

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (4) :417 - 423; 4 April 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.04.008

嗜肺军团菌类真核效应蛋白 LegK3 抑制酿酒酵母的生长并影响其小泡运输途径

王嘉铭^{1,2}, 李向辉^{2,3}, 陈爱枫¹, 陆勇军^{2*}

¹广东省微生物研究所, 省部共建华南应用微生物国家重点实验室, 广东 广州 510070

²中山大学生命科学院/生物医药中心, 广东 广州 510275

³江苏省科学技术情报研究所, 江苏 南京 210042

摘要:【目的】为了探索嗜肺军团菌类真核效应蛋白 LegK3 的功能, 并进一步筛选得到其在宿主细胞内的作用靶点, 我们利用酿酒酵母作为替代模型研究 LegK3 对宿主细胞的毒力效应, 并针对其作用途径进行了初步分析。【方法】设计引物完整扩增 LegK3、RalF、LidA 的 ORF, 其中已知效应蛋白 RalF、LidA 基因作为对照实验组; 扩增片段与酵母表达载体 pESC-HK 连接构建成重组载体, 转化酿酒酵母菌株 W303-1A, 使用含 2% 半乳糖的选择培养基进行诱导培养, 分别观察酵母细胞的生长抑制和 CPY 延迟情况; 提取诱导前、后的酵母菌体总蛋白用 c-myc 抗体检测效应蛋白的表达情况; 用 anti-PGK、anti-CPY 抗体检测酿酒酵母 CPY 的延迟情况。【结果】表达 LegK3 的酵母菌株出现了生长抑制的现象, 并且 CPY 的成熟受到延迟影响。【结论】LegK3 的异源表达能够抑制酿酒酵母的生长并延迟其囊泡蛋白 CPY 的成熟, 推测 LegK3 可能通过作用于小泡运输途径来抑制真核宿主细胞的生长和分裂, 以维持适合嗜肺军团菌繁殖的稳定胞内环境。

关键词:嗜肺军团菌, 效应蛋白, LegK3, 酿酒酵母

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2014)04-0417-07

嗜肺军团菌 (*Legionella pneumophila*) 是引起严重肺炎——军团病和庞蒂亚克热的革兰氏阴性胞内条件致病菌^[1-2]。该菌广泛地生活在水生环境中或寄生在原生动物体内, 当人体吸入含菌的气溶胶后, 该菌能在肺泡巨噬细胞中增殖进而导致疾病的产生^[3-4]。嗜肺军团菌成功进行胞内增殖的关键在于通过 IVB 型分泌系统分泌大量的效应蛋白

(effector) 到宿主细胞内, 使其躲避宿主细胞早期溶酶体途径的伤害^[5], 操纵宿主细胞的小泡运输途径, 募集内质网小泡、线粒体和核糖体等细胞器修饰 LCV (*Legionella* Containing Vacuole, 简称 LCV)^[6-8], 控制宿主的存活与凋亡^[9-11] 以及帮助该菌裂解宿主并逃逸^[12]。在嗜肺军团菌的众多效应蛋白中, 比较有代表性的有 RalF 和 LidA。RalF 具有与 Arf1

基金项目: 国家自然科学基金 (30970123)

* 通信作者。Tel: +86-20-84110778; Fax: +86-20-84036215; E-mail: luyj@mail.sysu.edu.cn

作者简介: 王嘉铭 (1987 -), 男, 山东掖县人, 硕士研究生, 研究方向为细胞微生物学与分子遗传学。E-mail: nbatpterry@126.com

