

嗜肺军团菌调控宿主囊泡转运的效应因子及其分子机制

肖婷 赵桂华 尹昆*

(山东省医学科学院山东省寄生虫病防治研究所 山东 济宁 272033)

摘要:嗜肺军团菌通过其特有的 Dot/Icm type-IVB 分泌系统向宿主胞内分泌多种效应因子,有效俘获了宿主胞内参与囊泡转运的重要蛋白,从而“绑架”了宿主细胞的囊泡运输过程,达到逃避宿主清除机制并大量增殖的目的。这些效应因子包括 SidM、LidA、LepB、AnkX、Lem3、SidD、RalF、VipD 等,通过对这些效应因子的鉴定、功能试验和结构生物学研究,逐渐揭示了它们较为完整深入的分子作用机制。本文综述了目前已知的参与调控宿主囊泡转运过程的重要效应因子及其空间结构和分子机制,有助于综合了解这种复杂的病原微生物与宿主相互作用的过程。

关键词:嗜肺军团菌,囊泡运输,效应因子,结构,分子机制

Legionella pneumophila effectors and mechanisms in regulating host vesicular trafficking

XIAO Ting ZHAO Gui-Hua YIN Kun*

(Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong Institute of Parasitic Diseases, Ji'ning, Shandong 272033, China)

Abstract: *Legionella pneumophila* secretes a large number of effectors into the host cytosol via its Dot/Icm type-IVB secretion system. Those effectors efficiently recruit important host proteins that participating in the process of host vesicular trafficking, thereby “kidnap” the intracellular vesicular trafficking in the host. This process ensures *L. pneumophila*'s intracellular replication and avoids host lysosome clearance. Effectors involved in the process including SidM, LidA, LepB, AnkX, Lem3, SidD, RalF, VipD et al. According to the studies of identification, functional detection and crystal structural analysis of those effectors, their sophisticated molecular mechanisms have been gradually revealed. Here we summarized the structures and mechanisms of well-known important effectors exploiting host vesicular trafficking, in favor of the comprehensively understanding of the intricate pathogen-host interaction process.

Keywords: *Legionella pneumophila*, Vesicular trafficking, Effector, Structure, Molecular mechanism

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (No. 31300617); Natural Science Foundation of Shandong Province (No. BS2013SW015, ZR2014YL039); Youth fund of Shandong Academy of Medical Sciences (No. 2014-59)

*Corresponding author: E-mail: yinkun0326@163.com

Received: March 29, 2016; **Accepted:** July 15, 2016; **Published online** (www.cnki.net): July 19, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31300617);山东省自然科学基金项目(No. BS2013SW015, ZR2014YL039);山东省医学科学院青年基金项目(No. 2014-59)

*通讯作者: E-mail: yinkun0326@163.com

收稿日期: 2016-03-29; **接受日期:** 2016-07-15; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-07-19

嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)是一种需氧革兰氏阴性杆菌, 兼性寄生人类单核和巨噬细胞, 可引起获得性非典型肺炎, 且时有局部暴发和流行^[1]。嗜肺军团菌感染宿主时, 通过其特有的 Dot/Icm type-IVB (Defective organelle trafficking gene/intracellular multiplication gene, Dot/Icm)分泌系统^[2], 向胞浆内分泌大量效应因子^[3], 目前已明确鉴定了多达 300 余种效应因子^[4-5], 它们的功能几乎涵盖了军团菌的整个感染过程, 包括形成富含营养的感染囊泡 LCV (*Legionella*-containing vacuole)、逃避宿主溶酶体清除机制、避免宿主细胞凋亡、维持 LCV 的完整性、俘获宿主胞内的重要调控蛋白、晚期诱导宿主细胞凋亡和裂解等^[6]。因此, 嗜肺军团菌目前已成为一种新的研究病原菌和宿主相互作用机制的模式生物^[7]。

囊泡运输是一个复杂而精确的调控过程, 嗜肺军团菌利用 Dot/Icm 系统的效应因子, 可完成一系列对宿主囊泡运输的“绑架”和调控, 形成 LCV, 维持胞内增殖。LCV 可俘获宿主胞内参与内质网和高尔基体(ER-Golgi)之间动态运输的小鸟苷三磷酸酶 GTPases (Guanosine triphosphatases)家族蛋白, 如 Calnexin、PI(4)P、Sec22b 及胞内小 GTP 酶 Sar1、Arf1 和 Rab1^[8]等。这些小 GTPases 可在军团菌编码的鸟苷酸交换因子 GEF (Guanine exchange factor)、GTPase 激活蛋白 GAP (GTPase-activating protein)、鸟苷酸解离抑制因子 GDI (Guanine dissociation inhibitor)和 GDI 释放因子 GDF (GDI displacement factor)等效应因子的调控下完成活性开闭的膜循环^[9]。如效应因子 RalF 可俘获 Arf1; SidM、LidA、LepB、AnkX、Lem3、SidD 等 6 种 Dot/Icm 效应因子可完成对宿主 Rab1 的俘获、激活、去活化、修饰和去修饰^[10]。本文综述了几种重要的效应因子对宿主囊泡转运过程的“绑架式”调控机制。

