去”修饰“去磷酸化”MAPK, 抑制该通路激活

催化机制上, OspF 家族效应蛋白是通过广义酸碱 (general acid-base) 的机制发挥磷酸化苏氨酸裂合酶活性, 其中一个保守的赖氨酸作为催化碱来起始催化过程, 而另一个保守的组氨酸则作为催化酸来稳定反应过渡态并参与实现磷酸基团的离去^[7]。

晶体结构的研究显示, SpvC 分子由独特的 α/β 折叠构成, 整个分子类似杯状^[7-8]。蛋白的凹面处富含带正电荷的氨基酸, 利于结合磷酸化的底物。SpvC 与磷酸化多肽底物复合物的结构显示, 通过对磷酸化酪氨酸以及磷酸化苏氨酸的磷酸基团的特异性识别, 磷酸化苏氨酸能够被正确定位到酶的反应中心, 便于反应的发生。在识别、定位的过程中, pT-X-pY 的构象会发生较大变化。因此, X 残基的不同也导致 SpvC 等对三种 MAPK 激酶底物表现出不同效率的催化活性, 且此活性的高低正好与 X 的柔性大小相匹配, 进而也解释了为什么 p38 是 OspF 和 SpvC 最合适的底物和宿主靶蛋白^[7]。

OspF 家族效应蛋白是第一种被报道的磷酸化苏氨酸裂合酶。已知的酶学反应中, 仅有来自细菌和植物的苏氨酸合成酶 (threonine synthase, EC 4.2.3.1) 催化的反应与 OspF 等类似。苏氨酸合成酶催化由 O-磷酸高丝氨酸 (O-phospho-L-homoserine, OPH) 到苏氨酸的转化, 在此过程中会形成 β 碳和 γ 碳之间通过双键相连的中间产物^[9]。苏氨酸合成酶需要吡哆醛磷酸盐 (pyridoxal-5'-phosphate, PLP) 作为催化辅基。此外, 来自乳酸菌的羊毛硫抗生素合成酶 (lantibiotic synthetase) 催化了与 OspF 等更为类似的反应。研究显示, 羊毛硫抗生素合成酶具有双重酶活性, 先将丝氨酸或苏氨酸磷酸化, 然后再通过 β 消去反应的方式引入双键, 生成脱氢丙氨酸 (dehydroalanine) 或 β 甲基脱氢丙氨酸^[10]。经典的羊毛硫抗生素合成酶不需要 PLP 作为辅因子, 序列上和 OspF 家族也没有同源性。但最近研究中, 基于 OspF/SpvC 的同源序列搜索却发现了一类新型的羊毛硫抗生素合成酶, 采用 OspF/SpvC 类似的机制催化抗生素前体多肽中丝氨酸或苏氨酸的消去反应^[11-12]。因此, 关于 OspF 家族效应蛋白的研究也为这方面的研究提供了有益的指导。

除了 MAPK 信号通路以外, NF- κ B 信号通路也在抗感染过程中发挥重要作用。NF- κ B 通路的激活依赖于从细胞膜到细胞核内的一系列级联反应, 在这一过程中, 不同连接形式的泛素链起着重要作用 (图 2a)。例如, K48 连接的泛素链使 I κ B (inhibitor of NF- κ B) 被 26S 蛋白酶体所降解, 从而释放

NF- κ B 转录因子进入细胞核内, 激活下游基因的转录。K63 连接的泛素链则由 TRAF6 等蛋白催化产生, 起到调节信号转导的作用。位于 TAK1 激酶复合物中的 2 个接头蛋白 TAB2 和 TAB3 能够分别通过自身 C 端的锌指结构域结合 K63 连接的泛素链, 介导 TAK1 通过自磷酸化的方式激活^[13]。激活后的 TAK1 激酶则可以磷酸化 IKK, 进而导致 I κ B 发生磷酸化和后续的泛素化降解。

