

嗜肺军团菌Ⅳ型分泌系统及其致病性研究进展

戈立秀 吴尚为 朱庆义

革兰阴性菌侵袭真核细胞,将毒力因子运送至菌体表面或宿主细胞内,这类转运过程需要细菌分泌系统的参与。目前已知革兰阴性菌有Ⅰ~Ⅳ型分泌系统。其中Ⅰ、Ⅱ型可将蛋白直接排泌于菌体外环境;但Ⅲ、Ⅳ型较为特殊,通过细菌的菌毛样结构与宿主细胞紧密结合形成一个孔道,将蛋白直接注入宿主细胞内。Ⅳ型分泌系统是革兰阴性菌最常见的分泌机制,可将蛋白毒素和其他致病因子运输到宿主细胞内^[1]。例如,根癌土壤杆菌 VirB/VirD 分泌系统是目前研究最为透彻的Ⅳ型分泌系统,其能够运输 DNA 蛋白复合体到宿主细胞;百日咳鲍特杆菌利用 PilQ 型分泌系统可将百日咳毒素转运出细菌外膜;嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*, LP)可通过 Dot/Icm Ⅳ型分泌系统运输毒力蛋白到宿主细胞内。

嗜肺军团菌是一种兼性胞内致病菌,广泛存在于天然淡水环境或人工水域中,能入侵阿米巴原虫和人体巨噬细胞,是引起军团菌肺炎的重要病原体。吸入肺部的嗜肺军团菌,被巨噬细胞吞噬并在其胞内增殖,破出后再感染其他巨噬细胞,反复感染可引起严重的非典型肺炎。嗜肺军团菌Ⅳ型分泌系统发挥了重要作用。嗜肺军团菌含有一个 65 kb 毒力岛基因座^[2],属Ⅳ型分泌系统,可分为ⅣA 型(1vh)和ⅣB 型(Dot/Icm),ⅣA 型分泌系统是嗜肺军团菌在巨噬细胞和阿米巴内生长所必需的,也可能与细菌在低温感染宿主细胞有关^[3],而 Dot/Icm 分泌系统是引起军团菌病的重要致病因子。

一、Ⅳ型分泌系统的构成及其功能

嗜肺军团菌的毒力岛基因座包含 Dot/Icm Ⅳ型分泌系统、易变遗传因子和毒力因子^[2]。其中 Dot/Icm Ⅳ型分泌系统分两种类型:Horwitz 等^[4]发现嗜肺军团菌的某个基因位点能发生无致病力的突变,该突变体的菌株能在宿主细胞内复制,被命名为 icm;Berger 等^[5]发现嗜肺军团菌某个单基因位点的突变,其突变体菌株运输细胞器缺陷,被命名为 dot。dot/icm 基因座的介导作用是逃避吞噬细胞的杀伤,输出细菌受动器,调整吞噬体生物源,逃避内吞作用溶解和阻止来自内质网网状组织的小滤泡,促使细菌繁殖和激活感染的巨噬细胞,促使宿主细胞凋亡和小孔形成、细胞溶解等一系列病理改变。

目前的研究认为,嗜肺军团菌 Dot/Icm Ⅳ型分泌系统具有一种特殊结构,能够跨越细菌内膜、外膜以及宿主细胞膜,将细菌胞内的毒力蛋白运输到宿主细胞

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2011.03.017

基金项目:国家科技重大专项(2008ZX10004-006);国家标准化委员会资助项目(20081021-T-361)

作者单位:510330 广州,广州金域医学检验中心(戈立秀、吴尚为、朱庆义);天津医科大学(戈立秀、吴尚为)

通讯作者:朱庆义,Email-zqy@kingmed.com.cn

内。该复合体被认为至少由 Dot C、Dot D、Dot F、Dot G 和 Dot H 5 种蛋白质组成,其中 Dot F、Dot G 为 LP 的内膜蛋白, Dot C、Dot D 和 Dot H 为嗜肺军团菌的外膜蛋白,其中 Dot H 蛋白自身不能镶嵌在外膜上,需要 Dot C 和 Dot D 的协助。完整的外膜蛋白组成了 Dot/Icm IV 型分泌系统的运输渠道,同时该渠道与 II、III 型分泌系统有很大的同源性,揭示了嗜肺军团菌的 Dot/Icm IV 型分泌系统特征和运输通道的演变过程^[6]。

嗜肺军团菌还有一套被称为 IcmR-IcmQ 蛋白复合体的转运机制^[7],可在宿主细胞膜和含嗜肺军团菌的囊泡膜上形成移位孔(translocation pore)。该装置中起主要作用的是 IcmQ 蛋白,其具有成孔活性,能在细胞膜的脂质层形成微孔,并被 IcmR 所调节。推断 IcmR-IcmQ 复合体与嗜肺军团菌的致病性有密切关系。另外,在 LP 细胞质内发现 IcmS-IcmW 蛋白复合体^[8],编码 IcmS、IcmW 蛋白的基因位于染色体的两个不同区域,但 4 分子的 IcmS 蛋白和 2 分子的 IcmW 蛋白组装成该复合体,能绑定底物分子,利于其运输至宿主细胞内。在酵母双杂交体系中,IcmW 蛋白能和底物蛋白中的 WipA、WipB、SidG、SidH 结合并转运其至宿主细胞,利于 LP 细胞内生长,但 IcmS-IcmW 突变体却不能运输底物蛋白 Ral F,表明复合体只与部分底物蛋白的运输相关。

