

大肠杆菌二硫键形成相关蛋白的结构、功能
及其在基因工程表达外源蛋白上的应用

张 众 黄华樑*

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要 大肠杆菌分泌蛋白二硫键的形成是一系列蛋白协同作用的结果,主要是 Dsb 家族蛋白,迄今为止共发现了 DsbA、DsbB、DsbC、DsbD、DsbE 和 DsbG。在体内,DsbA 负责氧化两个巯基形成二硫键,DsbB 则负责 DsbA 的再氧化。DsbC 和 DsbG 负责校正 DsbA 导入的异常二硫键,DsbD 则负责对 DsbC 和 DsbG 进行再还原,DsbE 的功能与 DsbD 类似。除了直接和二硫键的形成相关外,DsbA、DsbC 和 DsbG 都有分子伴侣功能。它们的分子伴侣功能独立于二硫键形成酶的活性并且对二硫键形成酶活性具有明显的促进作用。基于 Dsb 蛋白的功能特性,利用它们以大肠杆菌为宿主表达外源蛋白,特别是含有二硫键的蛋白,取得了很多成功的例子。本文简要介绍了这方面的进展,显示 Dsb 蛋白在促进外源蛋白在大肠杆菌中以可溶形式表达方面具有广阔的应用前景。

关键词 二硫键形成酶,分子伴侣,可溶表达,DsbC,DsbG,单链抗体

中图分类号 Q71 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2002)03-0261-06

对许多蛋白质而言,二硫键是它们最终折叠产物的永久特征,在蛋白质的结构维持和活性保持方面起着重要作用。二硫键可以是折叠途径中的关键步骤^[1],或仅仅是简单地增强蛋白质的稳定性^[2]。最近的研究结果还表明,即使蛋白质最终产物并不包含二硫键,二硫键仍然可以起到促进折叠的作用^[3]。

二硫键的形成在体外也能发生,但速度要比体内慢得多^[4,5]。现在已经知道,大肠杆菌体内二硫键的氧化形成和还原异构都是酶催化的过程。所有参与这些过程的酶,它们的一级结构都含有活性位点 Cys-X-X-Cys,并且都与硫氧还蛋白(Thioredoxin)有一些相似的特征,因此,都被归类为硫氧还蛋白超家族。

体内蛋白质二硫键的形成是在细胞中特定的部位完成的。在大肠杆菌中,二硫键的形成一般仅限于细胞膜蛋白和分泌蛋白^[6]。大肠杆菌的胞质是一高度还原的环境,不包含具有稳定二硫键的蛋白^[7]。而且,许多胞质还原酶必须以巯基为活性基团,所以胞质中存在特定的还原系统确保蛋白巯基的还原状态^[8-10]。高度氧化的大肠杆菌周质腔具有形成二硫键所具备的一切条件,尤其是具有形成二硫键所必需的酶类——Dsf(Disulfide bond)蛋白,事实上,大肠杆菌蛋白质二硫键的形成大多都是在周质腔完成的^[11]。

尽管 Dsb 蛋白的特性分析大多来源于生化实验,但发现 *dsb* 基因采用的都是基于遗传突变的方法。第一个被发现的

是 *dsbA* 基因,它的突变最初是从表达膜蛋白 MalF 和胞质 β -半乳糖苷酶融合蛋白的宿主中分离出来的^[12]。其它分离 *dsbA* 突变的方法都是基于依赖于二硫键形成活性的特定胞膜蛋白的功能缺失表型来进行的^[13-16]。

DsbA 发现以后,吸引了许多科学家的注意,其它的 Dsb 基因及其产物陆续被发现^[15,19,35,38,44,48]。表 1 列举了迄今为止发现的 6 种 Dsb 蛋白及其活性位点、细胞定位、功能以及与 Thioredoxin 和真核生物二硫键异构酶(PDI)活性位点的比较。

表 1 6 种 Dsb 蛋白、它们的活性位点、细胞定位、功能以及
与 Thioredoxin 和真核生物二硫键异构酶活性位点的比较
Table 1 Dsb proteins and their active sites, localization, function and
comparison of the active sites with those of Thioredoxin and PDI

