



## 专论与综述

## 嗜肺军团菌调节宿主泛素化途径的效应因子及其分子机制研究进展

黄旖旎<sup>1</sup> 关洪鑫<sup>1,2</sup> 欧阳松应<sup>\*1,2</sup>

1 福建师范大学生命科学学院 福建 福州 350117

2 福建师范大学南方生物医学研究中心 福建 福州 350117

**摘要:** 嗜肺军团菌是一种胞内寄生菌, 其通过特有的 Dot/Icm Type-IVB 分泌系统向胞浆内分泌大量效应因子, 其中已知参与宿主泛素化调控的效应因子有十多种。这些效应因子通过对宿主泛素化途径进行调控来达到逃避宿主免疫系统“监视”并大量增殖的目的。参与调控宿主泛素化途径的效应因子包括 AnkB、SidC、LubX、SidH、LegU1、GobX、RavD、DupA、DupB、SidJ、Ceg23、MvcA、MavC 及 SidE 家族蛋白等。随着对嗜肺军团菌效应因子功能及结构研究的深入, 它们的作用机制逐渐被揭示。本文对其中几种重要嗜肺军团菌效应因子的生物学结构和分子机制进行系统总结, 有利于综合了解嗜肺军团菌参与调控宿主泛素化系统的复杂过程。

**关键词:** 嗜肺军团菌, 效应因子, 泛素化, 生物学结构, 分子机制

**Effector and molecular mechanism of *Legionella pneumophila* regulating host ubiquitination pathway: a review**HUANG Yini<sup>1</sup> GUAN Hongxin<sup>1,2</sup> OUYANG Songying<sup>\*1,2</sup>

1 College of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350117, China

2 Fujian Normal University, Biomedical Research Center of South China, Fuzhou, Fujian 350117, China

**Abstract:** *Legionella pneumophila* secretes a large number of effectors into the cytoplasm through its unique Dot/Icm type-IVB secretion system, among which there are more than ten effectors known to participate in regulation of host ubiquitination. These effectors achieve the purpose of evading surveillance by the host immune system and proliferation by regulating the host ubiquitination pathway. The effectors involved in regulating the host ubiquitination pathway include AnkB, SidC, LubX, SidH, LegU1, GobX, RavD, DupA, DupB, SidJ, Ceg23, MvcA, MavC and SidE family proteins. Through the gradually in-depth study of the functional experiments and structural biology of these effect factors, their relatively complete molecular mechanism has gradually been revealed. This article reviews several important *L. pneumophila* effectors and their biological structure and molecular mechanism, which is helpful to comprehensively

**Foundation items:** National Natural Science Foundation of China (31770948, 31570875); Marine Economic Development Subsidy Project of Fujian Province (FJHJF-L-2020-2)

**\*Corresponding author:** Tel: 86-591-22868199; E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

**Received:** 30-09-2020; **Accepted:** 12-12-2020; **Published online:** 18-01-2021

**基金项目:** 国家自然科学基金(31770948, 31570875); 福建省海洋经济发展补助项目(FJHJF-L-2020-2)

**\*通信作者:** Tel: 0591-22868199; E-mail: ouyangsy@fjnu.edu.cn

**收稿日期:** 2020-09-30; **接受日期:** 2020-12-12; **网络首发日期:** 2021-01-18

understand the complex process of *Legionella pneumophila* involved in regulating the host ubiquitination system.

**Keywords:** *Legionella pneumophila*, effector, ubiquitination, biological structure, molecular mechanism

泛素化(Ubiquitination)是一种真核细胞内广泛存在的蛋白质修饰过程,在细胞生命周期各个方面都发挥重要作用。泛素化可调控蛋白质的稳定性、定位以及互作,而且参与转录调控、细胞生长及凋亡、囊泡运输等生理过程<sup>[1-2]</sup>。最常见的泛素化途径是由三级酶联反应实现的经典泛素化途径:首先,E1泛素激活酶(Ubiquitin-Activating Enzyme,简称E1s)利用ATP提供的能量催化泛素(Ubiquitin, Ub)分子C端赖氨酸(Lys)残基的羧基基团与自身的半胱氨酸(Cys)残基的巯基基团形成高能硫酯键,从而活化泛素分子;然后,激活的泛素分子再通过转硫醇作用连接至E2泛素结合酶(Ubiquitin-Conjugating Enzymes,简称E2s)的Cys残基上;接着在E3泛素连接酶(Ubiquitin-Ligase Enzymes,简称E3s)作用下,泛素分子的羧基末端与靶蛋白Lys残基的 $\epsilon$ -氨基之间形成异肽键而将泛素分子转移到靶蛋白上<sup>[3]</sup>。另外,被泛素化修饰的蛋白质还可以被一类称为去泛素化酶(Deubiquitinases, DUBs)的蛋白质催化,DUBs催化裂解泛素与靶蛋白之间的酯键、肽键或异肽键,进而将泛素从底物蛋白上切下,并将泛素化的底物还原为其原始状态,使泛素化途径成为一个可逆的过程<sup>[4]</sup>。

原核细胞不具有编码泛素分子的基因,因此,细菌缺乏典型的泛素化系统<sup>[5]</sup>。许多病原菌能够有效地“劫持”宿主泛素化系统并据为己用,以成功逃避宿主免疫监视并在宿主细胞内进行复制<sup>[6]</sup>。嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)作为一种需氧革兰氏阴性杆菌,兼性寄生于人类单核和巨噬细胞内,引起获得性非典型肺炎<sup>[7]</sup>。其在感染宿主时,可以通过特有的Dot/Icm Type-IVB (Defective Organelle Trafficking/Intracellular Multiplication, Dot/Icm)分泌系统向宿主胞浆内分泌多达300余种的效应因子,

这些效应因子的功能包括形成感染囊泡LCV (Legionella-Containing Vacuole)<sup>[8]</sup>、抑制宿主免疫信号传导<sup>[9]</sup>、“劫持”宿主胞内重要调控蛋白<sup>[10-11]</sup>以及诱导宿主细胞的凋亡和裂解等<sup>[12-13]</sup>。此外,研究表明嗜肺军团菌效应蛋白可以通过不同方式调控和利用宿主泛素化系统,这些效应因子或是通过模仿经典的泛素化机制进行调控,或是利用全新的模式发挥作用。一些新型泛素化途径的发现表明军团菌效应因子泛素化调控途径比想象中更加丰富和复杂。目前,已发现的参与泛素化调控过程的嗜肺军团菌效应蛋白有很多,根据其作用方式可以划分为3类:(1)通过发挥E3泛素连接酶活性介导宿主细胞内泛素化过程的效应蛋白;(2)能够利用全新模式,完成独立于E1s与E2s的非经典泛素化过程的效应蛋白;(3)在宿主细胞泛素化过程的后期发挥去泛素化酶活性的效应蛋白。本研究小组对于后2类嗜肺军团菌效应蛋白的探究做了大量工作,结合已报道的相关文章,本文将对这3种类型的嗜肺军团菌效应因子及其分子机制进行详细阐述。

## 1 效应因子模仿E3s对宿主泛素分子进行“劫持”

在嗜肺军团菌效应因子介导的泛素化过程中,最常见的一种模式是:效应蛋白通过模仿宿主E3s的功能,“劫持”宿主泛素分子,进而完成细菌自身的泛素化过程。在真核细胞中,E3s是泛素调节系统中种类最多的一类酶,其在很大程度上决定了底物特异性<sup>[14]</sup>。根据E3s的结构组成,其可以分为单亚基E3s和多亚基E3s两大类(图1),单亚基亚类根据其所含结构域不同可以分为HECT (Homologous to the E6-AP C-Terminus)家族、RING (Really Interesting New Gene)家族和U-Box家族3种类型;多亚基亚类可以分为SCF