正因为 NF- κ B 通路的重要作用, 它也是许多病原菌效应蛋白作用的热点。肠致病性大肠杆菌 (EPEC) 的三型分泌系统效应蛋白 NleE 被发现可以在感染时抑制 NF- κ B 信号通路的激活。NleE 效应蛋白在众多肠致病菌都高度保守, 包括肠出血性大肠杆菌、鼠类柠檬酸杆菌、志贺氏杆菌以及部分沙门氏菌。最近的研究发现, NleE 是一类新颖的 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl-L-methionine, SAM) 依赖的甲基转移酶, 能够特异性地修饰 TAB2/3 锌指结构域中一个螯合锌离子的半胱氨酸残基 (图 2b)。这一甲基化修饰使得锌指结构域失去锌离子, 从而无法结合来自上游的泛素链信号, 并最终导致 NF- κ B 信号通路被病原菌抑制^[14]。NleE 效应蛋白中不含有任何已知的结构域, 它也并不与已知甲基转移酶有序列相似性。与 OspF 类似, NleE 也与其底物上修饰位点之外的区域有相互作用^[14], 这一结合可能会帮助 NleE 甲基转移酶更好地识别和定位其底物。而在底物 TAB2/3 的锌指结构域中, 4 个半胱氨酸共同螯合 1 个锌离子, 导致半胱氨酸巯基的电负性增加, 能够对甲基供体 SAM 进行 S_N2 类型的亲核进攻。以上原因使得 NleE 能够高效地修饰 TAB2/3。

在真核生物中, 甲基化修饰是一种重要的翻译后修饰, 在染色体重塑和基因沉默等方面发挥重要作用。关于组蛋白精氨酸和赖氨酸甲基化修饰的大量研究已经对其机制和功能有了深入而广泛的理解。而关于巯基 (thiol) 甲基化的研究则仅见两例报道。当大肠杆菌的基因组 DNA 受到甲基化试剂损伤时, Ada 蛋白可以将 DNA 上的甲基转移到其自身的半胱氨酸上, 从而帮助损伤修复 DNA, 但同时也导致 Ada 蛋白的失活^[15-16]。因此, Ada 蛋白上发生的半胱氨酸甲基化为非酶学反应, Ada 蛋白也被称为 sacrificial DNA 修复蛋白。另外, 在高半胱氨酸代谢以及甲硫氨酸等小分子的生物合成过程中, 高半胱氨酸的巯基也可以被半胱氨酸-S-甲基转移酶 (homocysteine-S-methyltransferase, BHMT)^[17]

或甲硫氨酸合成酶(methionine synthases)^[18]甲基化。对 NleE 的研究则是首次报道酶促发生的半胱氨酸甲基化作为一种新的蛋白质翻译后修饰在调节信号转导中起关键作用。在这三类巯基甲基化反应中, 甲基的受体都是参与螯合锌离子的半胱氨酸。4 个

半胱氨酸(有时也有组氨酸参与)通过其巯基共同螯合 1 个锌离子形成锌指结构, 而锌离子的存在则增加了巯基的电负性, 使其能够对甲基供体进行亲核进攻, 导致巯基甲基化反应的发生^[19]。