1 SidM

SidM 又名 DrrA, 是一个多功能效应因子, 同时具有 GEF 和 GDF 活性, 并对 Rab1 高度专一性识别, 其独特性引起了广泛关注, 是目前研究最为

深入的效应因子。SidM 含有 3 个相对独立的结构域。其 N 端(1-339 aa)为 ATase (Adenylyltransferase)结构域, 起到对 Rab1 的修饰作用^[11]; 中间(340-520 aa)是一个 GEF 结构域, 负责对 Rab1 的激活; 敲除 SidM 能够明显降低嗜肺军团菌对野生型 Rab1 的俘获效率^[12-13]; C 端(521-647 aa)为 P4M 结合域, 介导 SidM 在 LCV 的锚定^[14]。一旦被分泌, SidM 可通过 PI-4P 锚定至 LCV 外膜, 通过其多功能的 GDF/GEF 活性, 促使宿主胞内活性关闭状态的 GDI-Rab1-GDP 复合物发生解离, 并完成 GTP 对 GDP 的取代^[15], 使 Rab1 转化为活性开放状态并通过其自由的异戊二烯化修饰的 C 端结构域插入 LCV 外膜, 帮助实现 LCV 对 Rab1 蛋白的俘获和积累。对 SidM 的 N 端 9-218 aa 片段的三维晶体结构的解析, 意外发现该区域的高级构象与可行使 AMP 共价修饰的 GS-ATase 的 C 端结构域具有高度同源性, 通过小分子结合力实验证明, SidM 是 Rab1 专一性的 AMPylase, 该区域的腺苷酰化 (Adenylation/AMPylation)基序(G-XII-D-X-D), 可以 ATP 为底物, 将 1 分子的 AMP 修饰到处于激活状态的 GTP-Rab1 的第 77 位酪氨酸上^[9], 完成腺苷酰化的过程; 同时, AMPylation 过程也对 Rab1 在 LCV 膜上的锚定至关重要^[16]。最新研究已证明, 无论 Rab1 结合的是 GDP 还是 GTP, SidM 对 Rab1 第 77 位 Tyr 的腺苷酰化修饰(Adenylation), 都可保证 Rab1 处于 Active 的折叠构象, 从而最大限度地保证被俘获的 Rab1 在 LCV 上保持活性开放状态^[17]。SidM 同时具有对宿主 Rab1 蛋白的 GEF/GDF/AMPylase 的功能, 能够多环节参与 LCV 对 Rab1 的俘获和激活, 对这一独特效应因子的发现、结构解析和生化功能的研究历程, 均为了解病原菌-宿主相互作用分子机制提供了宝贵的研究范例。

2 LidA

LidA 是最早被明确鉴定的 Dot/Icm 效应因子之一, 基因全长 2 187 bp, 编码 729 个氨基酸。与 SidM 相似, LidA 也参与了对 Rab 家族的识别和俘获^[8,18];

不同的是, LidA 可独立招募不与 GDI 结合的 Rab1-GDP^[12], 且 LidA 对 Rab 家族具有多样识别性, 体内可至少识别 Rab1、Rab6 和 Rab8 等 3 种以上的 Rabs^[8,19]。我们于 2012 年公开发表的 LidA 与两种状态的 Rab1 蛋白复合物的三维晶体结构, 揭示了 LidA 可独立俘获 GDI-free-Rab1 的分子机制^[20]。复合物状态下, LidA (224–559 aa) 的 Coiled-coil 结构域以一种独特的紧密结合方式识别并牢牢结合不同状态下的 Rab1, 包括 Rab-GDP 和 Rab1-GTP, 其 Coiled-coil 结构域极似 4 个“手指”, 将球状的 Rab1 蛋白抓握于“掌心”中, 这种独特的大面积抓获式互作方式, 导致了 LidA 对 Rab1 蛋白具有极高的相互识别和相互作用力, 通过体外 ITC (等温滴定微量热仪) 检测, 二者的解离常数(K_D 值) 达到纳摩尔级别, 比常规的小分子之间的解离常数低了 3–4 个数量级, 因此可竞争性结合 GDI-free-Rab1^[18]; 体外质谱实验也表明 LidA 还能高效识别经 SidM 腺苷酰化的 Rab1, 但并不参与该过程, 表明 LidA 可能具有和 SidM 的 N 端结构域相似的功能, 可维持 Rab1 持续保持活性开放状态。特别的是, 我们发现 LidA-Rab1-GDP 复合物中本应 Inactive 的 Rab1, 折叠方式与 Active 状态的 Rab1-GTP 几乎完全一致, 体外 ITC 实验也表明, LidA 对 Rab1-GDP 和 Rab1-GTP 的识别能力几乎相当。因此, 尽管没有检测到 LidA 具有任何与 Rabs 相关的酶活性, LidA 仅凭借其自身独特的折叠方式, 即可实现对球状 Rabs 蛋白极强的亲和力, 能够保证 Rab1 不被宿主胞内的 GDI 回收, 有利于其后续的激活和磷酸化, 并能维持其活性开放状态, 从而保证 LCV 对宿主 Rab 家族成员的高效俘获和活性稳定。LidA(201–583)-Rab8-GTP 的复合物晶体^[21] 结构与我们解析的 LidA(224–559)-Rab1 的结构高度相似, 表明 LidA 可能以相似的机制在宿主胞内识别不同的 Rab 家族成员。同时, 我们的工作也证明了, LidA 体外可识别 Rab1、Rab2、Rab4、Rab5、Rab6、Rab7、Rab8、Rab9、Rab11、Rab14、Rab18、Rab20、Rab22 等 13 种 Rabs^[20]。目前, 我们正致力于从结构解析