Protein	Gene	Active sites	Localization and function
DsbA	<i>dsbA</i>	Cys-Pro-His-Cys	Periplasm, oxidize two -SH- to form a disulfide bond
DsbB	<i>dsbB</i>	Cys-Val-Leu-Cys	Inner membrane, reactive DsbA
DsbC	<i>dsbC</i>	Cys-Gly-Tyr-Cys	Periplasm, isomerize mis-paired disulfide bonds
DsbD	<i>dsbD</i>	Cys-Val-Ala-Cys	Inner membrane, reduce DsbC and participate in synthesis of cytochrome C
DsbE	<i>dsbE</i>	Cys-Pro-Thr-Cys	Inner membrane, participate in synthesis of cytochrome C
DsbG	<i>dsbG</i>		Periplasm, isomerize mis-paired disulfide bonds
Thioredoxin		Cys-Gly-Pro-Cys	
PDI		Cys-Gly-His-Cys	

二硫键的氧化形成和还原异构就是通过这些酶活性位点的巯基和目的蛋白的巯基之间以巯基-二硫键交换反应的方式来完成的。

1 Dsb 蛋白的结构与功能——大肠杆菌分泌蛋白二硫键的形成

1.1 DsbA/DsbB

在体外,DsbA 蛋白能显著促进变性的碱性磷酸酯酶和还原态的牛胰核糖核酸酶 A 二硫键的形成^[16],而且,最初认为,它的功能似乎依赖于周质腔氧化态和还原态巯基的比率,即在不同的氧化还原状态下,DsbA 可以有 2 种不同的功能,氧化态的 DsbA 在生理条件下催化还原态的底物形成二硫键,而还原态的 DsbA 则具有二硫键异构酶的活性^[17,18]。但很明显,体内 DsbA 的主要功能是氧化形成二硫键^[19-21],而且,它是目前所发现的硫氧还蛋白超家族成员中氧化能力最强的蛋白^[22]。

DsbA 是质量约为 21 kD 的周质腔蛋白,活性中心 Cys³⁰-Pro³¹-His³²-Cys³³ 的 2 个半胱氨酸残基在 DsbA 保持强氧化能力方面具有至关重要的作用,这两个残基突变的 DsbA,其平衡氧化势变化可超过 1000 倍^[23]。将 DsbA 33 位的 Cys 突变为 Ala,并研究该突变体 C33A 与 RNase T1 突变体形成的稳定中间体,结果发现,DsbA 在与底物的作用过程中,不仅存在二硫键的交换,还存在非共价键的相互作用,即 DsbA 存在多肽结合位点^[24]。这一结论被 DsbA 的晶体结构研究所证实^[25],研究证明体内 DsbA 有两种存在方式,分别对应于氧化态和还原态的 DsbA,氧化态 DsbA 的晶体结构非常类似于 Thioredoxin,尽管它们序列同源性很小。一个很重要的不同是,DsbA 有一个存在于 Thioredoxin 类活性位点之上的“帽”结构域^[26],具有氧化还原活性的二硫键就在这个结构域的表面,并且被帽结构的沟所包围而将疏水氨基酸残基暴露在外侧。这一结构揭示,在氧化底物的半胱氨酸之前,DsbA 很可能通过结合部分折叠的多肽链而发挥作用。NMR 也证实 DsbA 和它的配体间存在非共价的相互作用^[27]。

Missiakas 等人^[28]采用两种不同的方法鉴定并定性分析了大肠杆菌 *dsbB* 基因。*dsbB* 的无效突变赋予大肠杆菌多样的表型,比如对苄青霉素敏感以及严重影响分泌蛋白如 OmpA 和 β -内酰胺酶二硫键的氧化形成。这些表型同具有 *dsbA* 无效突变或 *dsbA dsbB* 双突变细菌的表型一样。DsbB 蛋白是一个 20 kD 的膜蛋白,跨膜 4 次,它的 N-末端和 C-末端都位于胞质内。DsbB 的 6 个半胱氨酸残基中,有 4 个是其体内功能所必需的,每一个面向周质腔的结构域各有 2 个半胱氨酸,其中第一个周质腔结构域的 2 个半胱氨酸位于特征序列 Cys-X-X-Cys 中^[29]。DsbB 中靠近活性位点 Cys-41-Val-Leu-Cys-44 C-末端的一段序列对其活性的维持很重要,即使单个氨基酸的缺失也能导致 DsbB 失活,据认为,这一段主要是维持该活性位点与细胞膜的适当距离,而这一段距离是 DsbB 发挥功能所必需的^[30]。