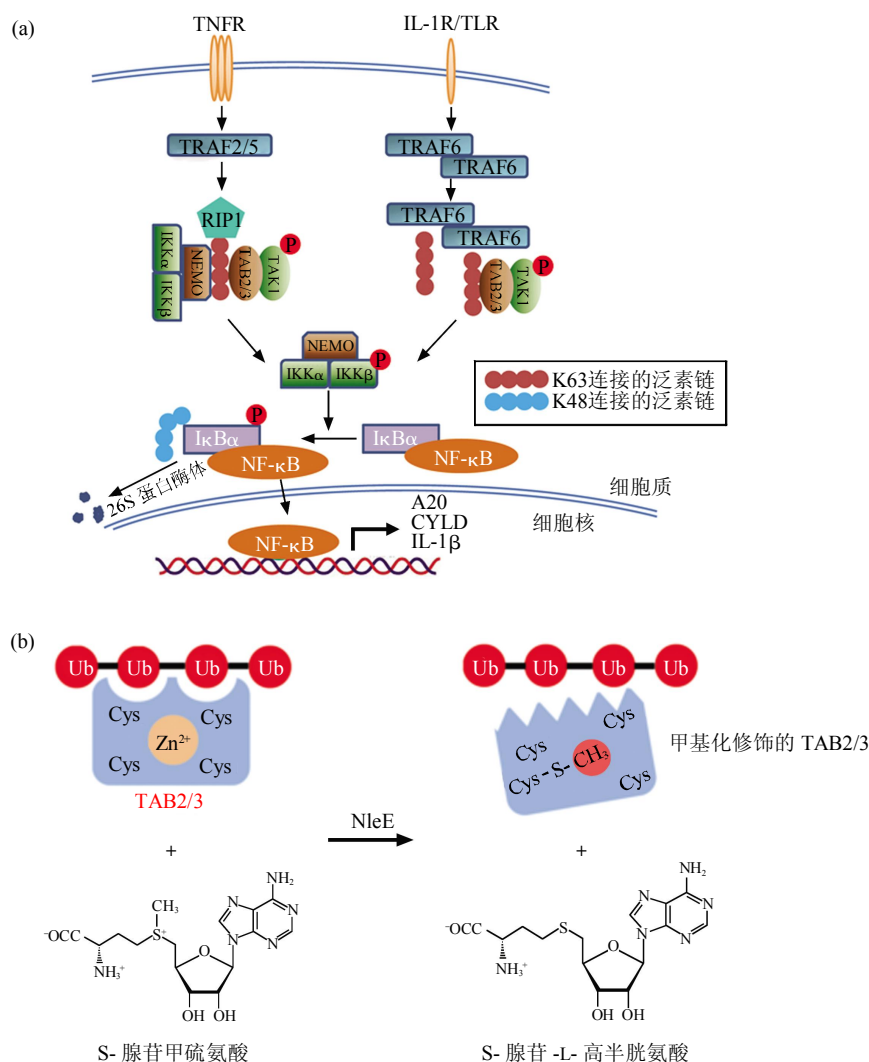


Fig. 2 The NleE effector modifies TAB2/3 by cysteine methylation and inhibits NF-κB pathway activation

图 2 NleE 效应蛋白半胱氨酸甲基化修饰 TAB2/3, 抑制 NF-κB 信号通路激活

真核生物中大量存在着含有锌指结构的蛋白, 以人为例, 有超过 15 000 个 TFⅢA 类型的经典锌指结构存在于大约 1 000 种蛋白中。而除了 TFⅢA 类型的经典锌指结构域外, 还有其他约 20 种非经典的锌指结构(共同特点是都能结合锌离子)。不同的锌指结构在蛋白质中发挥不同的功能, 包括对 DNA/RNA 的识别和结合, 蛋白质与蛋白质的相互作用, 乃至蛋白质与脂类的结合。因此, 锌指结构

的调控对于维持细胞的正常功能非常重要。除了 TAB2/3, NleE 也对 Vps36 蛋白中类似的锌指结构域有较强的修饰活性^[14]。这一方面说明锌指结构域自身的某些特点可能决定了是否与 NleE 的催化部位相匹配, 从而决定其能否被修饰; 另一方面, 来自不同信号通路的多个蛋白都能够成为半胱氨酸甲基化修饰的底物, 说明真核生物中的锌指蛋白极可能也可以发生类似的甲基化修饰, 并以此作为调节

信号转导的一种重要方式。

2 效应蛋白通过精氨酸 N-乙酰葡萄糖胺化修饰抑制宿主死亡信号通路

病原菌的感染往往会引起宿主的炎症反应, 而伴随着炎症反应的发生, 可能还会出现宿主细胞的程序性死亡, 从而帮助清除被感染的细胞。对于某些肠道致病菌而言, 抑制宿主细胞的程序性死亡, 一方面有利于细菌在肠道表面的附着和增殖, 另一方面则可以限制炎症反应的扩大, 帮助细菌逃逸宿主免疫系统的攻击^[20]。宿主细胞的死亡信号通路包

括定位于细胞膜上的死亡受体、细胞内的接头蛋白以及下游的 caspase 等。死亡受体则包括 TNFR1、FAS(TNFRSF6)、TRAIL(TNF-associated apoptosis-inducing ligand)受体(即 DR4 和 DR5)等, 它们的共同特点是都是跨膜蛋白并且细胞质一端含有死亡结构域(death domain, DD)^[21]。死亡配体结合引起死亡受体胞内段死亡结构域发生寡聚, 从而通过与细胞内含有死亡结构域的接头蛋白(如 FADD、TRADD 等)的结合可以进一步招募和激活 caspase-8。Caspase-8 的自剪切激活则直接导致下游的死亡信号通路的开启^[22-23](图 3)。