的角度揭示 LidA 对 Rabs 家族广泛却又带有选择性的识别机制。

3 LepB

LepB 全长基因编码了 1 294 个氨基酸, 在嗜肺军团菌通过 SidM 俘获 Rab1 的过程中, 可检测到 LepB 在 LCV 膜上大量积累长达 12 h^[9]。尽管 LepB 在一级序列及空间结构上, 均与经典的 GAP 结构域(TBC family, Tre/Bub2/Cdc16)没有同源性^[22], 却被证明其在宿主体内可充当 Rab1 的 GAP^[9], 在宿主细胞中 Rab1 不足的情况下, SidM 和伪装成 GAP 的 LepB 协作, 迅速把激活状态的 Rab1-GTP 转化为 Rab1-GDP, 使 Rab1 脱离 LCV 回到细胞质中, 协助军团菌完成对 Rab1 的俘获和膜循环的调控。LepB 的 GAP 结构域与 Rab1-GDP 复合物的三维晶体结构表明, 其行使 GAP 的分子机制不同于经典的 TBC 结构域^[23–25]。复合物晶体结构揭示了 LepB 对 Rab1-GTP 的水解机制, LepB 通过其 444 位的 Arginine finger 而非传统的 Glutamine finger 作用于 Rab1 的 DXXGO motif 的 Cis-Glutamine, 表明 LepB 采用了类 Ras/Rho GAP-like 的而非 TBC-like 的催化机制完成对 Rab1 上 GTP 的水解^[24–25]; 同时, Rab3、Rab8、Rab13 和 Rab35 均可作为 LepB 的催化底物, 且在军团菌感染过程早期, 可在 LCV 膜上检测到 Rab8 的积累。因此, LepB 可能也是军团菌俘获 Rab8 过程的 GAP^[23]。LepB 对 Rab1 的识别能力不仅强于经典的哺乳动物来源的 TBC GAP, 也远强于细菌来源的 VirA/EspG Rab GAPs^[24], 且识别机制与以往鉴定的所有 GAP 都存在较大差异, 证明来自病原菌的 RabGAPs 催化机制具有多样性。

然而, 目前已经解析的 LepB 的晶体结构集中在 N 端, 单体结构最长为 1–618 aa 片段^[25], 复合物结构也多集中在 313–618 aa 片段之间^[23–24]。作为一个编码多达 1 294 aa 的大分子量蛋白, LepB 尚有除 GAP 之外的重要功能。在嗜肺军团菌感染末期, LepB 可参与调控宿主细胞裂解, 诱导宿主细胞凋亡^[26]; 在时空表达上, LepB 在嗜肺军团菌感染伊始即可分泌, 在 LCV 上的表达时间可长达 12 h^[9];

双敲除 LepA 和 LepB 的嗜肺军团菌, 无法裂解阿米巴宿主细胞^[26], 表明 LepB 在原生动物细胞裂解过程中发挥了极其重要的作用, 并非和大多数效应因子一样, 为嗜肺军团菌编码的功能冗余效应因子。我们对其全长蛋白的二级结构预测也表明, LepB 的 C 端结构域具有和 LidA 相似的长 Coiled-coil 结构域, 体外能够识别多种 Rab GTPases 家族成员, 且全长蛋白呈现出令人意外的高可溶性。因此, 对其 C 端结构域的结构解析和功能测定, 以及其选择性识别多种 Rabs 的分子机制的研究工作, 是本研究小组目前亟待解决的问题。