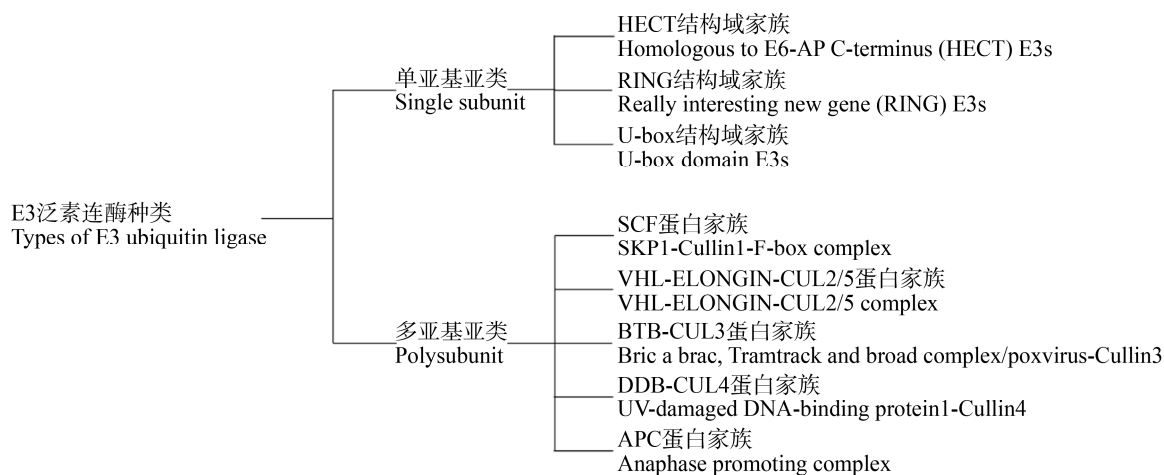


图 1 E3 泛素连接酶种类

Figure 1 Types of E3 ubiquitin ligase

(SKP1-Cullin1-F-box)、VHL-ELONGIN-CUL2/5、BTB-CUL3 (Bric a brac, Tramtrack and Broad Complex/Poxvirus-Cullin3)、DDB-CUL4 (UV-Damaged DNA-Binding Protein1-Cullin4)和 APC (Anaphase Promoting Complex) 5 种类型<sup>[15-16]</sup>。其中, 单亚基类的 U-Box 型 E3s 和多亚基类的 SCF 型 E3s 是嗜肺军团菌效应蛋白的主要模仿对象。U-Box 型 E3s 广泛存在于真核生物中, 此类蛋白的 C 端都包含一个大约 70 个氨基酸残基的保守性 U-Box 结构域, 该结构域是 E3 泛素连接酶发挥功能的关键区域<sup>[17]</sup>。SCF 型 E3s 通常以复合体的形式存在, 其由 SKP1、CUL1、RBX1 和 F-Box 这 4 个亚基组成, 这些亚基分别发挥各自的功能, 共同完成 E3 泛素化连接酶的活性: 其中 CUL1 作为支架蛋白连接 SKP1 和 RBX1, SKP1 作为 SCF 型 E3 连接酶复合物的核心成分同时能够结合 F-Box 蛋白中的 F-Box 结构域<sup>[18]</sup>。在泛素化过程中, E2s-Ub 通过与 RBX1 的 RING-Finger 结构域相互作用而结合在 RBX1 上, 而需要被泛素化的底物则结合在 F-Box 蛋白的底物结合区, 最终完成催化泛素化过程<sup>[19-20]</sup>。

原核生物不具有编码 SKP1、CUL1 和 RBX1 的基因, 因此, 嗜肺军团菌中有些效应蛋白可以模

仿 F-Box 蛋白的功能, 与宿主细胞中的 SKP1、CUL1 和 RBX1 结合形成 SCF 复合体, 从而发挥 E3 泛素连接酶作用<sup>[21]</sup>。目前, 嗜肺军团菌中已鉴定出含有 U-Box 结构域的蛋白有 2 个, 含有 F-box 结构域的蛋白有 5 个, 此外还有具有新型结构域的 E3 泛素连接酶, 如 SdcA/SidC。这些效应蛋白研究情况如表 1 所示。

### 1.1 含 U-box 结构域的效应因子

目前嗜肺军团菌中鉴定出具有 U-Box 结构域的蛋白是 LubX (Lpg2830)和 GobX (Lpg2455)。LubX 包含 2 个 U-Box 结构域, 分别位于 N 端 (U-Box1)和 C 端 (U-Box2), 尽管这 2 个 U-Box 结构域在结构方面非常相似, 但在功能方面却具有明显差异; 其中, N 端的 U-Box1 结构域为典型的 E2s 结合区域, 能够结合 UBE2D1、UBE2D2、UBE2D3、UBE2E、UBE2W 及 UBEL6 等 E2s, 当其结构域中 Ile39 残基突变为 Ala39, LubX 丧失了体外泛素化活性; 而 C 端 U-Box2 结构域中相应位点氨基酸 Ile134 发生突变并没有影响 LubX 的 E3s 活性, 这一现象表明 LubX 中只有 U-Box1 结构域参与了与 E2s 的相互作用; LubX 与 UBE2D2 复合物结构进一步证实了 U-Box1 与 U-Box2 之间的功能差异性: U-Box1 中与 UBE2D2 相互作用所涉及的 18 个残

表 1 具有 E3 泛素连接酶活性的嗜肺军团菌效应蛋白汇总

Table 1 Summary of *Legionella pneumophila* effector proteins with E3 ubiquitin ligase activity

基因 Gene	效应蛋白 Effector	结构特点 Structural features	功能注释 Function	参考文献 References
Lpg2455	GobX	U-box 结构域蛋白 U-box Protein	E3 泛素连接酶活性 E3 Ubiquitin-ligase enzymes	[22]
Lpg2830	LubX	U-box 结构域蛋白 U-box Protein	E3 泛素连接酶活性 E3 Ubiquitin-ligase enzymes	[23-24]
Lpg0171	LegU1	F-box 结构域蛋白 F-box Protein	E3 泛素连接酶活性 E3 Ubiquitin-ligase enzymes	[18,25]
Lpg1408	LicA	F-box 结构域蛋白 F-box Protein	具体功能尚不明确 Unknown	[24]
Lpg2144	LegAU13/AnkB	F-box 结构域蛋白 F-box Protein	E3 泛素连接酶活性 E3 Ubiquitin-ligase enzymes	[26-27]
Lpg2224	PpgA	F-box 结构域蛋白 F-box Protein	具体功能尚不明确 Unknown	—
Lpg2525	—	F-box 结构域蛋白 F-box Protein	具体功能尚不明确 Unknown	—
Lpg2510/Lpg2511	SdcA/SidC	无结构类似的蛋白 No structurally similar protein	E3 泛素连接酶活性 E3 Ubiquitin-ligase enzymes	[28-29]

注：—：该效应蛋白无具体蛋白名称或无相关文献报道  
Note: —: The effector has no specific protein name or related literature report

基在 U-Box2 对应位点中有 15 个发生了变化，因此 C 端 U-Box2 结构域并不能发挥 E3s 活性，推测其功能与底物结合有关<sup>[23]</sup>。LubX 具有多个靶点，例如嗜肺军团菌的另一个效应蛋白 SidH 和宿主的 CLK1 (Cdc2-Like Kinase 1)蛋白激酶<sup>[23-24]</sup>。目前，SidH 在军团菌感染过程中的功能未知，但在酵母系统中，SidH 的表达明显导致了细胞生长停滞现象，与 LubX 共表达后，这一现象又有所缓解，因此 LubX 可能对 SidH 进行泛素化修饰，并抑制其功能的发挥<sup>[23]</sup>。CLK1 蛋白激酶是 LubX 的另一个多聚泛素化底物，LubX 可以在体外条件下与 CLK1 结合并对其泛素化修饰<sup>[24]</sup>。CLK1 是一种双特异性蛋白激酶，可以通过将酪氨酸和丝/苏氨酸残基底物蛋白磷酸化来调控细胞内信号传导<sup>[30]</sup>。尽管 CLK1 在细胞信号传导中有着重要作用，但是目前 LubX 多聚泛素化 CLK1 蛋白激酶的生物意义还不明确。

GobX 可以利用宿主细胞催化 2 种不同的翻译后修饰，分别为泛素化修饰和 s-棕榈酰化修饰；GobX 蛋白的核心区具有典型的 U-Box 结构域特

征，而且在与 E2 泛素结合酶 UBE2D1、UBE2D2、UBE2D3 及 UBE2E1 的反应中显示出 E3 泛素连接酶活性；其 C 端区域具有 s-棕榈酰化活性，催化疏水性棕榈酸酯共价结合到 GobX 的 Cys175 残基上，这种修饰使得 GobX 能够特异性定位于高尔基体<sup>[22]</sup>。GobX 具有 2 种翻译后修饰机制的这一特点显示出嗜肺军团菌中一种效应蛋白可能发挥出多种不同功能，从而更有利于嗜肺军团菌在宿主细胞中生长增殖。但目前，GobX 的泛素化和 s-棕榈酰化 2 种作用机制之间有何联系以及 GobX 的泛素化底物有待进一步研究。

1.2 含 F-Box 结构域的效应因子

嗜肺军团菌中鉴定出含有 F-Box 结构域的蛋白有 5 种，它们是 LegU1 (Lpg0171)、AnkB (Lpg2144)、LicA (Lpg1408)、PpgA (Lpg2224)和 Lpg2525<sup>[18]</sup>。其中，LegU1、AnkB 和 LicA 能够与哺乳动物细胞中 SKP1 相互作用，但只有前两者能够形成完整 SCF 复合体并发挥 E3 泛素连接酶活性，LicA 虽能与 SKP1 结合，却不能进一步与 CUL1 蛋白结合形成 SCF 复合体而发挥 E3 泛素连接酶活性(图 2)<sup>[18]</sup>。