收稿日期: 2013-08-12; 修回日期: 2013-12-05

(ADP ribosylation factor 1) 的 GEF (guanine nucleotide exchange factor) 中的 Sec7 结构域同源的结构域,它能够伪装成 Arf1 的 GEF,激活 Arf1 并将其募集到嗜肺军团菌的 LCV 上,从而达到利用 Arf1 募集高尔基体及内质网小泡来修饰 LCV 的目的^[13-14]。LidA 则能与小泡运输途径中另一个重要蛋白家族 Rab 发生相互作用,通过亲和作用将 Rab 募集到 LCV 表面,进而募集运输小泡来修饰和伪装 LCV 以达到躲避溶酶体途径的目的^[15-17]。值得一提的是,军团菌分泌的许多效应蛋白含有真核生物蛋白的结构域,这些蛋白称为类真核蛋白 (eukaryotic-like proteins),类真核效应蛋白使得军团菌在真核宿主体内增殖变得更加容易。然而由于效应蛋白普遍具有功能上的冗余性,往往单个蛋白的缺失并不能对细菌造成明显的影响,因此,对这些蛋白各自的具体功能目前还知之甚少。LegK3 属于嗜肺军团菌类真核效应蛋白中五个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的一员,由基因 *lpg2556* 所编码。目前对 LegK3 的了解仅限于它所具有的激酶活性,以及能够通过 IVB 型分泌系统分泌到宿主细胞内这一效应蛋白特性^[18],深层次的功能尚未被探究。

酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 是一种单细胞真核生物,具有易于在实验室培养、遗传背景清晰、基因操作技术成熟的特点,并且全基因组序列已测序完成,作为研究真核细胞途径的模式生物已有超过 50 年的历史。在基因转录、翻译、细胞信号传导、细胞骨架的动态平衡、小泡运输等途径上,酿酒酵母与高等真核生物之间是保守的^[19],因此研究效应蛋白对酵母的作用及生理途径的影响将为理清嗜肺军团菌效应蛋白功能和致病机理提供重要的线索。本文通过研究异源表达 LegK3 对酿酒酵母的影响,判断其针对宿主细胞的作用途径或机制,为后续的深

入研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α : 基因型 *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-relA1*, 中山大学微生物遗传学实验室保存; 酿酒酵母 W303-1A 菌株: 基因型 *MATa ade2-1 can1-100 his3-11, 15 Leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1*, 中山大学微生物遗传学实验室保存; 嗜肺军团菌 Lp02 菌株: 血清 1 型费城株, 基因型 *rpsL, HsdR⁻, Thy⁻*, 由北京生命科学研究所以邵峰博士馈赠。*

1.1.2 质粒:pESC-HK: 由 pESC-His (Stratagene 公司) 经中山大学微生物遗传学实验室陆敢重新构建后将氨苄青霉素抗性改为卡那霉素抗性并保存。

1.1.3 主要工具酶、试剂及培养基:限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自 New England Biolabs 公司, Taq 及 pfu 酶购自 TOYOBO 公司, DNA 快速回收试剂盒购自 Omega 公司, 用于蛋白电泳的 5x loading buffer 购自 Fermentas 公司, anti-myc 抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG 购自 Proteintech 公司, anti-PGK、anti-CYPY 购自 Invitrogen 公司。酵母培养基的营养组分购自 Sigma 公司。主要培养基为 LB 培养基、YPD 培养基、CSM-His 缺陷型培养基。

1.2 效应蛋白表达载体的构建

根据嗜肺军团菌效应蛋白 LegK3、RalF 和 LidA 的 ORF 序列, 分别设计完整扩增序列的上下游引物 P1、P2 (LegK3)、P3、P4 (RalF) 和 P5、P6 (LidA), 采用 BamHI 和 SalI 作为限制性内切酶, 质粒 pESC-HK 中自带的 myc 片段将作为效应蛋白表达的检测片段。引物序列如下表:

表 1. 本文实验所用的引物
Table 1. Primers used in this study

primer	sequence (5'→3')	size/bp	restriction enzyme
P1	CGCGGATCCGATGTTTGATAGAAATATAAAAGAAATA	37	BamHI
P2	ACCGGTCGACTAATTCAAAGCCTGAAT	27	SalI
P3	CGCGGATCCGATGCATCCAGAAATTGAAAA	30	BamHI
P4	ACCGGTCGACAAATTTAATTGTCTACCTTTTTC	34	SalI
P5	CGCGGATCCGATGGCAAAAAGATAACAAATCA	31	BamHI
P6	ACCGGTCGACTGATGTCTTGAATGGAGATAAA	32	SalI

以嗜肺军团菌 *L. pneumophila* Lp02 的基因组 DNA 作为模板扩增 3 个效应蛋白的 ORF, 反应条件为: 94℃ 2 min; 94℃ 15 s, 55℃ - 60℃ 30 s, 68℃ 75 - 140 s, 30 个循环; 68℃ 10 min. 通过 1.0 % 的琼脂糖凝胶电泳鉴定 PCR 产物。将 PCR 扩增产物经 DNA 凝胶回收试剂盒纯化回收后, 用 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切并再次回收, 然后与同样经过 *Bam*HI 和 *Sal*I 双酶切并回收的 pESC-HK 质粒片段经 T4 DNA 酶连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取少量单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定为阳性的克隆子送至 Invitrogen 公司进行测序。测序正确的阳性克隆提取重组质粒保存备用。

1.3 酿酒酵母生长抑制

按已有的实验方法^[20], 将插入了效应蛋白 ORF 的重组质粒以及 pESC-HK 质粒空载体转化酿酒酵母菌株 W303-1A。将转化子接种于 5 mL CSM-His (2% 葡萄糖) 液体培养基, 30℃ 250 r/min 培养 24 h。将培养液以 1:20 扩大培养到 30 mL 的 CSM-His (2% 棉子糖 + 0.1% 葡萄糖) 液体培养基中, 30℃、250 r/min 培养 12 h。取其中 15 mL 酵母培养液收集菌体提取总蛋白, 剩下的 15 mL 培养液离心收集菌体, 弃上清, 用无菌 PBS 清洗菌体 2 次, 加入 15 mL CSM-His (2% 半乳糖) 液体培养基重悬菌体, 30℃ 250 r/min 诱导培养 6 h。6 h 后测定 OD_{600} , 将各菌株的诱导培养菌液用无菌 ddH₂O 同时稀释到 $OD_{600} = 1.0$, 再按 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 和 10^{-3} 的梯度进行稀释。取上述 4 个梯度的稀释菌液分别在 3 块 CSM-His (2% 葡萄糖) 和 CSM-His (2% 半乳糖) 平板上进行点板, 每个梯度的稀释菌液点 4 μ L, 剩下的菌体离心收集提取总蛋白。将平板分别置于 25℃, 30℃ 和 35℃ 进行培养, 每个温度放置点板后的 CSM-His (2% 葡萄糖) 和 CSM-His (2% 半乳糖) 平板各一块, 3 - 4 d 之后对结果进行拍照。

1.4 效应蛋白表达的鉴定与酿酒酵母羧肽酶 Y (CPY) 成熟途径抑制

1.4.1 效应蛋白表达的 Western blot 鉴定: 分别收集经过诱导表达及未诱导的酵母细胞, 3500 \times g 离心 5 min, 弃上清, 用 4℃ 预冷的无菌 PBS 清洗菌体 2 次, 再加入 1 mL 重悬菌体。将菌液转移到预先称重的 1.5 mL 离心管中, 10000 \times g 室温离心 1 min, 弃上清, 再次称重。称重后计算菌体的重量 (按湿重 1 g \approx 1 mL), 加入适量 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液重