4 AnkX 和 Lem3

AnkX 又名 LegA8 或 AnkN, 是由军团菌编码的含有真核基因特有基序的效应因子, 其独特之处在于全长序列中包括了 4 个 ARHD (Ankyrin repeat homology domains) 结构域, 以及 1 个 Fic (Filamentation induced by c-AMP) 功能域^[27-28]。AnkX 可通过其 Fic 功能域 AMP 化(AMPylation)宿主蛋白的酪氨酸和苏氨酸, 干扰宿主胞内体转运^[27]。Mukherjee 等^[29]发现, 在 SidM 对 Rab1 进行 AMP 修饰的过程中, AnkX 可同时对 Rab1 进行磷酸胆碱化修饰, 即以胞苷二磷酸盐胆碱 (GDP-choline) 为底物, 将磷酸胆碱基团转移至 Rab1 的 Ser76 上。最新研究结果^[30]则证明 AnkX 只对 Rab1-GDP 进行磷酸胆碱修饰, 通过这种修饰促进 SidM 介导的 Rab1 和 GDI 的解离^[31]; 同时, AnkX 还能修饰 Rab35, 表明它对宿主的胞吞和胞吐途径均具有调控作用, 其功能的发挥取决于其 Fic motif 上保守的组氨酸^[29]。AnkX 利用其真核特有的 Fic 基序介导对宿主蛋白的翻译后修饰过程, 也证明了军团菌能够利用自身编码的独特效应因子干扰宿主囊泡转运过程。Lem3 与 AnkX 毗邻, 且位于它的下游。研究结果显示, Lem3 具有去磷酸胆碱化活性, 是一个去磷酸胆碱酶 (De-phosphocholinase), 可以将磷酸胆碱从 Rab1 上移走^[30], 从而实现对 Rab1 的调控, 所起作用正好与 AnkX 相反。

5 SidD

SidD 是近期发现的能够负调控 Rab1 蛋白 AMPylation 修饰的效应因子, 与 SidM 作用相反。Neunuebel 等^[32]通过在军团菌基因组上搜索 SidM 的相邻基因, 发现了与 SidM 相毗邻的 SidD 基因, 并通过检测其去腺苷酰化 (De-AMPyase) 活性, 证明了 SidD 具有与 SidM 相反功能的推测。Tan 等^[11]则在酵母体内通过筛选能够抑制 SidM (1-339 aa) 毒性的转化株, 发现这些酵母株均能编码 SidD 基因, 该基因可消除 SidM (1-339 aa) 对酵母菌株产生的细胞毒性, 并能高效移除 Rab1-AMP 上的 AMP 基团。两个研究小组均通过逆向思维的巧妙方式找到了军团菌去 AMPylation 修饰的效应因子, 进一步完善了 LCV 俘获和修饰 Rab1 的分子机制。SidD 与磷酸酶在蛋白二级结构上具有高度相似性, 三维晶体结构表明 SidD 的结构与 PPMs (Metal-dependent protein phosphatases) 结构域具有类似的折叠方式, 其第 92 位和 110 位的天冬氨酸对其酶活性起关键作用^[33], 其高分辨率晶体结构还发现 SidD 催化口袋含有双核金属离子结合位点, 依赖于镁离子催化对 AMP 的水解反应^[34]。研究证明, 只有经 SidM 催化的被 AMPylation 的 Rab1 是 SidD 的特异性底物, 且只有经过 SidD 的去修饰, Rab1-GTP 才能有效地被 LepB 识别, 从而帮助军团菌完成对宿主 Rab1 膜循环的调控^[32]。体内研究也证明了 SidM 和 Rab1 在感染初期的 2 h 之内完成在 LCV 上的累积, LepB 的峰值则在 4-9 h^[9], 表明了这几种效应因子的调控秩序。Neunuebel 等^[32]同时证明 AMP 的修饰和去修饰是处于动态变化的, 且 SidD 的时空表达与 LepB 相一致, 提示 SidD 介导的 De-AMPylation 可能与 Rab1 的失活和释放有关。有意思的是, Rab35 同时也可充当 AMPylation 及 De-AMPylation 反应的底物, 但 Rab2、Rab4、Rab6、Rab8、Rab14 和 Rab15 均不参与 SidM 介导的 AMPylation 反应, 提示这两种效应因子可能也参与调控军团菌逃避宿主溶酶体降解的过程。