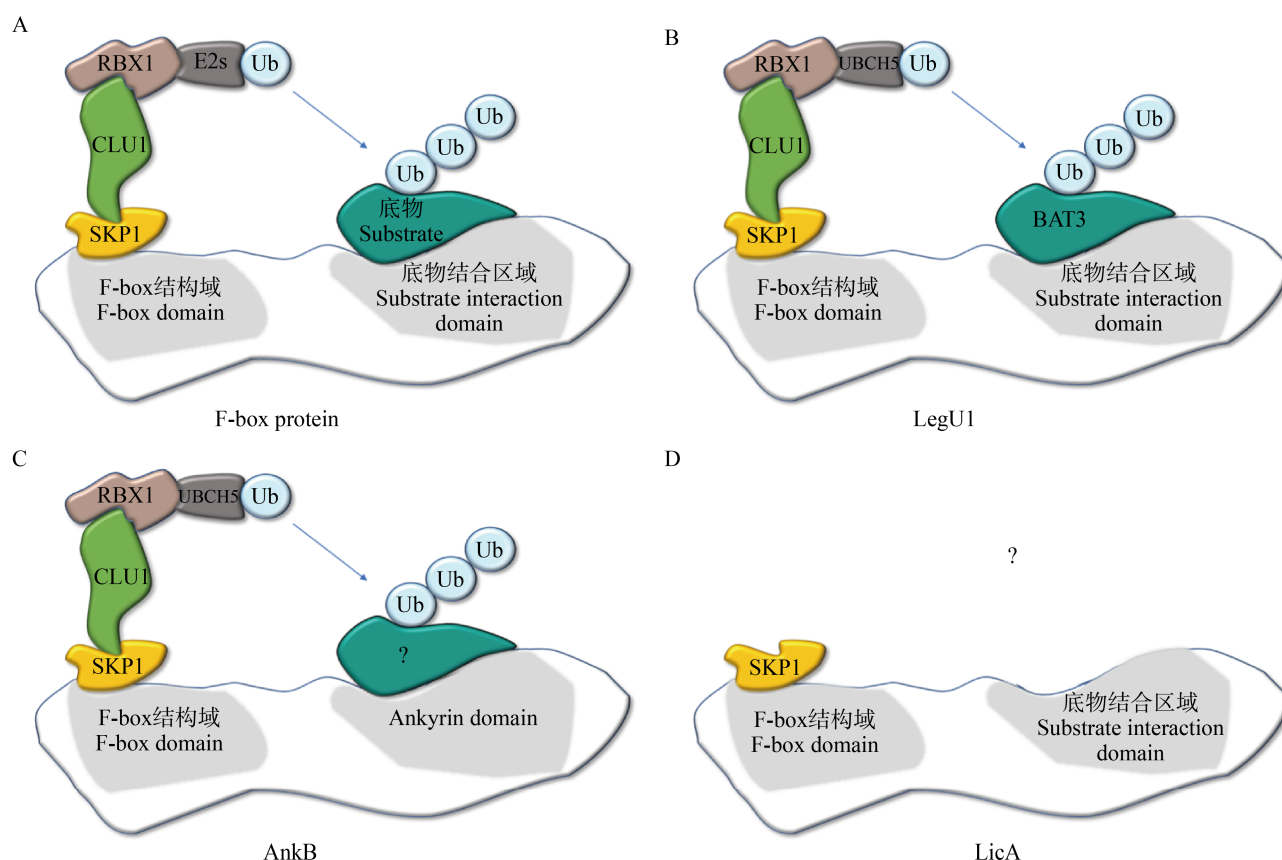


图2 含 F-box 结构域蛋白结构特征<sup>[18]</sup>

Figure 2 Structural features of proteins with F-box domain<sup>[18]</sup>

注: A: 典型 F-box 蛋白结构特征; B: LegU1 在宿主细胞中参与泛素化调节的作用机制; C: AnkB 参与宿主细胞中泛素化调节, 但其作用底物尚不明确; D: LicA 只与 SKP1 结合, 不能与 CUL1 相互作用而进一步形成 SCF 型 E3s 复合体

Note: A: Typical F-box protein structure characteristics; B: The mechanism by which LegU1 participates in the regulation of ubiquitination in host cells; C: AnkB is involved in the regulation of ubiquitination in host cells, but its substrate is not clear; D: LicA only binds to SKP1 and cannot interact with CUL1 to form the SCF complex

PpgA 和 Lpg2525 不能与 SKP1 相互作用, 因此推测这 2 种效应蛋白可能不是典型的 F-Box 蛋白<sup>[6,18]</sup>。

LegU1 的三维结构及具体功能目前尚不清楚, 已有的研究表明 LegU1 能够结合宿主蛋白 BAT3 (HLAB-Associated Transcript-3), 并特异地催化其泛素化<sup>[18]</sup>。BAT3 是高等真核生物中含量丰富且高度保守的蛋白, 参与调控细胞凋亡、内质网应激反应等重要过程<sup>[31]</sup>。LegU1 还能以 BAT3-LegU1 复合物的形式与另一效应蛋白 Lpg2160 相互作用, 猜测嗜肺军团菌可能通过效应蛋白 LegU1 和 Lpg2160 干扰 BAT3 活性, 进一步调控一些重要的细胞过程<sup>[18,25]</sup>。

AnkB 的结构由 2 部分组成, 分别为 F-Box 结构域和 Ankyrin 结构域。F-Box 结构域采用这类蛋白三  $\alpha$  螺旋的典型的折叠方式, 且包含了 Leu9 和 Pro10 等 F-Box 蛋白的保守性残基<sup>[26]</sup>。当 AnkB 与 SKP1 蛋白结合时, F-Box 结构域嵌入 SKP1 蛋白表面由 3 个  $\alpha$  螺旋组成的凹槽中, 进而与宿主细胞中的其他 SCF 成分组建成一个完整的 SCF 复合体, 发挥 E3s 活性; 但当 Leu9 和 Pro10 这些氨基酸发生突变时, 突变体 AnkB 无法与宿主 SKP1 蛋白结合<sup>[26]</sup>。Ankyrin 结构域由 3 个锚蛋白重复序列 (Ankyrin Repeats, ANK) 组成, 短的锚蛋白重复序列夹在 2 个较长的锚蛋白重复序列中间, 每个锚蛋



白重复序列都采用螺旋-转角-螺旋的方式折叠<sup>[26]</sup>。ANK 基序普遍存在于生物体中,其主要功能是介导蛋白与蛋白之间的互作,因此,该结构域在 AnkB 中发挥特异性识别并结合底物的功能<sup>[26,32]</sup>。AnkB 可以通过 K48 型多聚泛素化链的方式将宿主细胞中的泛素分子定向到 LCV 和底物蛋白上,或在宿主细胞被感染的情况下,通过泛素化宿主蛋白使其被蛋白酶体降解为游离氨基酸,为嗜肺军团菌感染增殖提供碳、氮和能量,从而促进细菌在宿主胞内的增殖<sup>[26-27]</sup>。

### 1.3 具有新型结构域的 E3 泛素连接酶 SidC/SdcA

SidC 及其同源蛋白 SdcA 利用其自身独特的结构特点,实现由一种效应蛋白调控 2 个独立的细胞途径——泛素化途径和磷酸肌醇途径的过程。SidC/SdcA 的结构信息显示其由 4 个结构域组成,

分别为 SNL 结构域(SidC N-Terminal Ubiquitin Ligase Domain)、P4C 结构域[PI(4)P Binding of SidC Domain]、INS 结构域和功能未知的 CTD 结构域,这 4 个结构域紧密连接形成一个拱形结构(图 3A, 3B); SNL 结构域是发挥 E3 泛素连接酶功能的区域,其具有保守的 C-H-D 催化三联体活性中心(Cys46-His444-Asp446),三联体中的天冬氨酸和组氨酸残基可以辅助泛素分子从 E2s 转移至 SidC,并且有利于 SidC 与宿主自身泛素连接酶竞争性结合 E2s-Ub 复合物;P4C 结构域由 4 个相互反向的  $\alpha$  螺旋构成,是磷脂酰肌醇-4-磷酸[PI(4)P]的结合区域,SidC/SdcA 通过 P4C 结构域与 PI(4)P 结合而被定位到 LCV 上;SidC/SdcA 结构显示,P4C 结构域覆盖了 SNL 结构域中的泛素化连接酶催化位点(图 3C、3D),这一独特结构特征可能是 SidC

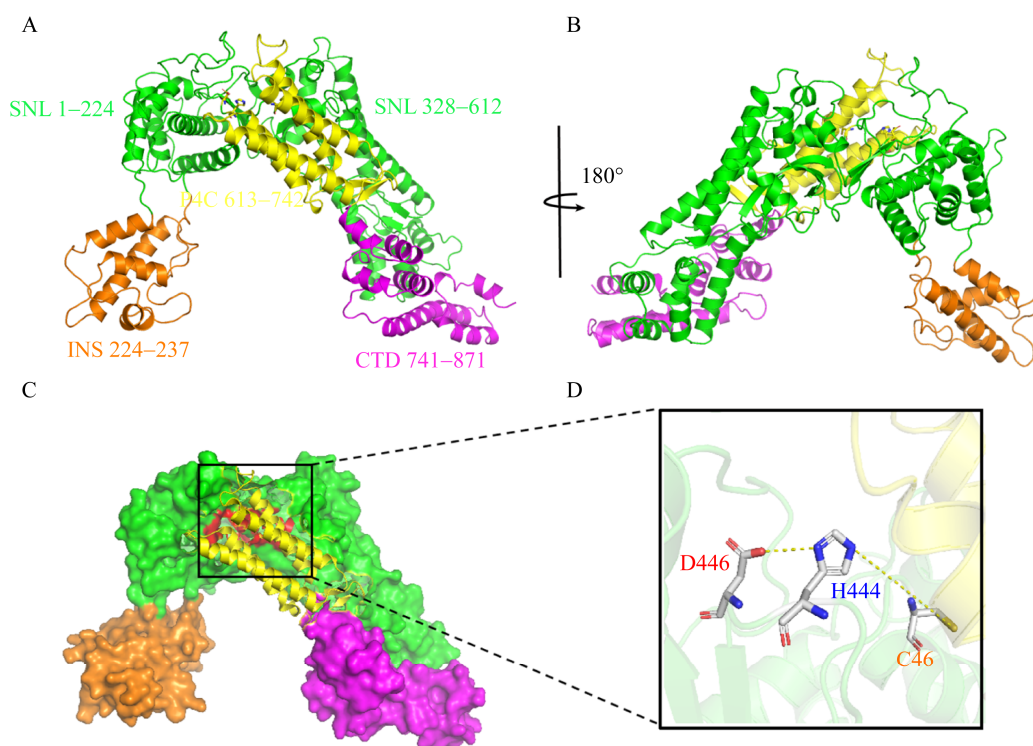


图 3 嗜肺军团菌效应蛋白 SidC 结构特征

Figure 3 Structural characteristics of *Legionella pneumophila* effector SidC

注: A、B: SidC 包含的 4 个结构域: SNL 结构域、P4C 结构域、INS 结构域和 CTD 结构域紧密连接形成一个拱形; C、D: SidC 的 P4C 结构域覆盖了 SNL 结构域中的泛素化连接酶催化位点(D446-H444-C46)