悬菌体, 室温静置 20 min。静置后 10000 \times g 室温离心 1 min, 弃上清, 按每 2.3 mg 湿重菌体加入 50 μ L 的比例加入适量 5 \times loading buffer 重悬菌体, 沸水浴 10 min 后 12000 \times g 离心 5 min, 吸取上清液即为酵母菌体的总蛋白。将总蛋白于 10% 的分离胶中进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。电转印至硝酸纤维素膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭过夜, TBST 洗涤 3 次, 与 anti-myc 单克隆抗体 (用 TBST 作 1:1000 倍稀释) 室温作用 2 h, TBST 洗涤 3 次, 与辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠 IgG (用 TBST 作 1:5000 倍稀释) 室温作用 1 h, TBST 洗涤 3 次, 将膜置于化学发光印迹系统上显色并观察。

1.4.2 酿酒酵母羧肽酶 Y 成熟途径抑制实验: 将上一步骤中提取的各个酵母表达菌株的菌体总蛋白以相同体积上样量进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 以内参抗体 anti-PGK 进行 Western Blot 分析。得到的 PGK 条带用 Image J 软件进行扫描分析, 计算出条带之间的量差关系, 调整各样品的上样体积至 PGK 内含量一致, 再用抗体 anti-PGK 及 anti-CPY 分别进行 Western blot 分析, 显色并观察结果。

2 结果

2.1 效应蛋白的酵母表达菌株的构建

以嗜肺军团菌 Lp02 的基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增得到 LegK3、RalF 和 LidA 编码基因的 ORF 片段。经过限制性内切酶酶切、T4 DNA 连接酶连接、转化大肠杆菌 DH5 α 、菌落 PCR 鉴定、阳性转化子测序等步骤之后, 将构建成功的重组载体以及质粒空载体分别转化酿酒酵母菌株 W303-1A。通过 PCR 鉴定分别挑选含有重组载体和空载体的酵母转化子, 完成表达菌株和空白表达对照的构建。

2.2 效应蛋白表达的鉴定

将点板实验前收集的未经诱导及诱导 6 h 后的酵母菌体收集提取总蛋白, 利用 pESC-HK 载体上带有的 c-myc 标签进行 Western blot 分析效应蛋白在酵母菌株中的表达情况。结果如图 1 所示, 未经诱导的酵母菌体总蛋白均未能检测到效应蛋白的表达, 而经过 2% 半乳糖为碳源诱导 6 h 后的酵母菌体总蛋白能在约 54、44 和 85 kDa 处检测到条带, 分别与 LegK3、RalF、LidA 的预期大小一致, 表明经过诱导后效应蛋白在酵母菌株内顺利表达。

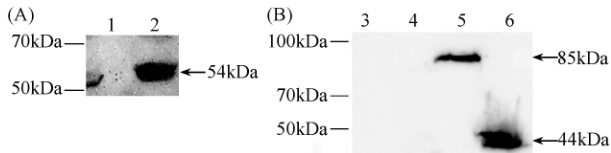


图 1. Western blot 分析效应蛋白在酿酒酵母中的表达情况

Figure 1. Expression analysis of effectors in *S. cerevisiae* by Western blot. Lane 1, LegK3 uninduced; lane 2, Legk3 induced; lane 3, LidA uninduced; lane 4, RalF uninduced; lane 5, LidA induced; lane 6, RalF induced.

2.3 LegK3 对酿酒酵母的生长抑制

分别将含有空载体及 LegK3、RalF 表达载体的酵母菌体调整浓度到 $OD_{600} = 1.0$, 按 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 的梯度进行稀释后在 CSM-His (2% 葡萄糖) 和 CSM-His (2% 半乳糖) 平板上进行点板, 其中 CSM-His (2% 半乳糖) 作为诱导表达平板。点板结果显示两种平板上空载体对照菌落的生长情况基本保持一致, 未出现生长抑制的情况。正对照 RalF 表现出很强烈的抑制作用, 在 25°C、30°C、35°C 3 个温度梯度下酿酒酵母菌体均无法正常生长。而表达 LegK3 的菌体在 3 个温度梯度下同样表现出较强的生长抑制情况, 其中 35°C 下抑制作用最为明显 (图 2)。点板结果表明 LegK3 的表达能引起酿酒酵母较强的生长抑制情况, 对酿酒酵母的生长存在毒力