二、IV 型分泌系统的作用机制

(一) 效应分子及其作用

Dot/Icm 分泌系统控制嗜肺军团菌侵袭宿主细胞的一系列过程,如刺激宿主吞噬细胞摄取嗜肺军团菌,干扰宿主细胞的正常免疫功能,阻止吞噬溶酶体融合,促进形成营养丰富的内质网衍生囊泡,为嗜肺军团菌的复制提供场所等。这些作用的发挥需要效应分子的参与,约有 200 个嗜肺军团菌效应分子通过 Dot/Icm 分泌系统运输到细胞内。

(二) 利于复制场所的建立

嗜肺军团菌在宿主细胞内复制,逃避宿主吞噬溶酶体的融合,需要特殊的囊泡,该囊泡的建立需要 Dot/Icm 分泌系统运输基质蛋白进入宿主细胞。但到目前为止,许多基质蛋白的功能并不清楚,Heidtman 等^[9]利用酵母模式系统来鉴定嗜肺军团菌 Dot/Icm 基质蛋白如何影响囊泡的形成,结果显示基质蛋白能干扰酵母胞液与外部的交换,引起酵母生长缺陷和分泌功能紊乱,其过程和作用与嗜肺军团菌感染宿主细胞、促进嗜肺军团菌所需要的营养物质进入囊泡进而影响宿主功能基本一致。其中基质蛋白中的 Pie A 与囊泡膜蛋白相互作用,改变溶酶体形态,逃避溶酶体融合,支持嗜肺军团菌细胞内复制^[10]。另外,邵峰等^[11]发现 1 种被称为 SidM/DrrA 的 IV 型分泌系统效应蛋白具有独特的 GDF(GDI displacement factor)和 GEF(guanine nucleotide exchange factor)活性,这两种活性同时特异性地作用于并激活宿主的 Rab1 GTP 酶,从而对肺炎军团菌招募内质网来源的膜泡发挥重要作用。

(三) 模拟并干扰宿主细胞功能

许多细菌通过模拟真核细胞的功能运输效应蛋白至宿主真核细胞。这些不同的细菌蛋白中含有锚定重复的同源区域,被称作 Anks,该蛋白能与不同真核蛋白相互作用产生不同的细胞功能。Anks 蛋白在细菌中很少见,但在真核生物中比较普遍。Pan 等^[12]将嗜肺军团菌中编码 Anks 蛋白的基因和 IV 型分泌系统易位到真核细胞内,翻译出的蛋白类似于真核蛋白,并证明嗜肺军团菌 Anks 蛋白能干扰依赖微管的胞液运输。感染早期有活性的 Anks 蛋白可招募营养物质到囊泡,帮助嗜肺军团菌构建复制场所。感染晚期干扰含有嗜肺军团菌的囊泡与核内体融合,在内质网退出位点干扰内质网囊泡的成熟,阻碍嗜肺军团菌退出营养囊泡。

(四) 调节细胞凋亡

1. 诱导凋亡:嗜肺军团菌在哺乳动物中引起宿主细胞凋亡,为检测 dot/icm 位点是否为诱导凋亡所必需,Zink 等^[13]采用末端标记法,检测了 9 种突变体和野生菌株,末端标记的绿色荧光 dUTP 示踪到凋亡巨噬细胞均有一个致密核,相差显微镜检测到细胞膜发泡,能更进一步确定凋亡细胞的特征。野生型菌株 AA100 能诱导高于 90% 的 U937 巨噬细胞凋亡,然而 dot/icm 位点插入 kan 基因的 9 种突变体诱导凋亡有严重缺陷,低于 15% 的感染细胞发生凋亡。重要的是,通过质粒引入野生型 dot/icm 到各个突变体,其诱导凋亡的能力与野生型相似。这表明 Dot/IcmIV 型分泌系统为诱导细胞凋亡必不可少的因素。

早期研究认为, Dot/IcmIV 型分泌系统在不同时期诱导凋亡的机制不同。感染早期,即嗜肺军团菌入侵宿主细胞后 2 小时内,细胞凋亡蛋白酶 3 浓度升高,该酶能分解一种特殊底物,诱导感染的细胞凋亡。dotA/icmWXYZ 基因的突变不能诱导有活性的细胞凋亡蛋白酶 3。在嗜肺军团菌细胞内复制终止时, Dot/IcmIV 型分泌系统触发宿主细胞溶解酶,诱导宿主细胞凋亡^[14]。