Guilhot 等人^[31]将 DsbA 33 位的 Cys 用色氨酸(Try)代替,

从而得到 *dsbA* 显性的负突变 *dsbA^d*。在这一突变体菌株中,分离到了 DsbA-DsbB 和 DsbA^d-DsbB 复合物,这是体内 DsbA 与 DsbB 作用的直接证据。将 DsbB 的一个或两个 Cys 突变为丙氨酸(Ala),发现只有 Cys-104 在复合物的形成中是重要的,很明显,DsbA 是与 DsbB 的第二对半胱氨酸发生作用的^[31-33]。因此,体内的过程是还原态 DsbA 的 Cys-30 首先与 DsbB 的 Cys-104 形成二硫键,然后 Cys-104 迅速被 DsbA 的 Cys-33 所取代,从而形成氧化态的 DsbA,DsbB 就是通过这一方式使 DsbA 得以再氧化^[31]。DsbB 则通过将电子传递到呼吸链而得以再生^[34]。

1.2 DsbC、DsbG/DsbD、DsbE

1994 年,Missiakas 等人发现并从功能上分析了大肠杆菌中存在的 DsbC 蛋白(其基因最初称为 *xprA*)^[35],此前,Shevchik 等人率先在菊欧文氏菌(*Erwinia chrysanthemi*)中发现了一个其产物可以弥补大肠杆菌 *dsbA* 突变的基因,命名为 *dsbC*,而这一 *dsbA* 突变能导致大肠杆菌周质腔蛋白二硫键形成障碍^[46]。大肠杆菌 *dsbC* 的缺失突变菌株,其周质腔中积累有许多还原形式的含二硫键蛋白,可以通过添加氧化型的二硫苏糖醇(DTT)或半胱氨酸或者表达多拷贝 *dsbA* 获得拯救。大肠杆菌 DsbC 前体蛋白的质量为 25.5 kD,随后被加工成 23.3 kD 的成熟蛋白。成熟 DsbC 为一稳定的同源二聚体,每一亚单位含有一个-Cys⁹⁸-Gly-Tyr-Cys¹⁰¹-片段,形成一个不稳定和高反应活性的二硫键,如同 DsbA 一样,DsbC 活性位点的二硫键也不稳定,能被快速地转移到还原态的蛋白和多肽上,只是它在动力学的反应性上与 DsbA 有所不同^[36]。取代活性位点-Cys-Gly-Tyr-Cys-中的任何一个半胱氨酸,都可能导致 DsbC 功能的完全丧失^[35],但有些突变却能起到增强其二硫键异构酶活性和促蛋白折叠能力。去掉 N-末端的 65 个氨基酸,则余下的部分以单体形式存在(命名为 fDsbC),fDsbC 仍然含有 DsbC 的活性位点-Cys⁹⁸-Gly-Tyr-Cys¹⁰¹-,同完整的 DsbC 相比,其构象仅有微小的差异,但 fDsbC 却不能催化变性的 RNase A 和还原态的变性牛胰蛋白酶抑制剂(BPTI)二硫键的形成,并且它的巯基蛋白氧化还原酶的活性只有完整 DsbC 的 13%,这说明 N-末端的 65 个氨基酸是其异构酶活性所必需的^[37]。

最初的实验证明 DsbC 与 DsbA 在功能上可相互替代,都从头参与二硫键的氧化形成^[35,38]。然而,*dsbC* 突变菌株体内表型更为详尽的研究和 DsbC 本身的生化分析表明,DsbC 在体内二硫键的氧化形成方面并没有发挥多少作用,仅仅是在异构化错配的二硫键时是必需的,DsbC 在过量表达时扮演氧化剂的角色很可能是因为蛋白的过高水平表达超过了 DsbC 还原蛋白(DsbD)的还原能力,使得大量积累的氧化态 DsbC 充当了氧化剂的角色^[39-41]。DsbC 在许多含多个二硫键的蛋白的正确折叠中都是必需的^[39,40,42,43]。

Rietsch 等人^[39]根据已有的生化实验,第一次提供了 DsbC 在体内作为错配二硫键异构酶的证据,并且也证明 DsbA 与 DsbC 在体内行使不同的功能。实验发现,*dsbC* 的突变特异性地对含有多个二硫键蛋白的二硫键形成表现出缺陷。这