Note: A, B: SidC contains four domains: SNL domain, P4C domain, INS domain and CTD domain, they are tightly connected to form an arch; C, D: The P4C domain of SidC covers the catalytic site of the ubiquitinated ligase which in the SNL domain (D446-H444-C46)

蛋白分子内部进行调控的机制, P4C 结构域可能是控制 SNL 结构域发挥 E3s 活性的开关: 在 P4C 结构域结合 LCV 上的 PI(4)P 之前, SNL 结构域中的酶活位点被 P4C 结构域覆盖, SidC/SdcA 发挥较低的 E3 泛素连接酶活性, 当 P4C 结构域结合 PI(4)P 后, 覆盖区域被打开, 酶活位点暴露出来, SidC/SdcA 可以发挥较高的 E3s 活性; INS 结构域可能介导了 SidC/SdcA 对 E2s 的选择, 虽然 SdcA 与 SidC 有 72% 的序列相似性, 但二者对于 E2s 的亲合力有明显差别, SidC 与 E2 酶 UbcH7 具有较强的亲合力, 而 SdcA 更倾向于与 E2 酶 UbcH5 结合<sup>[28]</sup>。当 SidC/SdcA 的催化活性中心 Cys46 位点被突变为 Ala46, SidC/SdcA 失去了募集内质网蛋白和泛素分子至 LCV 的能力, 因此 SidC/SdcA 的 E3 泛素连接酶活性对于内质网蛋白和泛素分子募集到 LCV 起着重要作用<sup>[28-29]</sup>。今后鉴定 SidC/SdcA 泛素化底物的研究将阐明 SidC/SdcA 的 E3 泛素连接酶活性对于嗜肺军团菌在宿主细胞内复制的意义。

## 2 以 MavC 及 SidE 家族蛋白为代表的效应因子调控非经典泛素化途径

随着嗜肺军团菌效应因子的生物学结构和功能的不断探究, 近年来科学家们发现了由嗜肺军团菌效应因子 MavC/MvcA 和 SidE 家族蛋白调控的非常规泛素化途径。这 2 种新型泛素化途径与经典泛素化途径的不同点在于, 它们是不依赖于三级酶联反应而进行的泛素化修饰过程(图 4), 这些新调控机制的发现有助于人们更深入地了解病原菌的侵染机制。

### 2.1 由 MavC (Lpg2147)及 MvcA (Lpg2148)调控的泛素化系统

嗜肺军团菌的效应因子 MavC (Lpg2147)通过转谷氨酰胺酶活性将 Ub 的谷氨酰胺残基(Q40)与 E2 泛素结合酶(UBE2N)的赖氨酸残基(K92)催化形成异肽键, 并完成对宿主 UBE2N 的非典型泛素化过程<sup>[33]</sup>。这一“劫持”过程阻止了 UBE2N 参与宿主细胞蛋白形成 K63 型多聚泛素化链, 从而

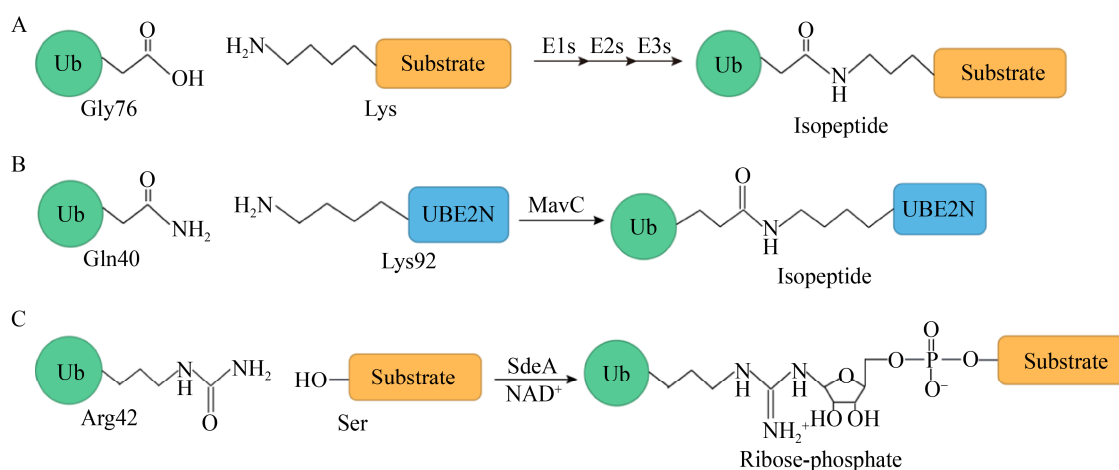


图 4 3 种不同方式的泛素化途径

Figure 4 Three different ways of ubiquitination pathways

注: A: 由 E1s、E2s、E3s 调控的经典泛素化过程; B: MavC 通过转谷氨酰胺酶活性催化 Ub 的谷氨酰胺残基(Q40)与 E2 泛素结合酶(UBE2N)的赖氨酸残基(K92)之间形成异肽键; C: 以 SdeA 为代表的 SidE 家族蛋白对底物进行磷酸核糖泛素化修饰

Note: A: The classic ubiquitination process regulated by E1s, E2s, and E3s; B: MavC catalyzes the formation of isopeptide bonds between the glutamine residue (Q40) of Ub and the lysine residue (K92) of E2 ubiquitin conjugase (UBE2N) through transglutaminase activity; C: SidE family proteins represented by SdeA undergo phosphoribose ubiquitination modification on the substrate

抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活<sup>[34]</sup>。此外,我们发现嗜肺军团菌的另一效应因子 MavC (Lpg2148)可以特异性逆转由 MavC 催化的泛素化过程,从而在感染期间对宿主信号进行精确的时空调控<sup>[34]</sup>。

MavC 与 MvcA 的一级序列相似性超过 50%,结构也十分相似,它们都由一个插入域(Insertion Domain, INS)、一个球状中心结构域(Core Globular Domain, CG)及一个尾部  $\alpha$  螺旋延伸区域(Tail Domain)组成,整体呈现一个弯月形(图 5A、5B)<sup>[34-35]</sup>。MavC 与 MvcA 的结构对于其功能有着至关重要的影响,它们的 3 个结构域相互配合,共同完成催化过程;MavC/MvcA 的 INS 参与对 UBE2N 的特异性识别,但是二者由于局部关键氨基酸及其结构的差异导致对 UBE2N 的亲合力具有

明显差别,MavC 与 UBE2N 有较高的亲和力并直接识别 UBE2N<sup>[34-35]</sup>。在 MavC 催化 UBE2N 泛素化的过程中,Tail 结构域表面所带的负电荷与 Ub 表面所带的正电荷相互吸引,使 MavC 与 Ub 可以稳定结合;与 Ub 结合后的 Tail 结构域发生逆时针旋转,使 Ub 在空间上可以更靠近 UBE2N 和酶活中心;INS 结构域识别并结合 UBE2N 后也会发生逆时针旋转,同样使其在空间上可以更靠近 Ub 和酶活中心<sup>[35]</sup>。最终在其 CG 结构域中的 Cys-His-Gln 催化三联体的作用下,发生转谷氨酰胺反应,使 Ub 与 UBE2N 之间由异肽键连接(图 5A);但在 MvcA 对由 MavC 催化的泛素化途径进行逆转的过程中,MvcA 识别底物 UBE2N-Ub,并在其 CG 结构域中 Cys-His-Gln 催化三联体的脱氨酶作用下,

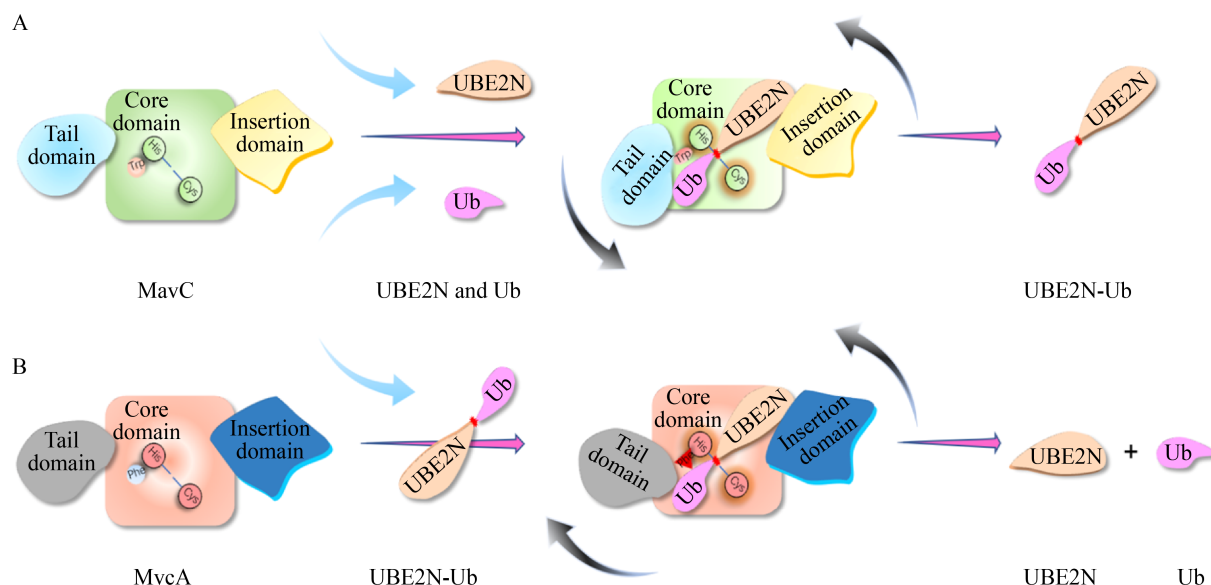


图 5 效应因子 MavC 及 MvcA 作用机制<sup>[35]</sup>

Figure 5 The mechanism of effector MavC and MvcA<sup>[35]</sup>

注: A: MavC 由 INS 结构域、CG 结构域、Tail 结构域三部分组成,INS 结构域和 Tail 结构域分别识别并结合 UBE2N 与 Ub。在结合 UBE2N 与 Ub 之后,INS 结构域与 Tail 结构域都发生逆时针旋转,使 UBE2N 与 Ub 靠近 CG 结构域的酶活中心,MavC 催化 UBE2N 与 Ub 之间的异肽连接;B: MvcA 与 MavC 类似,也由 INS 结构域、CG 结构域、Tail 结构域三部分组成。位于 CG 结构域的催化中心与 UBE2N-Ub 结合后发挥脱氨酶活性,INS 结构域与 Tail 结构域向相反方向旋转,打开 UBE2N-Ub 间的异肽键