6 RalF

RalF 是第一个被明确鉴定的 Dot/Icm 分泌系统效应因子,能够与宿主胞内的腺苷酸核糖基化因子 1 Arf1 (ADP ribosylation factor 1)相互识别^[35]。RalF 是通过比对嗜肺军团菌基因组中和真核细胞腺苷酸核糖基化因子 Arf1 的 GEFs 同源基因时发现的。Arf1 是一种小 G 蛋白,负责调控宿主胞内 COPI 囊泡从高尔基体运回内质网的过程。Arf1 的激活依赖于其 GEFs 上一段约 200 个氨基酸的保守 Sec7 结构域。RalF 的晶体结构^[36]表明,其 N 端含有一个与 Sec7 高度同源的结构域,可在宿主胞内充当 Arf1 的 GEF,识别并激活 Arf1,利用 Arf1 将本应从高尔基体运送至内质网的 COPI 囊泡俘获至 LCV 上,从而调控宿主胞内内质网到高尔基体的囊泡转运过程;该过程还涉及了另外两种效应因子 SidC 和 SdcA, SidC 的 N 端晶体结构呈现一种全新的折叠方式,可辅助 RalF 识别 Arf1^[37]。

7 其它参与调控的效应因子

效应因子 VipA、VipD、SidC、SidE、SidJ、LseA、PieE、LegG1、RidL 和 YlfA/LegC7 等也被证明参与调控宿主的囊泡转运过程。目前已知 VipA 在军团菌感染过程中可作为 Rab5、Rab21 和 Rab22 的 GEF^[38],参与肌动蛋白的结合与聚合,进而调控宿主的囊泡转运过程^[39]; VipD 可以与激活状态的 Rab5 或 Rab22 结合^[40-41],阻止这些小 G 蛋白进入正常的膜循环,从而干扰宿主的内体转运过程,抑制宿主胞内的溶酶体成熟^[42]。SidC^[43]、SidE 和 SidJ^[44]可帮助 LCV 募集内质网来源的囊泡^[45]。LseA、LepB 和 IcmG 等效应因子的二级结构中均具有和 SNARE-like motif 同源的结构域,因此可能在 SNARE 介导的膜融合过程中发挥作用^[3],目前已证明 LseA 能够识别宿主来源的 SNARE 并参与调控高尔基体转运过程^[46]。PieE 也被证明能够识别宿主胞内的多种 Rab GTPase,如 Rab1、Rab2、Rab5、Rab6 和 Rab10^[5]。LegG1 则可作为 Ran GTPase 的激活因子,通过调控宿主胞内的微管顺向聚合抑制

吞噬体的转运^[47]。RidL 则在宿主胞内通过结合 Vps29 抑制囊泡逆向运输(内体-高尔基体)过程,保证军团菌在宿主胞内的大量复制^[48]。在酵母菌株 *Saccharomyces cerevisiae* 体内过表达 YlfA/LegC7,酵母体内的内吞囊泡和 ER 来源囊泡的转运过程都受到了不同程度的干扰,表明其可能在军团菌体内发挥干扰宿主囊泡转运的功能^[49]。

8 展望

嗜肺军团菌 Dot/Icm 效应因子通过多种巧妙途径,“绑架”了宿主细胞调控囊泡转运的重要因子,从而达到形成 LCV、逃避降解、稳定宿主细胞和体内增殖的目的。我们通过深入总结这一过程的参与因子及分子机制,了解了病原菌与宿主相互作用的诸多新方式。其中,以效应因子俘获宿主胞内 Rab1 蛋白的分子机制最具代表性和完整性。在整个俘获过程中,军团菌首先利用 SidM 完成对 Rab1 的识别,利用 AnkX 和 Lem3 辅助 SidM 解离 Rab1-GDI 复合物,利用 SidM 和 LidA 完成对 Rab1 的竞争性俘获和稳定,再通过 SidM 激活 Rab1 并对其进行 AMP 化修饰,在“绑架”后期,则利用 SidD 对 Rab1 进行去 AMP 修饰,促使 LepB 识别并水解 Rab1-GTP,使 Rab1 重新回到活性关闭状态,并从 LCV 上脱离并被胞内游离的 GDI 回收,完成一个完整的膜循环(图 1)。整个过程精密有序,有助于我们细致了解病原菌俘获宿主囊泡转运的细节。然而,对 Rab1 的俘获和膜循环的调控,仅仅是嗜肺军团菌与宿主囊泡转运研究领域的冰山一角。2014 年的最新研究成果,已经明确了 LCV 至少能俘获 12 种宿主 Rab GTPases (Rab1, Rab2, Rab4, Rab5, Rab7, Rab8, Rab9, Rab10, Rab11, Rab14, Rab21, Rab32)^[50]。基于嗜肺军团菌 Dot/Icm 分泌系统效应因子在细菌生理功能方面的研究地位和结构生物学在该领域的重要应用,我们亦尝试通过结构解析的手段,揭示这些可识别多种 Rabs 的效应因子如 LidA 和 LepB 的选择机制,以及军团菌编码带有真核蛋白序列基元的效应因子如 AnkX 和 LubX 的生物学意