种缺陷能通过培养基中添加还原态的 DTT 得到弥补,这说明 DsbC 的缺乏是导致二硫键误氧化并进而导致这些蛋白聚集的原因。Sone 等人^[40]也用实验证明了 DsbA 与 DsbC 在体内扮演的不同角色。

dsbD 是 Missiakas 等人^[44]在研究一个体内能补偿 *dsbA* 缺失突变的实验中发现的。如同其它 *dsb* 突变一样,*dsbD* 的缺失能导致一些而不是全部在其它 *dsb* 突变中所观察到的表型,如对 DTT 和苄青霉素的过度敏感^[44,45]。不同于其它 *dsb* 基因,*dsbD* 是大肠杆菌在 42℃ 以上生长所必需的。*dsbD* 野生型基因的克隆、测序和表达产物分析显示,它属于一个操纵子的一部分,编码一个内膜蛋白。人们纯化出了含 138 个氨基酸残基的亚结构域,并证明它在体外具有氧化还原酶的活性。在周质腔中表达这一亚结构域有助于恢复同 *dsbD* 无效突变相关的缺陷表型。有趣的是,这一结构域与真核生物 PDI 含有活性位点的部分竟有 45% 的序列同源性。进一步的研究表明,*dsbD* 突变菌中,绝大部分 DsbA 和 DsbC 活性位点的巯基同野生型相比都处于氧化态。这表明,DsbD 在周质腔中产生一种还原源,这是维持适当的氧化还原条件所必需的。

保持 DsbC 的还原状态是 DsbD 的功能^[39,44];DsbC 在 *dsbD* 突变的宿主中大量地以氧化态的形式聚集^[42,43]。相应的,*dsbD* 的突变在含有多个二硫键的蛋白折叠中与 *dsbC* 表现出了相同的表型。

Katzen 等人^[46]在实验中将 DsbD 分为 3 个结构域,每一个结构域各含有 2 个必需的半胱氨酸。当共表达时,这些截短的蛋白能恢复完整 DsbD 的功能。实验中使用三套系统,确定了通过 DsbD 传递电子的途径。结果发现,这条途径是建立在多步骤的氧化还原反应上的,包括 DsbD 与硫氧还蛋白,DsbD 与其周质腔底物之间的直接相互作用。DsbD 中一个硫氧还蛋白折叠结构域似乎充当分子内电子穿梭载体的作用。在体内,DsbD 还原 DsbC 与 DsbG,反过来,DsbD 又被胞质中的硫氧还蛋白还原,DsbD 实际上起到了一种将二硫键还原势从胞内传递到周质腔中的作用^[47]。

DsbE 是与 DsbD 很相近的一种蛋白,但它是一种可溶的周质腔蛋白,含有活性位点 Cys-Pro-Thr-Cys,DsbE 的过量表达能抑制很多同 *dsbD* 无效突变相关联的表型缺陷,特别是,过量表达 DsbE 能极大地避免由于氧化态的 DsbA 和 DsbC 的聚集而导致的蛋白被随机氧化^[48]。因此,普遍认为 DsbE 是同 DsbD 功能类似的还原蛋白。

dsbG 基因是从缺失 *dsbB* 基因的多拷贝质粒库中克隆出来的,DsbG 蛋白以 27.5 kD 的前体形式合成,然后被加工成 25.7 kD 的成熟蛋白,并被转运到周质腔中^[49]。*dsbG* 的点突变体都表现出对 DTT 敏感,并且作为对细胞外存在误折叠蛋白的反应,宿主 σ^E 依赖的反应明显增强。更为重要的是,这些突变细胞的周质腔中都积累了许多还原形式的含二硫键蛋白。在培养基中添加氧化形式的 DTT 或半胱氨酸,或者过量表达 *dsbA* 或 *dsbB* 都能拯救这些 *dsbG* 的突变。DsbG 在体内、体外都具有巯基二硫键氧化还原酶活性。Cys-Pro-Tyr-

Cys 被认为是 DsbG 的活性位点,用 Ala 取代其中的第一个 Cys 就能使 DsbG 的功能完全丧失。最初认为它是保持 DsbA/DsbB 系统和 DsbC 系统之间平衡的调节器^[49]。

Bessette 等人^[19]进一步研究了 DsbG 体内体外的功能。DsbG 与 DsbC 具有序列同源性,同样形成稳定的二聚体周质腔蛋白,表达量大约为 DsbC 的 25%。同早期得到的结果不一样,*dsbG* 并不是大肠杆菌生长所必需的,*dsbG* 的缺失突变对含有多个二硫键的外源蛋白的折叠并不形成障碍。过量表达 DsbG 能恢复 *dsbC* 缺失突变菌株正常表达含多个二硫键的外源蛋白,如 BPTX(含 3 个二硫键),并在一个较小的程度上恢复正常表达含 12 个二硫键的鼠尿激酶。同 DsbC 一样,DsbG 活性位点的巯基也以一种 *dsbD* 依赖的方式处于还原状态。DsbG 体内的功能主要是周质腔二硫键异构酶的作用,只是具有比 DsbC 更窄的底物特异性。