Note: A: MavC is composed of INS domain, CG domain, and Tail domain. The INS domain and Tail domain recognize and bind UBE2N and Ub, respectively. After combining UBE2N and Ub, both the INS domain and Tail domain rotate counterclockwise, making UBE2N and Ub close to the enzymatic center of the CG domain, and MavC catalyzes the isopeptide connection between UBE2N and Ub; B: MvcA is similar to MavC, and also consists of three parts: INS domain, CG domain, and Tail domain. The catalytic center located in the CG domain binds to UBE2N-Ub and exerts deaminase activity. The INS domain and Tail domain rotate in opposite directions to open the isopeptide bond between UBE2N-Ub



催化打开 UBE2N-Ub 之间的异肽键, MvcA 与 UBE2N 亲和力较低, 带正电荷的 Tail 结构域又对 Ub 具有排斥作用, 促使了 Ub 和 UBE2N 从 MvcA 上分离, 最终完成去泛素化过程(图 5B)<sup>[34-35]</sup>。MavC 与 MvcA 结构高度相似, 二者 RMSD 为 0.613 Å, 却发挥相反活性。基于结构的序列比对显示, 二者关键区域中个别氨基酸不同, 比如: MavC 中的 Try255 位点对应 MvcA 中为 Phe268。通过对这 2 个位点的氨基酸进行逆向突变, 发现 MavC W255F 突变体及 MvcA F268W 突变体相对于其 WT 型蛋白, 酶活都发生了部分逆转, 这一现象证明这 2 个位点的氨基酸对于 2 个效应蛋白所发挥的活性具有至关重要的影响<sup>[35]</sup>。

## 2.2 由 SidE 家族蛋白介导的非经典泛素化过程

嗜肺军团菌中的 SidE 家族蛋白有 4 个成员: SidE、SdeA、SdeB 及 SdeC, 它们可以对多种宿主蛋白进行非典型的泛素化修饰<sup>[36]</sup>。该家族蛋白结构包含 4 个结构域, 从 N 端到 C 端分别为 DUB 结构域 (Deubiquitinase Domain)、PDE 结构域 (Phosphodiesterase Domain)、mART 结构域 (mono-ADP-Ribosyltransferase Domain) 及 CTD 结构域 (C-Terminal Domain)<sup>[37]</sup>。以 SdeA 为代表的 SidE 家族蛋白参与的催化过程分为两步, 分别由 mART 结构域和 PDE 结构域进行催化: 首先, 泛素分子 Arg42 先在 mART 结构域的催化下进行 ADP 糖基化修饰, 形成 ADP 糖基化泛素 (ADP-Ribosylated Ubiquitin, ADPR-Ub); 随后, 由 PDE 结构域切割 ADPR-Ub 中的焦磷酸键生成磷酸核糖泛素 (Phospho-Ribosylated Ubiquitin, PR-Ub), 并同时 PR-Ub 共价连接到底物或 SdeA 自身的丝氨酸残基上(图 6A)<sup>[38-39]</sup>。目前尚不清楚的是, mART 结构域中形成的 ADPR-Ub 是如何传递到 PDE 结构域中进行下一步反应的。推测可能是 2 个或多个 SidE 家族蛋白在体内彼此接近, 一个蛋白中 mART 结构域产生的 ADPR-Ub 被相邻蛋白中 PDE 结构域使用<sup>[37]</sup>。SidE 家族蛋白可以 PR 泛素化多种宿

主蛋白, 进而调控多种细胞功能<sup>[40]</sup>。PR 泛素化底物包括 FAM134 家族蛋白、TEX264 和 RTN3 蛋白等内质网调节蛋白, 这些蛋白能将内质网分解成片段, 然后将内质网片段传递到溶酶体中, 再通过内质网吞噬途径降解<sup>[41-42]</sup>。此外, 负责维持内质网框架结构的蛋白 Atlastins 也可被 SidE 家族蛋白 PR 泛素化<sup>[43]</sup>。因此 SidE 家族蛋白调控的磷酸核糖泛素化途径通过 PR 泛素化一些重要的宿主蛋白而干扰细胞凋亡及囊泡运输等细胞过程, 达到成功侵染宿主细胞的目的。

在嗜肺军团菌中存在效应因子 SidJ 可以对 SidE 家族蛋白进行谷氨酰化修饰来限制该家族蛋白的活性, 进而抑制磷酸核糖泛素化途径<sup>[44]</sup>。本研究小组对 SidJ 作用机制的研究发现 SidJ 的 C 端有一个可以结合钙调蛋白 CaM 的 IQ 基序, 在结合 CaM 的情况下, SidJ 的谷氨酰胺酶活性被激活; 接着在 AMP 的介导下, SidJ-CaM 复合物对 SidE 家族蛋白进行谷氨酰化修饰, 被修饰的位点是位于 mART 结构域中的催化活性位点(图 6B)<sup>[44]</sup>。经修饰后的 mART 结构域失去了将 Ub 催化成 ADPR-Ub 的能力, SidE 家族蛋白活性因此受到抑制<sup>[45-46]</sup>。迄今为止, 只在军团菌中发现了磷酸核糖泛素化途径的存在, 这种独特的翻译后修饰机制是否存在于真核细胞中还有待进一步探究<sup>[37]</sup>。随着效应因子功能研究的不断深入, 或许还将发现其他的调控方式, 这些新型非经典泛素化途径的发现对病原体侵染宿主的作用机制提供了新的例证。

## 3 嗜肺军团菌中具有去泛素酶活性的效应蛋白

蛋白质的泛素化是一个可逆的过程, 去泛素酶 (Deubiquitinases, DUBs) 蛋白家族可以通过水解泛素羧基末端的酯键、肽键或者异肽键, 将泛素修饰后的蛋白去泛素化, 从而将泛素分子从底物蛋白中水解释放出来, 从靶蛋白上脱落的泛素分子又可以回收利用<sup>[47-48]</sup>。DUBs 可以被细菌用来调控宿

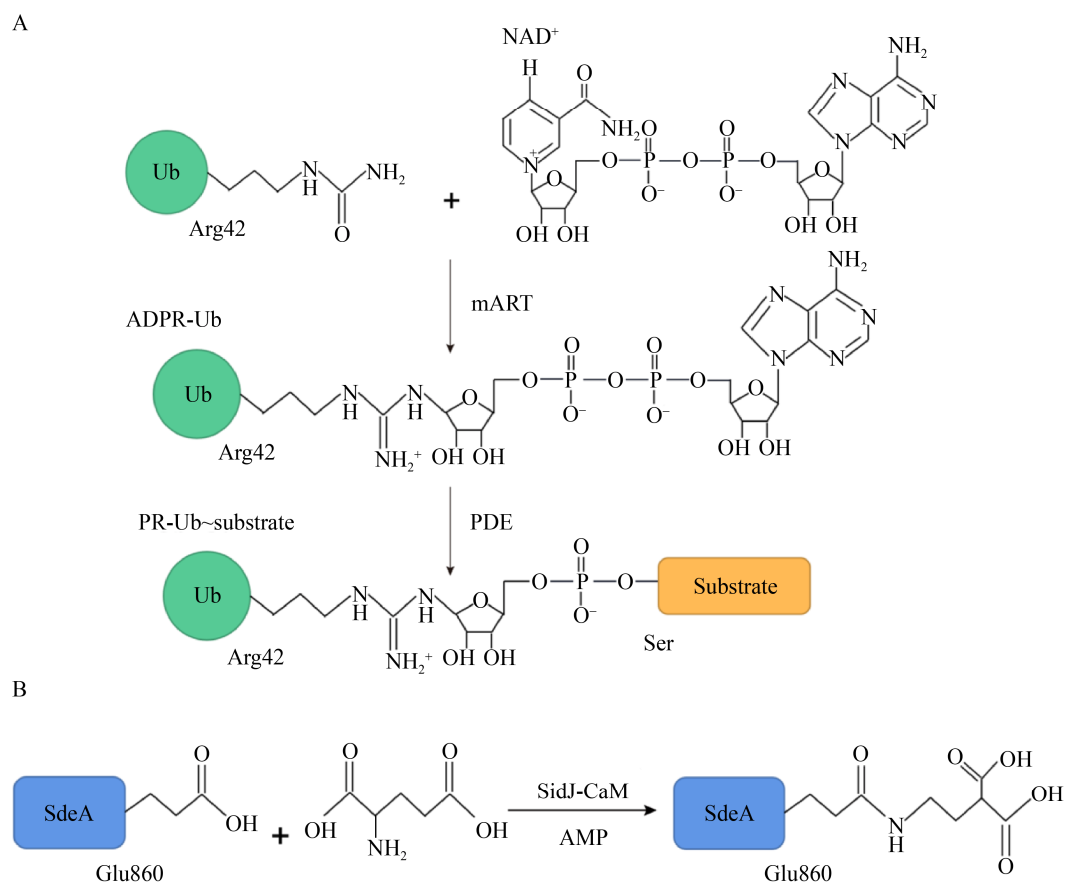


图 6 SidE 家族蛋白及效应蛋白 SidJ 分子机制<sup>[39]</sup>

Figure 6 Molecular mechanism of SidE family proteins and effector SidJ<sup>[39]</sup>