作用。

2.4 酿酒酵母 CPY 成熟途径抑制实验

CPY 是酵母细胞内囊泡上的一个组成蛋白。囊泡属于分泌蛋白, 其前体经过内质网合成后运送到高尔基体进行翻译后修饰才能成为成熟的囊泡而被分泌到胞浆环境。在翻译后修饰的过程中 CPY 的前体从内质网到高尔基体最后变为成熟蛋白的 3 个状态下其分子大小会发生变化, 从 67kDa 到 69kDa 再到最终的 61kDa。若效应蛋白表达后对酵母的小泡运输途径有影响, 则会体现在 CPY 从前体到成熟体的成熟时间上出现延迟, 可通过 Western blot 进行判断。分别将含有空载体及 LegK3、LidA 表达载体的酵母菌体在 CSM-His (2% 半乳糖) 液体培养基中诱导 6 h, 收集诱导及未诱导的酵母菌体提取总蛋白以用抗体 anti-PGK 及 anti-CPY (Invitrogen) 分别进行 Western blot 检测, 其中 PGK 作为内参。Western blot 结果显示表达了 LegK3 及正对照 LidA 的菌株的 CPY 出现了分子量稍大 (67kDa) 的前体 (p) 及分子量稍小 (61kDa) 的成熟体 (m) 两种条带, 而空载体菌株则只有 61kDa 的成熟体条带 (图 3)。实验结果表明 LegK3 的表达对酿酒酵母囊泡蛋白 CPY 的成熟存在延迟作用, 即 LegK3 作用于酿酒酵母的小泡运输途径。

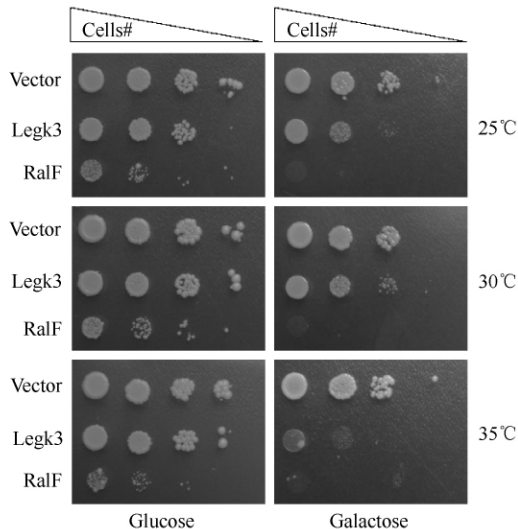


图 2. 效应蛋白表达对酿酒酵母的生长抑制情况

Figure 2. Growth defect of *S. cerevisiae* induced by expression of *L. pneumophila* effectors. Each yeast strain was prepared as ten-fold serial dilution and spotted onto selective plates containing 2% glucose or 2% galactose.

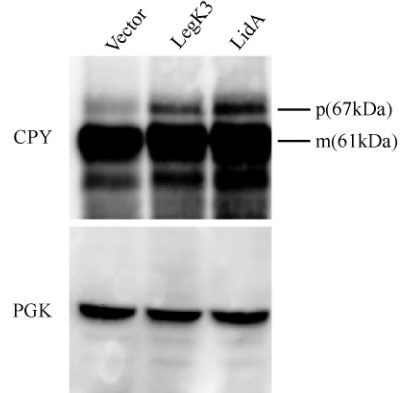


图 3. 效应蛋白表达对酿酒酵母 CPY 的影响

Figure 3. Influence of effector expression on CPY in *S. cerevisiae*. p: precursor of CPY; m: mature CPY.