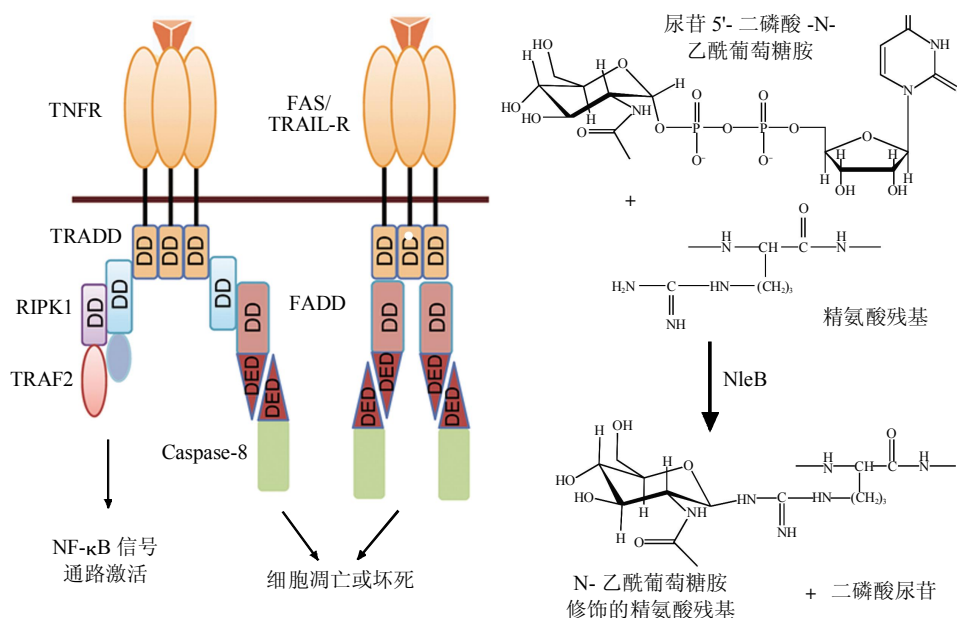


Fig. 3 The NleB effector harbors a GlcNAc transferase activity that modifies a conserved arginine in the death domain, resulting in inhibition of death receptor-mediated host cell death

图 3 NleB 效应蛋白具有 N-乙酰葡萄糖胺转移酶活性, 催化死亡结构域中一个保守的精氨酸发生乙酰葡萄糖胺化修饰, 从而抑制宿主细胞死亡受体信号通路

来自肠致病性大肠杆菌(EPEC)的三型分泌系统效应蛋白 NleB, 不仅可以抑制 TNF α (肿瘤坏死因子)引起的 NF- κ B 信号通路激活, 更为重要的是, 它还可以抑制 TNF α 、TRAIL 以及 FasL (Fas ligand)等多种死亡配体所引起的细胞凋亡或坏死^[24-25]。这一功能依赖于 NleB 全新的糖基转移酶活性。NleB 以尿苷 5'-二磷酸-N-乙酰葡萄糖胺(uridine diphosphate N-acetylglucosamine, UDP-GlcNAc)为辅酶, 特异性地对死亡受体下游的 TRADD、FADD 和 RIPK1 等多个接头蛋白死亡结构域中的一个保守精氨酸进行 N-乙酰葡萄糖胺

(N-acetyl-D-glucosamine, GlcNAc)化修饰(图 3)。死亡结构域多由 6 个螺旋形成束状结构, 其中 NleB 所修饰的精氨酸则位于第二个螺旋, 该螺旋参与形成了死亡结构域相互作用的两个界面。NleB 所介导的修饰则相应地破坏了死亡结构域之间同种或异种寡聚相互作用, 阻断死亡结构域介导的 DISC(death inducing signaling complex)复合体的形成, 从而抑制 TNF α 、FasL 和 TRAIL 等死亡受体配体诱导宿主细胞发生凋亡和坏死^[24-25]。在小鼠感染的实验中, NleB 糖基转移酶活性的缺失会导致细菌不能在肠道中有效定殖。

人基因组编码 34 个死亡结构域蛋白, 其中 1/3 都含有该保守精氨酸, 它们多在 TNFR1、FAS 和 TRAIL-R 等死亡受体通路中起重要功能. 细菌感染和体外的生物化学实验显示, NleB 可以高效地修饰 TRADD、FADD 和 RIPK1 在内的接头蛋白, 很弱地修饰 TNFR1 和 FAS 等死亡受体本身, 但不能修饰不含有保守精氨酸的死亡结构域蛋白, 如 Myd88 和 IRAK1 等^[24]. 有意思的是, NleB 对 FAS 的修饰位点正是在自身免疫性淋巴细胞增生综合征 (ALPS) 中有高频率突变的位点^[26].

蛋白质的 N-乙酰葡萄糖胺化修饰已知主要分为两类. 一类以 N-连接的方式发生在天冬酰胺残基上, 这种修饰主要以寡糖形式发生, 主要在内质网内完成; 而另一种 O-连接的单糖修饰直到 20 世纪 80 年代才被发现, 这种修饰以前一直被认为只发生在丝氨酸/苏氨酸上, 这种 O-连接的 N-乙酰葡萄糖胺修饰从细菌到人都保守, 已有超过 1 000 种蛋白被发现存在这种修饰. 该修饰被认为和蛋白质磷酸化类似, 在调节细胞信号转导中起重要作用^[27]. 此前对这种修饰的鉴定也都基于 O-连接的假设. 鉴于 NleB 的新颖活性和作用机制, 这项研究也暗示精氨酸 N-乙酰葡萄糖胺化这种新型蛋白质翻译后修饰可能广泛存在, 在调节信号转导中发挥重要作用.