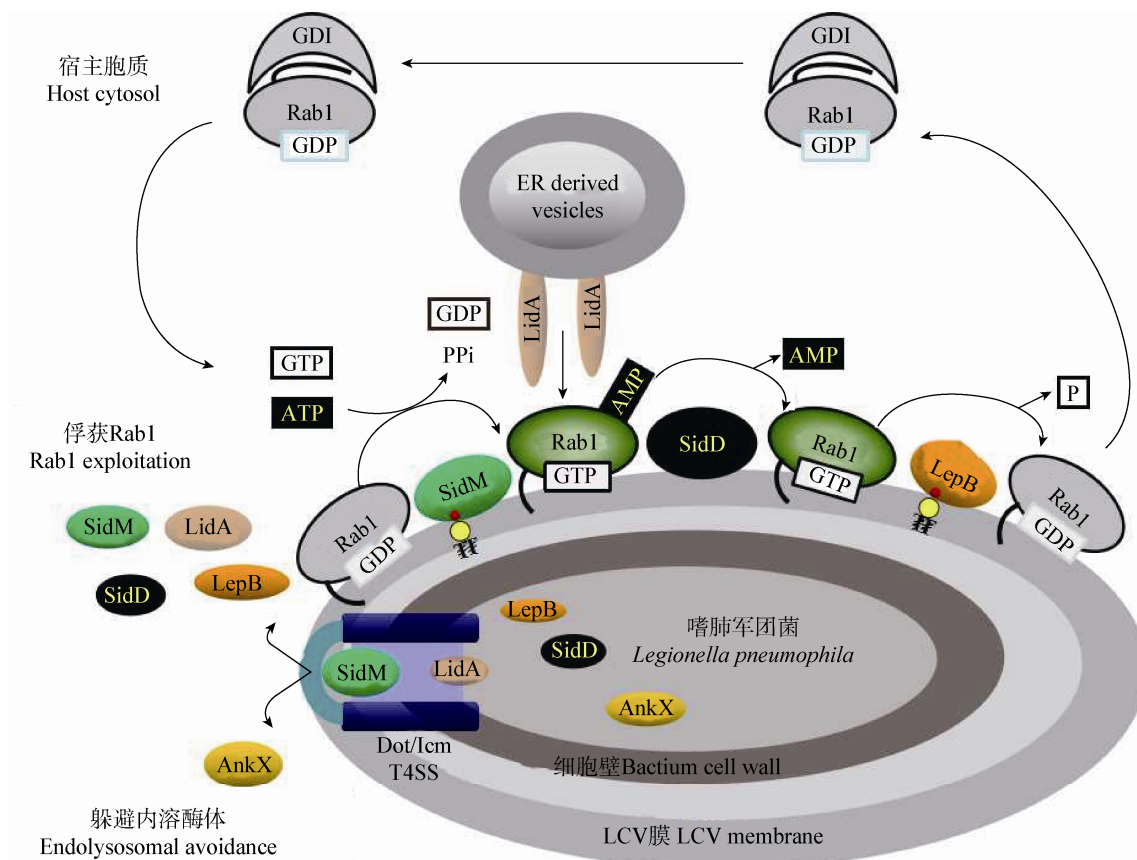


图1 嗜肺军团菌通过 Dot/Icm 分泌系统底物对宿主 Rab1 蛋白的调控
Figure 1 Rab1 manipulation by *legionella pneumophila* through Dot/Icm effectors

义。嗜肺军团菌 Dot/Icm 分泌系统分泌的多达 300 余种效应因子, 尽管参与到军团菌感染、复制、增殖和自噬的各个阶段, 但多数效应因子的功能尚不明确, 特别是那些参与调控宿主内质网到高尔基体转运、宿主细胞凋亡及自噬的效应因子, 目前仍是研究的热点, 亟待引入新技术和巧妙构思去攻克研究难关。深入研究这些热点因子, 对深入理解病原微生物的感染和致病过程, 以及开展有针对性的预防和治疗, 都具有重要的研究意义。