注：A：泛素分子第 42 位精氨酸先在 mART 结构域的催化下被修饰成 ADPR-Ub，随后，PDE 结构域进一步切割 ADPR-Ub 中的磷酸二酯键，生成 PR-Ub 并同时将其共价连接到底物的丝氨酸残基上；B：效应因子 SidJ 结合钙调蛋白 CaM 后，在 AMP 介导下对以 SdeA 为代表的 SidE 家族蛋白进行谷氨酰化修饰

Note: A: The arginine at position 42 of the ubiquitin molecule is first modified into ADPR-Ub under the catalysis of the mART domain. Then, the PDE domain further cleaves the phosphodiester bond in ADPR-Ub to generate PR-Ub, and simultaneously the PR-Ub is covalently linked to the serine residue of the substrate; B: After the effector SidJ binds to calmodulin CaM, the SidE family proteins represented by SdeA are glutamated under the mediation of AMP

主的泛素化系统，以抑制宿主的免疫系统，并最终达到成功感染宿主细胞的目的<sup>[49]</sup>。近年来的研究发现，嗜肺军团菌中同样包含多个具有 DUBs 活性的效应蛋白，这些效应蛋白包括 DupA、DupB、RavD 和 Ceg23 等。

### 3.1 参与调控磷酸核糖泛素化途径的去泛素化酶 DupA/B

在对效应因子 SdeA 功能研究时发现，SdeA 具有一个 PDE 结构域，该结构域可以催化磷酸核糖泛素化底物的生成<sup>[37]</sup>。进一步研究发现，效应

因子 Lpg2154、Lpg2509、Lpg1496、Lpg2239 及 Lpg2523 中都包含有 PDE 结构域<sup>[50]</sup>。其中 Lpg2154 和 Lpg2509 具有 70% 相似性，它们都能有效地从磷酸核糖泛素化底物中水解释放出 PR-Ub，因此被命名为 DupA (Deubiquitinase for PR-Ubiquitination) 和 DupB；DupA 与 DupB 通过催化 PR-Ub 的磷酸基团与底物丝氨酸之间的磷酸酯键断裂，使磷酸核糖泛素化的底物释放出 PR-Ub，并还原底物<sup>[51]</sup> (图 7)。DupA/B 及 SidJ 都可以参与调控由 SidE 家族蛋白介导的磷酸核糖泛素化途径，其差别在于

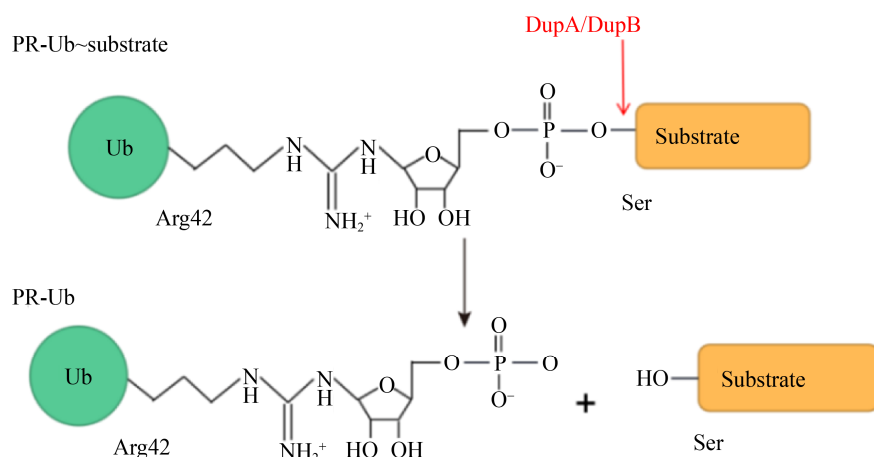


图7 效应蛋白 DupA/DupB 分子机制

Figure 7 Molecular mechanism of effector DupA/DupB

DupA/B 与 SidJ 作用对象及结果不同, DupA/B 针对磷酸核糖泛素化底物发挥去泛素酶活性<sup>[50]</sup>, SidJ 则是作用于 SidE 家族蛋白的酶活位点, 对 SidE 家族蛋白的功能进行抑制<sup>[44]</sup>。DupA/B 与 SidJ 功能的发现让磷酸核糖泛素化途径趋于完整: DupA 和 DupB 可能在感染早期就开始发挥作用, 并持续在感染过程中将磷酸核糖泛素化的底物去泛素化, 从而将宿主细胞中的磷酸核糖泛素化底物维持在一个可控范围内; 在感染后期, 再由效应蛋白 SidJ 对 SidE 家族蛋白活性进行抑制, 终止磷酸核糖泛素化反应<sup>[50]</sup>。因此, 磷酸核糖泛素化途径通过特异性的去泛素化酶以及 SidE 家族蛋白特异性抑制因子的协调作用完成精准调控。

### 3.2 针对线性泛素链的特异性去泛素化酶 RavD

泛素化链具有多种类型, 泛素分子的 7 个赖氨酸位点(K6、K11、K27、K29、K33、K48 和 K63)及 N 端甲硫氨酸(Met1)位点都可以延伸形成泛素化链<sup>[52-53]</sup>。其中 Met1 连接的线性泛素链是由线性泛素链组装复合物(Linear Ub Chain Assembly Complex, LUBAC)合成的, 其连接形式是以肽键头尾串联的方式连接的<sup>[53]</sup>。线性泛素链在细胞生命中具有重要作用, 当病原体侵入宿主细胞中, 巨噬细胞能识别并“标记”出病原体, 对其进行线性泛素化修饰, 从而激活宿主 NF- $\kappa$ B 免疫信号通

路<sup>[53-54]</sup>。嗜肺军团菌的效应蛋白 RavD 对线性泛素链具有特异性去泛素化酶活性, 其 C 端结构域能够结合磷脂酰肌醇-3-磷酸[PI(3)P]和磷脂酰肌醇-4-磷酸[PI(4)P]从而使 RavD 定位于 LCV 上, 其去泛素化酶结构域位于 N 端, 该结构域的折叠类似于木瓜蛋白酶, 具有 Cys-His-Ser 催化三联体基序, 能够持续性地水解泛素分子 Met1 与 Gly76 之间的肽键, 避免 LCV 上线性泛素链的累积, 达到抑制宿主 NF- $\kappa$ B 免疫信号的目的<sup>[55]</sup>。在军团菌属细菌中, RavD 的同源蛋白也具有切割线性泛素链的去泛素化酶活性, 表明切割线性泛素链是军团菌属细菌在宿主细胞内生存的一个普遍机制<sup>[55]</sup>。由于 RavD 与真核细胞中的去泛素化酶完全不同, RavD 成为研究线性泛素链的全新工具, 为真核细胞信号转导的研究提供了新的思路。

### 3.3 作用于多聚泛素化链的去泛素化酶 Ceg23

军团菌效应蛋白 Ceg23 属于 OTU 家族去泛素化酶, 其对 K63 型多聚泛素化链显示出较高的催化特异性, 能够从 K63 型多聚泛素化修饰的蛋白质中去除泛素分子, 从而对宿主细胞中的泛素化途径进行调控; Ceg23 具有 439 个氨基酸残基, 我们研究小组对 Ceg23 的晶体结构进行解析, 揭示其包含一个经典的 OTU 结构域并具有一个保守疏水性螺旋臂(Helical Arm)和 S1 结合位点(S1 Site); 但

与其他 OTU 家族蛋白不同的是, Ceg23 具有一个独特的插入域(Insertion Domain, INS), S1 结合位点存在于该插入域中<sup>[56]</sup>。在 OTU 家族蛋白中, S1 结合位点是泛素分子的结合区域, 实验表明 Ceg23 中的 INS 结构域可能是 Ceg23 识别并结合泛素分子的关键所在<sup>[49,56]</sup>。目前尚未有 Ceg23 与 Ub 复合物的晶体结构报道, 但是二者的分子对接结果表明, 泛素分子的 C 末端与 Ceg23 的 C29 位点之间可能形成共价连接, 同时 Ceg23 螺旋臂中的疏水性 M144 和 L149 参与了对泛素分子的识别<sup>[56]</sup>。另外, 根据预测, Ceg23 羧基末端包含了 2 个跨膜结构域, 该结构域能够将其定位在内质网上<sup>[56]</sup>。内质网在军团菌感染过程中起重要作用, 其是形成 LCV 膜的主要来源<sup>[57-58]</sup>, 因此 Ceg23 可能用于调节 LCV 上的 K63 型多聚泛素化<sup>[56]</sup>。