3 效应蛋白通过腺苷酰化修饰失活 Rho 家族小 G 蛋白

细胞骨架系统对于拮抗病原菌感染起着重要作用. 细胞骨架系统以及细胞膜组分等参与形成的上皮细胞屏障 (epithelial barrier) 以及内皮细胞屏障 (endothelial barrier), 可以限制病原菌的自由进入或扩散^[28]. 同时, 免疫相关细胞等迁移到感染处, 并通过细胞吞噬作用清除病原菌、递呈抗原, 也都需要有正常功能的细胞骨架系统的参与. 因此, 通过效应蛋白或者毒素来破坏细胞骨架系统, 便成为病原菌侵染宿主时的高效策略. 细胞骨架系统通常处于高度动态的平衡之中. Rho 家族的小 G 蛋白 (small GTPase) 则是肌动蛋白细胞骨架动态网络图中的重要节点^[29]. 例如, Rho 蛋白的激活, 会导致应力纤维 (stress fiber) 和黏着斑复合体 (focal adhesion complex) 的组装^[30]. 因此, 细菌效应蛋白通过对 Rho 家族小 G 蛋白的操纵, 则可以起到“牵一发而动全身”的效果, 既经济又高效. 目前已知病原菌效应蛋白对 Rho 家族小 G 蛋白的操纵

主要有两类. 第一类包括类似 GEF (guanine nucleotide exchange factor) 的激活作用和类似 GAP (GTPase-activating protein) 的失活作用, 二者都是非共价的作用方式; 第二类则是共价修饰, 种类繁多, 包括 ADP-核糖基化作用 (ADP-ribosylation)、糖基化 (因为所用糖基的不同, 也分为很多种)、脱氨 (deamidation)、转谷氨酰胺作用 (transglutamination)、蛋白水解作用 (proteolysis)、腺苷酰化作用 (adenylation, 也被称为 AMPylation) 等^[28]. 本文则主要介绍近年来新发现的细菌效应蛋白利用腺苷酰化作用来特异失活 Rho 家族小 G 蛋白的新颖机制.

来自副溶血弧菌 (*Vibrio parahaemolyticus*) 的三型分泌系统效应蛋白 VopS 在进入宿主细胞后, 可以失活包括 Rho、Rac 和 Cdc42 在内的 Rho 家族小 G 蛋白, 从而导致宿主肌动蛋白细胞骨架的破坏和细胞变圆. 这一活性依赖于 VopS 蛋白 C 端的 Fic (filamentation induced by cAMP) 结构域对其底物小 G 蛋白 Switch-I 区域中保守的苏氨酸 (RhoA 中为第 37 位) 的腺苷酰化修饰 (图 4). VopS 介导的腺苷酰化修饰, 需要 ATP 为辅因子, 最终将 AMP 与苏氨酸的羟基 O 共价连接, 并生成焦磷酸, 因此也被称作 AMPylation^[31]. Fic 结构域中核心的序列为 HPFX(D/E)GNR, 其中组氨酸对于催化腺苷酰化修饰活性是必需的. Rho 家族小 G 蛋白中的 Switch-I 区域和 Switch-II 区域在结合 GDP 或 GTP 时会发生明显的构象变化, 小 G 蛋白下游的因子则会识别相应构象并与之结合而发挥功能. 被 VopS 修饰后的 Rho 蛋白不能同下游的效应因子结合, 从而导致下游信号通路被阻断 (图 4). 与 VopS 类似, 来自睡眠嗜组织菌 (*Histophilus somni*) 的 IbpA 蛋白也可以通过该修饰失活小 G 蛋白, 其催化的腺苷酰化修饰发生在一个保守的酪氨酸上 (在 RhoA 中为第 34 位), 但该酪氨酸和被 VopS 腺苷酰化修饰的苏氨酸一样, 都位于 Rho 家族小 G 蛋白的 Switch-I 区域上. IbpA 中含有 2 个连续的 Fic 结构域, 二者单独都有类似的活性, 说明功能可能存在冗余. 与 VopS 相似, IbpA 更倾向于修饰激活形式的小 G 蛋白 (结合 GTP); 同时, 被腺苷酰化修饰的小 G 蛋白被磷酸二酯酶水解后产生 AMP 基团, 更加说明 AMP 是通过磷酸二酯键与被修饰的氨基酸共价结合^[32].