3 讨论

由于真核生物的胞内生理途径在模式上具备高度保守性, 因此以酿酒酵母作为替代宿主模型并在

其中异源表达细菌效应蛋白是筛选、研究效应蛋白功能及作用途径的常用方法。如 Heidtman 等利用酿酒酵母的胞内异源表达从嗜肺军团菌 127 个效应蛋白中筛选到 21 个影响小泡运输途径的蛋白^[21]。Campodonico 等则利用酿酒酵母作为替代宿主发现了嗜肺军团菌效应蛋白 Ralf 具有 GEF 的功能以及与 Arf 家族的关系^[14]。嗜肺军团菌作为胞内条件致病菌,影响并控制宿主的分泌途径是其效应蛋白的主要功能之一。在酵母细胞中,内质网和高尔基体之间的小泡运输过程是胞内分泌途径的重要环节,其中 COPII 小泡负责完成内质网到高尔基体的顺向运输。新合成的蛋白质开始分泌时,具有 GEF 功能的 Sec12 催化 Arf-GDP 转换成活化状态 Arf-GTP,后者插入内质网膜,在 Sec16 的承托下与 Sec23/24、Sec13/31 以及货物蛋白(Cargo)组装成预出芽复合物(pre-budding complex)并出芽形成 COPII 小泡,最后具有 GAP (GTPase-activating protein) 功能的 Sec23 催化 GTP 水解,Arf-GTP 重新转换成 Arf-GDP 并脱离 COPII,完成出芽过程。COPII 由微管输送到高尔基体,通过自身的 v-SNARE (vesicle-soluble N-ethylmaleimide-sensitive protein receptor) 与高尔基体上特异性的 t-SNARE (target-SNARE) 识别结合,最终完成了内质网到高尔基体的小泡运输过程^[22-26]。本文中实验结果表明,LegK3 的异源表达抑制了酿酒酵母的生长,并使其 CPY 前体出现富集现象。结合小泡运输的具体过程,上述结果提示我们 LegK3 的表达可能抑制了酿酒酵母的 COPII 途径,相应地,被分泌到真核宿主细胞中的 LegK3 也很可能是作用于此途径。

此外,在真核细胞小泡运输途径中,以 p38 为代表的 MAPK (mitogen-activated protein kinases) 蛋白激酶家族发挥了重要的调控作用。如 Wang 等将 HeLa 细胞同步化在 G2/M 期并通过抑制 Sec13/31 的组装来抑制 COPII 的形成,但失活 p38 MAPK 后发现 Sec13/31 的组装及 COPII 的形成均得到了恢复,表明 p38 MAPK 对 COPII 途径具有负调控作用^[27]。而 Blagoveshchenskaya 等则发现 p38 MAPK 使高尔基体上的磷脂酶 SAC1 解聚并通过 COPI 小泡运输回到内质网,从而释放了高尔基体的分泌功能^[28]。本实验室前期对 LegK3 的生物信息学分析显示 LegK3 的结构域和 p38 MAPK 具有较高的相似性^[29],结合文中 LegK3 延迟 CPY 成熟这一结果,我

们推测 LegK3 可能具有与 p38 MAPK 相似的针对 COPII 途径的抑制作用。而基于 LegK3 在嗜肺军团菌指数生长后期大量表达这一事实^[30],我们进一步推测 LegK3 主要在胞内增殖后期发挥作用,通过作用于 p38 MAPK 相关的功能途径来抑制宿主细胞的生长和分裂,以维持相对稳定的胞内环境并最终保障增殖过程的顺利完成。然而 p38 MAPK 又广泛参与到小泡蛋白装配、信号识别以及微管运输等调控过程^[31],因此 LegK3 的详细作用机制还需进一步的研究。综上所述,本文的研究结果为 LegK3 的功能研究指明了方向,今后如能进一步确定其作用机制和靶标,对于嗜肺军团菌这一大类类真核激酶效应蛋白的研究,无疑都将起到推动作用。