2. 抑制凋亡:近年来,Ge^[15]等发现嗜肺军团菌 Dot/IcmIV 型分泌系统存在效应蛋白 LegK1,该蛋白可模拟宿主的 IKK(I κ B kinase)而激活宿主的 NF- κ B 信号转导通路,在宿主细胞中显示出很强的 NF- κ B 信号活性,这种激活作用能起到抗凋亡作用,使宿主细胞在感染后不会立刻启动具有保护作用的凋亡程序,利于 LP 在宿主细胞内生存。另外,效应蛋白 SidF 可直接与凋亡前 Bcl2 蛋白家族的成员相互作用,在感染过程中阻止宿主细胞凋亡,但 Dot/Icm 分泌系统利用特殊的效应蛋白抗凋亡的机制至今仍不明确。

三、结语

IV 型分泌系统是嗜肺军团菌侵袭宿主细胞的主要武器,近年来随着新的分子生物学技术及蛋白质组学的应用,对 IV 型分泌系统的研究取得了一定进展。但其构成及功能发挥所涉及到的效应分子远比目前研究得到的结论更为复杂,有很多问题尚未解决。例如,最近 Schroeder 等^[16]通过对嗜肺军团菌 130b 菌株的研究,发现了 IV 型分泌系统新的基因序列,新的毒力基因和蛋白代表着不断增长的 IV 型

分泌系统的新成员,并反映出嗜肺军团菌可能具备适应多种宿主的能力。随着对 IV 型分泌系统研究的不断深入,其结构及功能仍有待继续探讨。

参 考 文 献

- 1 Llosa M, Roy C, Dehio C. Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol*, 2009, 73(2):141-151.
- 2 Brassinga AK, Hiltz MF, Sisson GR, et al. A 65-kilobase pathogenicity island is unique to Philadelphia-1 strains of *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol*, 2003, 185(15):4630-4637.
- 3 Ridenour DA, Cirillo SL, Feng S, et al. Identification of a gene that affects the efficiency of host cell infection by *Legionella pneumophila* in a temperature-dependent fashion. *Infect Immun*, 2003, 71(11):6256-6263.
- 4 Horwitz MA. Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply within human monocytes. *J Exp Med*, 1987, 166(5):1310-1328.
- 5 Berger KH, Isberg RR. Two distinct defects in intracellular growth complemented by a single genetic locus in *Legionella pneumophila*. *Mol Microbiol*, 1993, 7(1):7-19.
- 6 Nakano N, Kubori T, Kinoshita M, et al. Crystal structure of *Legionella* DotD: insights into the relationship between type IVB and type II/III secretion systems. *PLoS Pathog*, 2010, 6(10):e1001129.
- 7 Raychaudhury S, Farelli JD, Montminy TP, et al. Structure and function of interacting IcmR-IcmQ domains from a type IVb secretion system in *Legionella pneumophila*. *Structure*, 2009, 17(4):590-601.
- 8 Ninio S, Zuckman-Cholon DM, Cambronner ED, et al. The *Legionella* IcmS-IcmW protein complex is important for Dot/Icm-mediated protein translocation. *Mol Microbiol*, 2005, 55(3):912-926.
- 9 Heidtman M, Chen EJ, Moy MY, et al. Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiol*, 2009, 11(2):230-248.
- 10 Ninio S, Celli J, Roy CR. A *Legionella pneumophila* effector protein encoded in a region of genomic plasticity binds to Dot/Icm-modified vacuoles. *PLoS Pathog*, 2009, 5(1):e1000278.
- 11 Zhu Y, Hu L, Zhou Y, et al. Structural mechanism of host Rab1 activation by the bifunctional *Legionella* type IV effector SidM/DrrA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107(10):4699-4704.
- 12 Pan X, Luhrmann A, Satoh A, et al. Ankyrin repeat proteins comprise a diverse family of bacterial type IV effectors. *Science*, 2008, 320(5883):1651-1654.
- 13 Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, et al. The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. *Infect Immun*, 2002, 70(3):1657-1663.
- 14 Gao LY, Abu Kwaik Y. Activation of caspase 3 during *Legionella pneumophila*-induced apoptosis. *Infect Immun*, 1999, 67(9):4886-4894.
- 15 Jianning G, Hao Xu, Feng Shao, et al. A *Legionella* type IV effector activates the NF- κ B pathway by phosphorylating the I κ B family of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(33):13725-13730.
- 16 Schroeder GN, Petty NK, Mousnier A, et al. *Legionella pneumophila* strain 130b possesses a unique combination of type IV secretion systems and novel Dot/Icm secretion system effector proteins. *J Bacteriol*, 2010, 192(22):6001-6016.

(收稿日期:2011-04-01)

(本文编辑:孙荣华)

戈立秀,吴尚为,朱庆义.嗜肺军团菌IV型分泌系统及其致病性研究进展[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2011,5(3):356-359.