参考文献

- [1] Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease[J]. The Lancet Infectious Diseases, 2014, 14(10): 1011-1021
- [2] Zhu WH, Banga S, Tan YH, et al. Comprehensive identification of protein substrates of the Dot/Icm type IV transporter of *Legionella pneumophila*[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17638
- [3] Hubber A, Roy CR. Modulation of host cell function by *Legionella pneumophila* type IV effectors[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2010, 26(1): 261-283
- [4] Lifshitz Z, Burstein D, Peeri M, et al. Computational modeling and experimental validation of the *Legionella* and *Coxiella* virulence-related type-IVB secretion signal[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013, 110(8): E707-E715
- [5] Mousnier A, Schroeder GN, Stoneham CA, et al. A new method to determine *in vivo* interactomes reveals binding of the *Legionella pneumophila* effector PieE to multiple rab GTPases[J]. mBio, 2014, 5(4): e01148-14
- [6] Molmeret M, Santic M, Asare R, et al. Rapid escape of the *dot/icm* mutants of *Legionella pneumophila* into the cytosol of mammalian and protozoan cells[J]. Infection and Immunity, 2007, 75(7): 3290-3304
- [7] Ensminger AW. *Legionella pneumophila*, armed to the hilt: justifying the largest arsenal of effectors in the bacterial world[J]. Current Opinion in Microbiology, 2016, 29: 74-80
- [8] Machner MP, Isberg RR. Targeting of host Rab GTPase function by the intravacuolar pathogen *Legionella pneumophila*[J]. Developmental Cell, 2006, 11(1): 47-56
- [9] Ingmundson A, Delprato A, Lambright DG, et al. *Legionella pneumophila* proteins that regulate Rab1 membrane cycling[J]. Nature, 2007, 450(7168): 365-369
- [10] López de Armentia MM, Amaya C, Colombo MI. Rab GTPases and the autophagy pathway: bacterial targets for a suitable biogenesis and trafficking of their own vacuoles[J]. Cells, 2016, 5(1): 11
- [11] Tan YH, Luo ZQ. *Legionella pneumophila* SidD is a deAMPyase