参考文献

- [1] Yamaguchi K, Tateda K, Ishii Y, Murakami H. *Legionella pneumoniae*—epidemiology, clinical characteristics and development of diagnosis. *Nippon Rinsho*, 1998, 56:2707-2717.
- [2] Richards AM, Von Dwingelo JE, Price CT, Abu KY. Cellular microbiology and molecular ecology of *Legionella-amoeba* interaction. *Virulence*, 2013, 4(4): 307-14.
- [3] Taylor M, Ross K, Bentham R. *Legionella*, protozoa, and biofilms: interactions within complex microbial systems. *Microbial Ecology*, 2009, 58(3): 538-47.
- [4] Molmeret M, Bitar DM, Han L, Kwai YA. Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes and Infection*, 2004, 6:129-139.
- [5] Ko KS, Hong SK, Lee HK, Park MY, Kook YH. Molecular evolution of the *dotA* gene in *Legionella pneumophila*. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(21): 6269-77.
- [6] Kagan JC, Roy CR. *Legionella* phagosomes intercept vesicular traffic from endoplasmic reticulum exit sites. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(12): 945-954.
- [7] Ninio S, Roy CR. Effector proteins translocated by *Legionella pneumophila*: strength in numbers. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(8): 372-80.
- [8] Ivanov SS, Roy CR. Modulation of ubiquitin dynamics and suppression of DALIS formation by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Cellular Microbiology*, 2008, 11(2): 261-278.
- [9] Khweek AA, Amer A. Replication of *Legionella Pneumophila* in Human Cells: Why are We Susceptible? *Frontiers in Microbiology*, 2010, 1: 133.

- [10] Banga S, Gao P, Shen X, Fiscus V, Zong WX, Chen L, Luo ZQ. *Legionella pneumophila* inhibits macrophage apoptosis by targeting pro-death members of the Bcl2 protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104 (12) : 5121-5126.
- [11] 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) : 1651-1654.
- [12] Chen J, de Felipe KS, Clarke M, Lu H, Anderson OR, Segal G, Shuman HA. *Legionella* effectors that promote nonlytic release from protozoa. *Science*, 2004, 303 (5662) : 1358-1361.
- [13] Nagai H, Kagan JC, Zhu X, Kahn RA, Roy CR. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science*, 2002, 295 : 679-82.
- [14] Campodonico EM, Chesnel L, Roy CR. A yeast genetic system for the identification and characterization of substrate proteins transferred into host cells by the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Molecular Microbiology*, 2005, 56 (4) : 918-933.
- [15] Neunuebel MR, Mohammadi S, Jarnik M, Machner MP. *Legionella pneumophila* LidA affects nucleotide binding and activity of the host GTPase Rab1. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (6) : 1389-400.
- [16] Chen Y, Machner MP. Targeting of the small GTPase Rab6A' by the *Legionella pneumophila* effector LidA. *Infection and Immunity*, 2013, 81 (6) : 2226-35.
- [17] Derre I, Isberg RR. LidA, a Translocated Substrate of the *Legionella pneumophila* Type IV Secretion System, Interferes with the Early Secretory Pathway. *Infection and Immunity*, 2005, 73 (7) : 4370-4380.
- [18] Hervet E, Charpentier X, Vianney A, Lazzaroni JC, Gilbert C, Atlan D, Doublet P. The protein kinase LegK2 is a type IV secretion system effector involved in endoplasmic reticulum recruitment and intracellular replication of *Legionella pneumophila*. *Infection and Immunity*, 2011, 79 (5) : 1936-50.
- [19] Siggers KA, Lesser CF. The Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a versatile model system for the identification and characterization of bacterial virulence proteins. *Cell Host & Microbe*, 2008, 4:8-15.
- [20] Amberg DC. 酵母遗传学方法实验指南. 霍克克, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 2009.
- [21] Heidtman M, Chen EJ, Moy MY, Isberg RR. Large-scale identification of *Legionella pneumophila* Dot/Icm substrates that modulate host cell vesicle trafficking pathways. *Cell Microbiology*, 2009, 11:230-248.
- [22] Jackson CL, Casanova JE. Turning on ARF: Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends in Cell Biology*, 2000, 10:60-70.
- [23] Yorimitsu T, Sato K. Insights into structural and regulatory roles of Sec16 in COPII vesicle formation at ER exit sites. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23 (15) : 2930-42.
- [24] Matsuoka K, Orci L, Amherdt M, Bednarek SY, Hamamoto S, Schekman R, Yeung T. COPII-coated vesicle formation reconstituted with purified coat proteins and chemically defined liposomes. *Cell*, 1998, 93:263-275.
- [25] Antony B, Madden D, Hamamoto S, Orci L, Schekman R. Dynamics of the COPII coat with GTP and stable analogues. *Nature Cell Biology*, 2001, 3:531-537.
- [26] Springer S, Schekman R. Nucleation of COPII vesicular coat complex by endoplasmic reticulum to Golgi vesicle SNAREs. *Science*, 1998, 281:698-700.
- [27] Wang L, Lucocq JM. p38 MAPK regulates COPII recruitment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007, 363 (2) :317-21.
- [28] Blagoveshchenskaya A, Cheong FY, Rohde HM, Glover G, Knödler A, Nicolson T, Boehmelt G, Mayinger P. Integration of Golgi trafficking and growth factor signaling by the lipid phosphatase SAC1. *The Journal of Cell Biology*, 2008, 180 (4) :803-12.
- [29] 王嘉铭. 嗜肺军团菌类真核效应蛋白 LegK3 的生物学功能研究. 中山大学硕士学位论文, 2012.
- [30] 任君. 嗜肺军团菌类真核效应蛋白的系统发生及生物学功能研究. 中山大学硕士学位论文, 2010.
- [31] Lee MC, Miller EA, Goldberg J, Orci L, Schekman R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, 20:87-123.