#### 4 总结与展望

泛素化修饰调控着真核细胞中一些重要的生命活动<sup>[59-60]</sup>, 如 K48 型泛素化连接能够启动蛋白酶体的降解反应<sup>[61]</sup>; K63 型泛素化连接能够活化部分蛋白进行信号传递<sup>[61-62]</sup>。与此相对应, 细胞内还有一系列的去泛素化酶可以用于调控信号的开闭等<sup>[4]</sup>。在与宿主的长期“博弈”过程中, 病原菌进化出多种方式来干预宿主的泛素化修饰系统, 从而达到增强感染效率和逃避免疫“监视”的目的。近年来报道的嗜肺军团菌效应因子的相关研究为我们深入探索病原菌调控泛素化系统的机制提供了帮助。嗜肺军团菌中 GobX、LubX、LegU1、AnkB 及 SidC 等效应因子通过 E3 泛素连接酶功能对宿主细胞中的泛素系统进行“劫持”<sup>[22-29]</sup>。其中 GobX 及 LubX 含有经典的 U-box 结构域, 从而发挥典型 U-box E3s 功能<sup>[22-24]</sup>; LegU1 及 AnkB 含有 F-box 结构域且能够与宿主中的 SKP1、CLU1 及 RBX1 蛋白结合, 构成完整的 SCF 复合体型 E3s<sup>[25-27]</sup>; SidC 则是通过其 N 端新型的 SNL 结构域结合泛素分子形成 SidC-Ub 中间体, 继而发挥 E3 泛素连接酶活性, 将泛素分子转移至底物<sup>[28-29]</sup>。在对嗜肺军

团菌效应因子功能探究的过程中, 科学家们还发现了可调控非经典泛素化途径的效应因子: MavC 及 SidE 家族蛋白<sup>[33-39]</sup>。MavC 通过转氨酶活性将 Ub 以异肽键的方式连接在 UBE2N 的 K92 及 K94 位残基上, 进而抑制免疫信号的激活<sup>[34-35]</sup>; SidE 家族蛋白无需利用宿主细胞中的 E1s、E2s 及 ATP, 仅利用 NAD<sup>+</sup>作为辅助因子对宿主细胞中多种重要蛋白进行磷酸核糖泛素化修饰, 进而调控宿主内多种重要的细胞过程<sup>[36-39]</sup>。虽然各个效应因子的分子机制存在差异, 但一个显著的特点是, 效应因子之间能够相互调控。例如效应因子 LubX 能够靶向军团菌中另一个效应因子 SidH, 在感染后期对 SidH 进行时间上的精准调控<sup>[23]</sup>。MavC 的同源蛋白 MvcA 能针对 MavC 介导的非经典泛素化过程进行逆转, 在感染后期维持宿主细胞正常生理活动<sup>[34-35]</sup>。效应蛋白 SidJ 通过谷氨酸化修饰 SidE 家族蛋白的活性位点从而抑制 SidE 家族蛋白的功能<sup>[44]</sup>, DupA/B 蛋白能特异性去泛素化由 SidE 家族蛋白催化形成的 PR-泛素化底物<sup>[50-51]</sup>。此外, 还有一些效应蛋白在宿主细胞中发挥去泛素化酶功能。如 RavD 能特异性识别并切割线性泛素化链<sup>[55]</sup>; Ceg23 结构类似于 OTU 家族蛋白, 对 K63 型多聚泛素化链具有去泛素化酶活性<sup>[56]</sup>。尽管嗜肺军团菌效应因子的功能及分子机制的研究近几年取得突破性进展, 但很多问题还亟待解决。例如, 一些与泛素化调节相关的效应因子具体的分子作用机制有待进一步解析, 除已发现的 MavC 及 SidE 家族蛋白以外是否还存在其他效应因子可调控不同方式的非经典泛素化途径, 以及嗜肺军团菌庞大效应库中的其他重要效应因子所发挥的功能及作用机理等都将是我们进一步研究的课题。

近年来关于病原菌调控宿主泛素化系统的报道相继出现, 例如, 肠出血性大肠杆菌(EHEC)毒力蛋白 NleL 能够结合宿主 JNK 蛋白并对其特定定位点(K68)进行泛素化修饰, 从而通过抑制宿主 JNK/AP-1 通路来促进 EHEC 粘附宿主并形成 A/E

损伤<sup>[63]</sup>; 结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)的效应蛋白PtpA及RV0222可以利用宿主中的泛素分子抑制宿主自身免疫信号通路的激活<sup>[64]</sup>。这些例证表明各种病原菌效应蛋白利用人体泛素化系统抵御人体免疫攻击的机制普遍存在。因此, 对这些效应因子的深入研究有利于了解许多病原体致病过程, 而且对于开展针对性治疗有着重要的意义。嗜肺军团菌作为研究胞内致病菌致病机制的理想模型, 对其效应因子作用机制的不断探究能为更多病原菌的治疗提供新的药物靶点。

## REFERENCES

- [1] Liu X, Wang Q, Chen W, Wang C. Dynamic regulation of innate immunity by ubiquitin and ubiquitin-like proteins[J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2013, 24(6): 559-570
- [2] Shaid S, Brandts CH, Serve H, Dikic I. Ubiquitination and selective autophagy[J]. Cell Death & Differentiation, 2013, 20(1): 21-30
- [3] Wang X, Wei XF, Zhang HQ. Role of protein ubiquitination and its functional importance[J]. Scientia Sinica Vitae, 2015, 45(11): 1074-1082 (in Chinese)  
王翔, 魏潇凡, 张宏权. 泛素化的功能及其意义[J]. 中国科学: 生命科学, 2015, 45(11): 1074-1082
- [4] Sowa ME, Bennett EJ, Gygi SP, Harper JW. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape[J]. Cell, 2009, 138(2): 389-403
- [5] Steele-Mortimer O. Exploitation of the ubiquitin system by invading bacteria[J]. Traffic, 2011, 12(2): 162-169
- [6] Qiu JZ, Luo ZQ. Hijacking of the host ubiquitin network by *Legionella pneumophila*[J]. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 2017, 7: 487
- [7] Mou QQ, Leung PHM. Differential expression of virulence genes in *Legionella pneumophila* growing in *Acanthamoeba* and human monocytes[J]. Virulence, 2018, 9(1): 185-196
- [8] Roy CR, Berger KH, Isberg RR. *Legionella pneumophila* DotA protein is required for early phagosome trafficking decisions that occur within minutes of bacterial uptake[J]. Molecular Microbiology, 1998, 28(3): 663-674
- [9] Kagan JC, Roy CR. *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic Reticulum exit sites[J]. Nature Cell Biology, 2002, 4(12): 945-954
- [10] Abu Kwaik Y. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic Reticulum[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 62(6): 2022-2028
- [11] Ivanov SS, Roy CR. Modulation of ubiquitin dynamics and suppression of DALIS formation by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system[J]. Cellular Microbiology, 2009, 11(2): 261-278
- [12] Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Kwaik YA. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages[J]. Infection and Immunity, 2002, 70(3): 1657-1663
- [13] Banga S, Gao P, Shen XH, Fiscus V, Zong WX, Chen LL, Luo ZQ. *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(12): 5121-5126
- [14] Bai C, Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box[J]. Cell, 1996, 86(2): 263-274
- [15] Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P. F-box proteins everywhere[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2006, 9(6): 631-638
- [16] Jia Q, Sun S, Sun TH, Lin WX. Mechanism of F-box protein family in plant resistance response to environmental stress[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2018, 26(8): 1125-1136 (in Chinese)  
贾琪, 孙松, 孙天昊, 林文雄. F-box 蛋白家族在植物抗逆响应中的作用机制[J]. 中国生态农业学报, 2018, 26(8): 1125-1136
- [17] Miyamoto K, Saito K. Concise machinery for monitoring ubiquitination activities using novel artificial RING fingers[J]. Protein Science, 2018, 27(8): 1354-1363
- [18] Ensminger AW, Isberg RR. E3 ubiquitin ligase activity and targeting of BAT3 by multiple *Legionella pneumophila* translocated substrates[J]. Infection and Immunity, 2010, 78(9): 3905-3919
- [19] Gagne JM, Downes BP, Shiu SH, Durski AM, Vierstra RD. The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002, 99(17): 11519-11524
- [20] Schumann N, Navarro-Quezada A, Ullrich K, Kuhl C, Quint M. Molecular evolution and selection patterns of plant F-box proteins with C-terminal kelch repeats[J]. Plant Physiology, 2011, 155(2): 835-850
- [21] De Felipe KS, Pampou S, Jovanovic OS, Pericone CD, Ye SF, Kalachikov S, Shuman HA. Evidence for acquisition of *Legionella* type IV secretion substrates via interdomain horizontal gene transfer[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(22): 7716-7726
- [22] Lin YH, Doms AG, Cheng E, Kim B, Evans TR, Machner MP. Host cell-catalyzed S-Palmitoylation mediates golgi targeting of the *Legionella* ubiquitin ligase GobX[J]. Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(42): 25766-25781
- [23] Quail AT, Urbanus ML, Stogios PJ, Nocek B, Skarina T,