- that modifies Rab1[J]. *Nature*, 2011, 475(7357): 506-509
- [12] Machner MP, Isberg RR. A bifunctional bacterial protein links GDI displacement to Rab1 activation[J]. *Science*, 2007, 318(5852): 974-977
 - [13] Suh HY, Lee DW, Lee KH, et al. Structural insights into the dual nucleotide exchange and GDI displacement activity of SidM/DrrA[J]. *The EMBO Journal*, 2010, 29(2): 496-504
 - [14] Müller MP, Peters H, Blümer J, et al. The *Legionella* effector protein DrrA AMPylates the membrane traffic regulator Rab1b[J]. *Science*, 2010, 329(5994): 946-949
 - [15] Schoebel S, Oesterlin LK, Blankenfeldt W, et al. RabGDI displacement by DrrA from *Legionella* is a consequence of its guanine nucleotide exchange activity[J]. *Molecular Cell*, 2009, 36(6): 1060-1072
 - [16] Hardiman CA, Roy CR. AMPylation is critical for Rab1 localization to vacuoles containing *Legionella pneumophila*[J]. *mBio*, 2014, 5(1): E01035-13
 - [17] Luitz MP, Bombliès R, Ramcke E, et al. Adenylation of Tyr77 stabilizes Rab1b GTPase in an active state: a molecular dynamics simulation analysis[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 19896
 - [18] Murata T, Delprato A, Ingmundson A, et al. The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor[J]. *Nature Cell Biology*, 2006, 8(9): 971-977
 - [19] Chen Y, Machner MP. Targeting of the small GTPase Rab6A' by the *Legionella pneumophila* effector LidA[J]. *Infection and Immunity*, 2013, 81(6): 2226-2235
 - [20] Cheng W, Yin K, Lu DF, et al. Structural insights into a unique *Legionella pneumophila* effector LidA recognizing both GDP and GTP bound Rab1 in their active state[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(3): e1002528
 - [21] Schoebel S, Cichy AL, Goody RS, et al. Protein LidA from *Legionella* is a Rab GTPase supereffector[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(44): 17945-17950
 - [22] Pan XJ, Eathiraj S, Munson M, et al. TBC-domain GAPs for Rab GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism[J]. *Nature*, 2006, 442(7100): 303-306
 - [23] Mihai Gazdag E, Streller A, Haneburger I, et al. Mechanism of Rab1b deactivation by the *Legionella pneumophila* GAP LepB[J]. *EMBO Reports*, 2013, 14(2): 199-205
 - [24] Yu Q, Hu LY, Yao Q, et al. Structural analyses of *Legionella* LepB reveal a new GAP fold that catalytically mimics eukaryotic RasGAP[J]. *Cell Research*, 2013, 23(6): 775-787
 - [25] Mishra AK, Del Campo CM, Collins RE, et al. The *Legionella pneumophila* GTPase activating protein LepB accelerates Rab1 deactivation by a non-canonical hydrolytic mechanism[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(33): 24000-24011
 - [26] Chen J, de Felipe KS, Clarke M, et al. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa[J]. *Science*, 2004, 303(5662): 1358-1361
 - [27] de Felipe KS, Glover RT, Charpentier X, et al. *Legionella* eukaryotic-like type IV substrates interfere with organelle trafficking[J]. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(8): e1000117
 - [28] Roy CR, Mukherjee S. Bacterial FIC proteins AMP up infection[J]. *Science Signaling*, 2009, 2(62): pe14
 - [29] Mukherjee S, Liu XY, Arasaki K, et al. Modulation of Rab GTPase function by a protein phosphocholine transferase[J]. *Nature*, 2011, 477(7362): 103-106
 - [30] Goody PR, Heller K, Oesterlin LK, et al. Reversible phosphocholination of Rab proteins by *Legionella pneumophila* effector proteins[J]. *The EMBO Journal*, 2012, 31(7): 1774-1784
 - [31] Oesterlin LK, Goody RS, Itzen A. Posttranslational modifications of Rab proteins cause effective displacement of GDP dissociation inhibitor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(15): 5621-5626
 - [32] Neunuebel MR, Chen Y, Gaspar AH, et al. De-AMPylation of the small GTPase Rab1 by the pathogen *Legionella pneumophila*[J]. *Science*, 2011, 333(6041): 453-456
 - [33] Rigden DJ. Identification and modelling of a PPM protein phosphatase fold in the *Legionella pneumophila* deAMPyase SidD[J]. *FEBS Letters*, 2011, 585(17): 2749-2754
 - [34] Chen Y, Tascón I, Neunuebel MR, et al. Structural basis for Rab1 de-AMPylation by the *Legionella pneumophila* effector SidD[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(5): e1003382
 - [35] Nagai H, Kagan JC, Zhu XJ, et al. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes[J]. *Science*, 2002, 295(5555): 679-682
 - [36] Alix E, Chesnel L, Bowzard BJ, et al. The capping domain in RalF regulates effector functions[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(11): e1003012
 - [37] Horenkamp FA, Mukherjee S, Alix E, et al. *Legionella pneumophila* subversion of host vesicular transport by SidC effector proteins[J]. *Traffic*, 2014, 15(5): 488-499
 - [38] Sohn YS, Shin HC, Park WS, et al. Lpg0393 of *Legionella pneumophila* is a guanine-nucleotide exchange factor for Rab5, Rab21 and Rab22[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118683
 - [39] Bugalhão JN, Mota LJ, Franco IS. Identification of regions within the *Legionella pneumophila* VipA effector protein involved in actin binding and polymerization and in interference with eukaryotic organelle trafficking[J]. *Microbiologyopen*, 2016, 5(1): 118-133
 - [40] Ku B, Lee KH, Park WS, et al. VipD of *Legionella pneumophila* targets activated Rab5 and Rab22 to interfere with endosomal trafficking in macrophages[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(12): e1003082
 - [41] Gaspar AH, Machner MP. VipD is a Rab5-activated phospholipase A1 that protects *Legionella pneumophila* from endosomal fusion[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(12): 4560-4565
 - [42] Lucas M, Gaspar AH, Pallara C, et al. Structural basis for the recruitment and activation of the *Legionella* phospholipase VipD by the host GTPase Rab5[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(34): E3514-E3523
 - [43] Hsu F, Luo X, Qiu JZ, et al. The *Legionella* effector SidC defines a unique family of ubiquitin ligases important for bacterial phagosomal remodeling[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(29): 10538-10543
 - [44] Jeong KC, Sexton JA, Vogel JP. Spatiotemporal regulation of a *Legionella pneumophila* T4SS substrate by the metaeffector SidJ[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(3): e1004695
 - [45] Ge JN, Shao F. Manipulation of host vesicular trafficking and innate immune defence by *Legionella* Dot/Icm effectors[J]. *Cellular Microbiology*, 2011, 13(12): 1870-1880
 - [46] King NP, Newton P, Schuelein R, et al. Soluble NSF attachment protein receptor molecular mimicry by a *Legionella pneumophila* Dot/Icm effector[J]. *Cellular Microbiology*, 2015, 17(6): 767-784
 - [47] Simon S, Wagner MA, Rothmeier E, et al. Icm/Dot-dependent inhibition of phagocyte migration by *Legionella* is antagonized by a translocated Ran GTPase activator[J]. *Cellular Microbiology*, 2014, 16(7): 977-992
 - [48] Finsel I, Ragaz C, Hoffmann C, et al. The *Legionella* effector RidL inhibits retrograde trafficking to promote intracellular replication[J]. *Cell Host & Microbe*, 2013, 14(1): 38-50
 - [49] O'Brien KM, Lindsay EL, Starai VJ. The *Legionella pneumophila* effector protein, LegC7, alters yeast endosomal trafficking[J]. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0116824
 - [50] Hoffmann C, Finsel I, Otto A, et al. Functional analysis of novel Rab GTPases identified in the proteome of purified *Legionella*-containing vacuoles from macrophages[J]. *Cellular Microbiology*, 2014, 16(7): 1034-1052