基于 X 射线晶体衍射的结构生物学研究表明, IbpA 的第二个 Fic 结构域 (IbpA-Fic2) 与此前已报道

的其他 Fic 结构域结构上较为相似, 其主要特点是中部的 helix-turn-helix 模式加上周围分布的 6 个 α 螺旋^[33]. VopS 的 Fic 结构域也具有类似的结构组装模式^[34]. 而 IbpA-Fic2 与 Cdc42 的复合物结构则进一步揭示 Fic 结构域模拟了 RhoGDI (Rho GDP-dissociation inhibitor) 蛋白与 Cdc42 的结合方式. Fic 核心模式中的组氨酸从酪氨酸上夺取质子, 从而有利于酪氨酸实现对 ATP 中 α - 磷酸基团进行亲核进攻^[33]. 而对 VopS 催化 Cdc42 发生腺苷酰化修饰反应初速度的测定结果也进一步支持组氨酸介导的上述碱催化机制^[34].

事实上, 早在 20 世纪 60 年代, Stadtman 实验室已报道了大肠杆菌的谷氨酰胺合成酶会发生酪氨酸的腺苷酰化^[35-36]. 这一修饰由腺苷酰转移酶

(adenyl transferase, EC 2.7.7.749) 催化发生. 而在泛素及泛素类似蛋白的活化过程中, 也会发生瞬时的腺苷酰化修饰(修饰发生在泛素 C 端的甘氨酸或者活泼的赖氨酸残基上)^[37]. 但是 Fic 结构域并不与腺苷酰转移酶或者泛素活化酶等有序列上的相似性. 令人惊奇的是, Fic 结构域在细菌、噬菌体和真核生物(包括人类但不包含真菌和植物)的约 2 700 种蛋白质中都广泛存在. 人类基因组中仅有一个基因编码含有 Fic 结构域的蛋白. 这个蛋白被称作 HYPE (huntingtin yeast-interacting protein E), 它在体外同样能够对 RhoA、Rac 和 Cdc42 进行腺苷酰化修饰. 但是在细胞内过表达时, HYPE 则不表现出阻断细胞骨架和使细胞变圆的表型, 说明 HYPE 在体内可能有催化其他底物蛋白发生腺苷酰化修饰^[32].

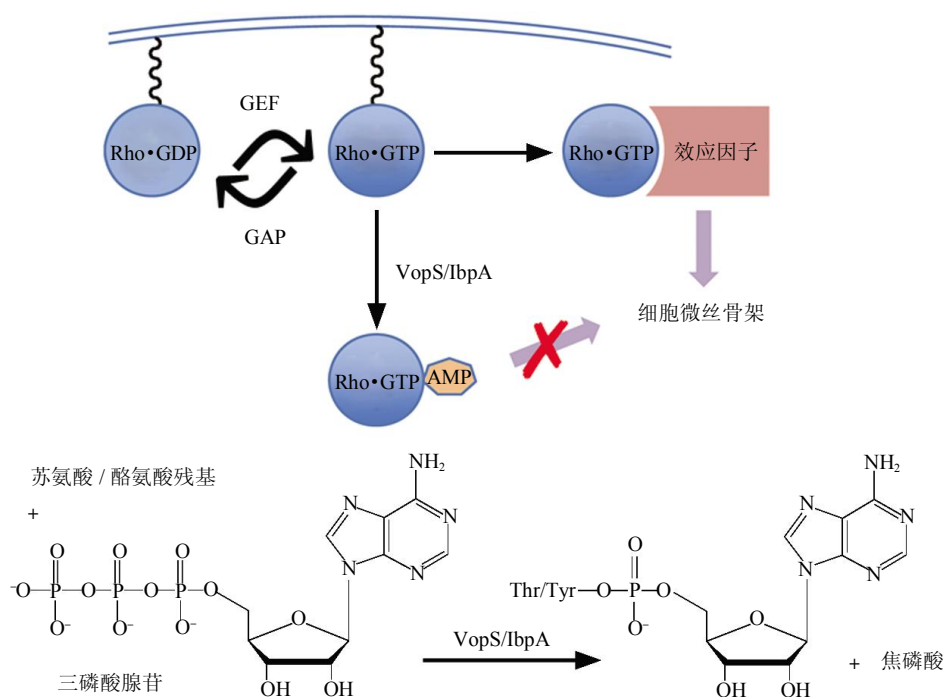


Fig. 4 Fic domain-containing effectors VopS and IbpA adenylylate Rho GTPases and disrupts the actin cytoskeleton in host cells