- Ensminger AW, Savchenko A. Molecular characterization of LubX: functional divergence of the U-box fold by *Legionella pneumophila*[J]. *Structure*, 2015, 23(8): 1459-1469
- [24] Kubori T, Shinzawa N, Kanuka H, Nagai H. *Legionella* metaeffector exploits host proteasome to temporally regulate cognate effector[J]. *PLoS Pathogens*, 2010, 6(12): e1001216
- [25] Price CTD, Kwaik YA. Exploitation of host polyubiquitination machinery through molecular mimicry by eukaryotic-like bacterial F-box effectors[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2010, 1: 122
- [26] Wong K, Perpich JD, Kozlov G, Cygler M, Abu Kwaik Y, Gehring K. Structural mimicry by a bacterial F box effector hijacks the host ubiquitin-proteasome system[J]. *Structure*, 2017, 25(2): 376-383
- [27] Bruckert WM, Abu Kwaik Y. Lysine<sup>11</sup>-linked polyubiquitination of the AnkB F-box effector of *Legionella pneumophila*[J]. *Infection and Immunity*, 2016, 84(1): 99-107
- [28] Luo X, Wasilko DJ, Liu Y, Sun JY, Wu XC, Luo ZQ, Mao YX. Structure of the *Legionella* virulence factor, SidC reveals a unique PI(4)P-specific binding domain essential for its targeting to the bacterial phagosome[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(6): e1004965
- [29] Hsu F, Luo X, Qiu JZ, Teng YB, Jin JP, Smolka MB, Luo ZQ, Mao YX. 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
- [30] Menegay HJ, Myers MP, Moeslein FM, Landreth GE. Biochemical characterization and localization of the dual specificity kinase CLK1[J]. *Journal of Cell Science*, 2000, 113(Pt 18): 3241-3253
- [31] Lee Y, Lee IY, Yun HJ, Lee WS, Kang S, Cho SG, Lee JE, Choi EJ. BAT3 negatively regulates lipopolysaccharide-induced NF- $\kappa$ B signaling through TRAF6[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 478(2): 784-790
- [32] Sedgwick SG, Smerdon SJ. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(8): 311-316
- [33] Puvar K, Iyer S, Fu JQ, Kenny S, Negrón Terón KI, Luo ZQ, Brzovic PS, Klevit RE, Das C. *Legionella* effector MavC targets the Ube2N~Ub conjugate for noncanonical ubiquitination[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2365
- [34] Gan NH, Guan HX, Huang YN, Yu T, Fu JQ, Nakayasu ES, Puvar K, Das C, Wang DM, Ouyang SY, et al. *Legionella pneumophila* regulates the activity of UBE2N by deamidase-mediated deubiquitination[J]. *The EMBO Journal*, 2020, 39(4): e102806
- [35] Guan HX, Fu JQ, Yu T, Wang ZX, Gan NH, Huang YN, Perčulija V, Li Y, Luo ZQ, Ouyang SY. Molecular basis of ubiquitination catalyzed by the bacterial transglutaminase MavC[J]. *Advanced Science*, 2020, 7(12): 2000871
- [36] Qiu JZ, Sheedlo MJ, Yu KW, Tan YH, Nakayasu ES, Das C, Liu XY, Luo ZQ. Ubiquitination independent of E1 and E2 enzymes by bacterial effectors[J]. *Nature*, 2016, 533(7601): 120-124
- [37] Dong YN, Mu YJ, Xie YC, Zhang YP, Han YY, Zhou Y, Wang WH, Liu ZH, Wu M, Wang H, et al. Structural basis of ubiquitin modification by the *Legionella* effector SdeA[J]. *Nature*, 2018, 557(7707): 674-678
- [38] Wang Y, Shi M, Feng H, Zhu YL, Liu SQ, Gao A, Gao P. Structural insights into non-canonical ubiquitination catalyzed by SidE[J]. *Cell*, 2018, 173(5): 1231-1243
- [39] Akturk A, Wasilko DJ, Wu XC, Liu Y, Zhang Y, Qiu JZ, Luo ZQ, Reiter KH, Brzovic PS, Klevit RE, et al. Mechanism of phosphoribosyl-ubiquitination mediated by a single *Legionella* effector[J]. *Nature*, 2018, 557(7707): 729-733
- [40] Bhogaraju S, Kalayil S, Liu YB, Bonn F, Colby T, Matic I, Dikic I. Phosphoribosylation of ubiquitin promotes serine ubiquitination and impairs conventional ubiquitination[J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1636-1649
- [41] An H, Ordureau A, Paulo JA, Shoemaker CJ, Denic V, Harper JW. TEX264 is an endoplasmic *Reticulum*-resident ATG8-interacting protein critical for ER remodeling during nutrient stress[J]. *Molecular Cell*, 2019, 74(5): 891-908.e10
- [42] Grumati P, Morozzi G, Höpfer S, Mari M, Harwardt MI, Yan RQ, Müller S, Reggiori F, Heilemann M, Dikic I. Full length RTN3 regulates turnover of tubular endoplasmic *Reticulum* via selective autophagy[J]. *eLife*, 2017, 6: e25555
- [43] Hu JJ, Shibata Y, Zhu PP, Voss C, Rismanchi N, Prinz WA, Rapoport TA, Blackstone C. A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network[J]. *Cell*, 2009, 138(3): 549-561
- [44] Gan NH, Zhen XK, Liu Y, Xu XL, He CL, Qiu JZ, Liu YC, Fujimoto GM, Nakayasu ES, Zhou B, et al. Regulation of phosphoribosyl ubiquitination by a calmodulin-dependent glutamylase[J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 387-391
- [45] Black MH, Osinski A, Gradowski M, Servage KA, Pawtowski K, Tomchick DR, Tagliabracci VS. Bacterial pseudokinase catalyzes protein polyglutamylation to inhibit the SidE-family ubiquitin ligases[J]. *Science*, 2019, 364(6442): 787-792
- [46] Bhogaraju S, Bonn F, Mukherjee R, Adams M, Pfeleiderer MM, Galej WP, Matkovic V, Lopez-Mosqueda J, Kalayil S, Shin D, et al. Inhibition of bacterial ubiquitin ligases by SidJ-calmodulin catalysed glutamylation[J]. *Nature*, 2019, 572(7769): 382-386
- [47] Komander D, Clague MJ, Urbé S. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(8): 550-563
- [48] Mevissen TET, Komander D. Mechanisms of deubiquitinase specificity and regulation[J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2017, 86: 159-192
- [49] Clague MJ, Urbé S, Komander D. Publisher correction:

- breaking the chains: deubiquitylating enzyme specificity begets function[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2019, 20(5): 321
- [50] Shin D, Mukherjee R, Liu YB, Gonzalez A, Bonn F, Liu Y, Rogov VV, Heinz M, Stolz A, Hummer G, et al. Regulation of phosphoribosyl-linked serine ubiquitination by deubiquitinases DupA and DupB[J]. *Molecular Cell*, 2020, 77(1): 164-179.e6
- [51] Wan M, Sulpizio AG, Akturk A, Beck WHJ, Lanz M, Faça VM, Smolka MB, Vogel JP, Mao YX. Deubiquitination of phosphoribosyl-ubiquitin conjugates by phosphodiesterase-domain-containing *Legionella* effectors[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(47): 23518-23526
- [52] Xu P, Duong DM, Seyfried NT, Cheng DM, Xie Y, Robert J, Rush J, Hochstrasser M, Finley D, Peng JM. Quantitative proteomics reveals the function of unconventional ubiquitin chains in proteasomal degradation[J]. *Cell*, 2009, 137(1): 133-145
- [53] Rieser E, Cordier SM, Walczak H. Linear ubiquitination: a newly discovered regulator of cell signalling[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2013, 38(2): 94-102
- [54] Walczak H, Iwai K, Dikic I. Generation and physiological roles of linear ubiquitin chains[J]. *BMC Biology*, 2012, 10: 23
- [55] Wan MY, Wang XF, Huang CF, Xu DD, Wang Z, Zhou Y, Zhu YQ. A bacterial effector deubiquitinase specifically hydrolyses linear ubiquitin chains to inhibit host inflammatory signalling[J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(8): 1282-1293
- [56] Ma KL, Zhen XK, Zhou B, Gan NH, Cao Y, Fan CP, Ouyang SY, Luo ZQ, Qiu JZ. The bacterial deubiquitinase Ceg23 regulates the association of Lys-63-linked polyubiquitin molecules on the *Legionella* phagosome[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(6): 1646-1657
- [57] Isberg RR, O'Connor TJ, Heidtman M. The *Legionella pneumophila* replication vacuole: making a cosy niche inside host cells[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(1): 13-24
- [58] Qiu JZ, Luo ZQ. *Legionella* and *Coxiella* effectors: strength in diversity and activity[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(10): 591-605
- [59] Herrmann J, Lerman LO, Lerman A. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation[J]. *Circulation Research*, 2007, 100(9): 1276-1291
- [60] Muratani M, Tansey WP. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2003, 4(3): 192-201
- [61] Ohtake F, Saeki Y, Ishido S, Kanno J, Tanaka K. The K48-K63 branched ubiquitin chain regulates NF- $\kappa$ B signaling[J]. *Molecular Cell*, 2016, 64(2): 251-266
- [62] Kulathu Y, Komander D. Atypical ubiquitylation: the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2012, 13(8): 508-523
- [63] Sheng XP, You Q, Zhu HN, Chang ZN, Li QR, Wang HF, Wang C, Wang HY, Hui LJ, Du CT, et al. Bacterial effector NleL promotes enterohemorrhagic *E. coli*-induced attaching and effacing lesions by ubiquitylating and inactivating JNK[J]. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(7): e1006534
- [64] Wang L, Wu JH, Li J, Yang H, Tang TQ, Liang HJ, Zuo MY, Wang J, Liu HP, Liu F, et al. Host-mediated ubiquitination of a mycobacterial protein suppresses immunity[J]. *Nature*, 2020, 577(7792): 682-688