Legionella pneumophila eukaryotic-like effector LegK3 inhibits growth of *Saccharomyces cerevisiae* and modulates its vesicle trafficking pathway

Jiaming Wang^{1,2}, Xianghui Li^{2,3}, Aifeng Chen¹, Yongjun Lu^{2*}

¹ Guangdong Institute of Microbiology, State Key Laboratory of Applied Microbiology, South China (The Ministry-Province Joint Development), Guangzhou 510070, Guangdong Province, China

² School of Life Sciences and Biomedical Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, Guangdong Province, China

³ Jiangsu Information Institute of Science and Technology, Nanjing 210042, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] To study biochemical functions of the *Legionella pneumophila* eukaryotic-like effector protein LegK3, the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* was used as an alternative host in which growth defect induced by the ectopic expression of LegK3 was assessed. [Methods] Using genomic DNA of the *L. pneumophila* strain Lp02 as template, we respectively amplified and inserted the ORF sequences of *legK3*, *ralF* or *lidA* into the plasmid pESC-HK to yield the ectopic-expression plasmids. Then, the recombination plasmids were transformed into the yeast strain W301-4A. With 2% galactose induction, growth defect and carboxypeptidase Y (CPY) delay were determined simultaneously. In parallel, total yeast proteins before or after induction were extracted and subjected to Immunoblot assay. For detecting the expression of effector proteins or determining CPY delay, anti-c-myc or anti-PGK/ anti-CPY antibodies were utilized respectively. [Results] The expression of LegK3 resulted in visible growth defect in yeast cells, together with obvious retard in CPY processing. [Conclusion] *L. pneumophila* eukaryotic-like effector LegK3 might target and interfere with the vesicle-trafficking pathways, thereby to inhibit the growth and division of host cells.

Keywords: *Legionella pneumophila*, effector, LegK3, *Saccharomyces cerevisiae*

(本文责编:王晋芳)