图 4 Vops 及 IbpA 效应蛋白能够对 Rho 家族小 G 蛋白进行腺苷酰化修饰, 阻断宿主细胞肌动蛋白细胞骨架通路

4 小结与展望

在本文中, 我们总结了近几年刚刚发现的几种由病原菌效应蛋白介导的蛋白质翻译后修饰. 通过这些崭新的翻译后修饰, 病原菌能够实现特异性失活宿主信号转导通路中的关键分子, 从而分别抑制宿主细胞的 MAPK、NF- κ B、死亡信号通路以及小

G 蛋白信号通路, 这些研究的发现开辟了一个有关蛋白质翻译后修饰在病原-宿主相互作用中功能机制的新研究方向. 在此过程中, 效应蛋白作用机制不仅表现出对宿主的模拟, 同时也被发现具有此前并未被报道过的全新的生物化学酶学活性. 因此, 对效应蛋白作用机理的深入研究, 往往会指导我们更清晰地了解宿主信号转导的调控机制. 而病原菌

的多样性也将不断为信号转导领域贡献新的修饰和调控机制,从而帮助我们对未知领域的探索^[38].

参 考 文 献

- [1] Galan J E, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, 1999, **284**(5418): 1322–1328
- [2] Hayden M S, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*, 2008, **132**(3): 344–362
- [3] Ausubel F M. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved?. *Nat Immunol*, 2005, **6**(10): 973–979
- [4] Guan K L. The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal*, 1994, **6**(6): 581–589
- [5] Li H, Xu H, Zhou Y, *et al.* The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science*, 2007, **315**(5814): 1000–1003
- [6] Zhang J, Shao F, Li Y, *et al.* A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe*, 2007, **1**(3): 175–185
- [7] Zhu Y, Li H, Long C, *et al.* Structural insights into the enzymatic mechanism of the pathogenic MAPK phosphothreonine lyase. *Mol Cell*, 2007, **28**(5): 899–913
- [8] Chen L, Wang H, Zhang J, *et al.* Structural basis for the catalytic mechanism of phosphothreonine lyase. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, **15**(1): 101–102
- [9] Garrido-Franco M, Ehlert S, Messerschmidt A, *et al.* Structure and function of threonine synthase from yeast. *J Biol Chem*, 2002, **277**(14): 12396–12405
- [10] Chatterjee C, Miller L M, Leung Y L, *et al.* Lactacin 481 synthetase phosphorylates its substrate during lantibiotic production. *J Am Chem Soc*, 2005, **127**(44): 15332–15333
- [11] Goto Y, Li B, Claesen J, *et al.* Discovery of unique lanthionine synthetases reveals new mechanistic and evolutionary insights. *PLoS Biol*, 2010, **8**(3): e1000339
- [12] Goto Y, Okesli A, van der Donk W A. Mechanistic studies of Ser/Thr dehydration catalyzed by a member of the LanL lanthionine synthetase family. *Biochemistry*, 2011, **50**(5): 891–898
- [13] Kanayama A, Seth R B, Sun L, *et al.* TAB2 and TAB3 activate the NF-kappaB pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, 2004, **15**(4): 535–548
- [14] Zhang L, Ding X, Cui J, *et al.* Cysteine methylation disrupts ubiquitin-chain sensing in NF-kappaB activation. *Nature*, 2012, **481**(7380): 204–208
- [15] He C, Hus J C, Sun L J, *et al.* A methylation-dependent electrostatic switch controls DNA repair and transcriptional activation by *E. coli* ada. *Mol Cell*, 2005, **20**(1): 117–129
- [16] Sedgwick B, Robins P, Totty N, *et al.* Functional domains and methyl acceptor sites of the *Escherichia coli* ada protein. *J Biol Chem*, 1988, **263**(9): 4430–4433
- [17] Castro C, Gratson A A, Evans J C, *et al.* Dissecting the catalytic mechanism of betaine-homocysteine S-methyltransferase by use of intrinsic tryptophan fluorescence and site-directed mutagenesis. *Biochemistry*, 2004, **43**(18): 5341–5351
- [18] Koutmos M, Pejchal R, Bomer T M, *et al.* Metal active site elasticity linked to activation of homocysteine in methionine synthases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(9): 3286–3291
- [19] Matthews R G, Goulding C W. Enzyme-catalyzed methyl transfers to thiols: the role of zinc. *Curr Opin Chem Biol*, 1997, **1**(3): 332–339
- [20] Giogha C, Lung T W, Pearson J S, *et al.* Inhibition of death receptor signaling by bacterial gut pathogens. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2014, **25**(2): 235–243
- [21] Park H H, Lo Y C, Lin S C, *et al.* The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annu Rev Immunol*, 2007, **25**: 561–586
- [22] Wang L, Du F, Wang X. TNF-alpha induces two distinct caspase-8 activation pathways. *Cell*, 2008, **133**(4): 693–703
- [23] Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*, 2003, **114**(2): 181–190
- [24] Li S, Zhang L, Yao Q, *et al.* Pathogen blocks host death receptor signalling by arginine GlcNAcylation of death domains. *Nature*, 2013, **501**(7466): 242–246
- [25] Pearson J S, Giogha C, Ong S Y, *et al.* A type III effector antagonizes death receptor signalling during bacterial gut infection. *Nature*, 2013, **501**(7466): 247–251
- [26] Wang L, Yang J K, Kabaleeswaran V, *et al.* The Fas-FADD death domain complex structure reveals the basis of DISC assembly and disease mutations. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(11): 1324–1329
- [27] Hart G W, Slawson C, Ramirez-Correa G, *et al.* Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu Rev Biochem*, 2011, **80**: 825–858
- [28] Aktories K. Bacterial protein toxins that modify host regulatory GTPases. *Nat Rev Microbiol*, 2011, **9**(7): 487–498
- [29] Hall A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 1998, **279**(5350): 509–514
- [30] Ridley A J, 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): 389–399
- [31] Yarbrough M L, Li Y, Kinch L N, *et al.* AMPylation of Rho GTPases by *Vibrio* VopS disrupts effector binding and downstream signaling. *Science*, 2009, **323**(5911): 269–272
- [32] Worby C A, Mattoo S, Kruger R P, *et al.* The fic domain: regulation of cell signaling by adenylation. *Mol Cell*, 2009, **34**(1): 93–103
- [33] Xiao J, Worby C A, Mattoo S, *et al.* Structural basis of Fic-mediated adenylation. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, **17**(8): 1004–1010
- [34] Luong P, Kinch L N, Brautigam C A, *et al.* Kinetic and structural insights into the mechanism of AMPylation by VopS Fic domain. *J Biol Chem*, 2010, **285**(26): 20155–20163
- [35] Brown M S, Segal A, Stadtman E R. Modulation of glutamine synthetase adenylation and deadenylation is mediated by

- metabolic transformation of the P II -regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**(12): 2949–2953
- [36] Stadtman E R, Shapiro B M, Kingdon H S, *et al.* Cellular regulation of glutamine synthetase activity in *Escherichia coli*. *Adv Enzyme Regul*, 1968, **6**: 257–289
- [37] Hochstrasser M. Origin and function of ubiquitin-like proteins. *Nature*, 2009, **458**(7237): 422–429
- [38] Cui J, Shao F. Biochemistry and cell signaling taught by bacterial effectors. *Trends Biochem Sci*, 2011, **36**(10): 532–540

Bacterial Effectors Posttranslationally Modify Host Defense System

ZHANG Li, SHAO Feng*

(National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract Disrupting the normal signal transduction in host cells by injected bacterial effectors is a critical mechanism in bacterial pathogen-host interaction. The effectors usually harbor unique biochemical activities and function to block the anti-bacteria host defense pathways. Studies in the past few years have revealed several novel posttranslational modifications catalyzed by various bacterial effectors. The OspF family of phosphothreonine lyase effectors catalyzes "eliminylation" of phosphothreonine in MAPK, resulting permanent kinase inactivation. The NleE effector inhibits infection-induced NF- κ B proinflammatory signaling by a cysteine methylation modification. The NleB effector mediates arginine GlcNAcylation of death domains and therefore blocks death receptor-mediated host cell death. The Fic-domain containing effectors VopS and IbpA transfer an AMP group onto a conserved serine or tyrosine residue in Rho GTPases, leading to Rho inactivation and disruption of the actin cytoskeleton dynamics in host cells. Identification of the biochemical activities of these effectors not only help to understand the virulence mechanism of the corresponding bacterial pathogens, but also establish a new research direction of posttranslational modifications in bacteria-host interaction studies. These effectors may also benefit or guide future study of the eukaryotic signal transduction.

Key words bacterial pathogen, type III secretion system, effector protein, posttranslational modification, innate immunity, signal transduction

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2014.00236

*Corresponding author.

Tel: 86-10-80726688-8560, Fax: 86-10-80728046, E-mail: shaofeng@nibs.ac.cn

Received: August 10, 2014 Accepted: September 9, 2014