1.3 Dsb 蛋白协同作用,共同完成蛋白二硫键的正确形成

大肠杆菌体内存在着两条不同的与二硫键形成相关的途径,即 DsbA/DsbB 途径负责从头引入二硫键,而 DsbC、DsbG/DsbD、DsbE 系统则负责错配二硫键的异构化。关键的问题是这两条截然不同的氧化和还原途径是怎样协同作用且又保持独立而互不干扰的。Bader 等人^[50]筛选出了能弥补 *dsbA* 缺失突变的 *dsbC* 突变体。同野生型的二聚体 DsbC 不同,这些突变体 DsbC 都以单体形式存在且都能拯救 *dsbA* 的缺失突变,并且这种拯救是依赖于 DsbA 的天然再氧化蛋白 DsbB 的,实际上,这些突变体 DsbC 完全代替了 DsbA 行使功能,且都依赖于 DsbB 的氧化而再生。很显然,DsbC 的二聚化是保护 DsbC 的活性位点免受 DsbB 氧化的关键因素,也是这两条途径能保持独立的关键。图 1 和图 2 描绘了大肠杆菌体内蛋白二硫键的氧化形成和异构化过程。

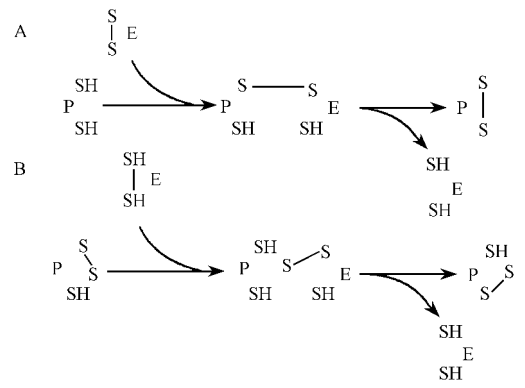


图 1 二硫键的氧化形成与错配二硫键的异构

Fig.1 Formation and isomerization of disulfide bonds

P. Substrate proteins containing disulfide bonds; E. DsbA or DsbC. Panel A shows that DsbA oxidizes two -SH- to form a disulfide bond; Panel B shows that DsbC isomerizes the mispaired disulfide bonds

2 Dsb 蛋白的分子伴侣功能

2.1 DsbA 的分子伴侣功能

© 中国生物化学与生物物理学会 2015 年 10 月 10 日出版

酸脱氢酶(GAPDH)以及硫氰酸生成酶作用,如同真核生物的PDI一样,DsbA能抑制这两种变性蛋白的聚集并且能辅助它们复性,只是活性比PDI稍弱。很显然,DsbA具有分子伴侣的功能。由于GAPDH和硫氰酸生成酶都不含二硫键,说明DsbA分子伴侣功能独立于它的二硫键氧化酶的活性。实验还发现,人工合成的21肽能抑制DsbA的分子伴侣活性,这说明DsbA具有和新生肽结合的能力并且对它的分子伴侣功能负责,DsbA的结构研究也证明了DsbA含有肽结合部位^[24~27]。

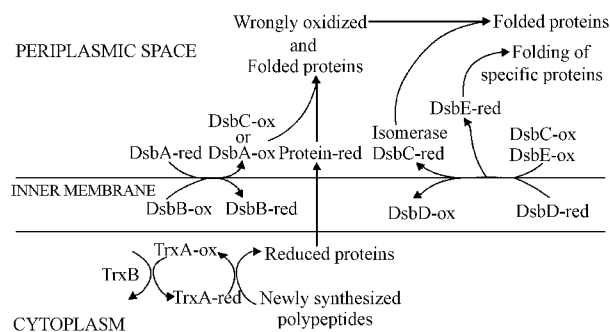


图2 大肠杆菌二硫键形成及异构示意图

Fig.2 Formation and isomerization of disulfide bonds in *E. coli*

2.2 DsbC的分子伴侣功能

Chen等人^[52]证明,尽管DsbC作为二硫键异构酶和巯基蛋白氧化还原酶只具有真核生物PDI 30%的活性,但DsbC在体外抑制变性的GAPDH和溶菌酶的聚集并促进其复性的折叠过程中,比PDI表现出更强的分子伴侣活性。如果羟甲基化DsbC 98位的半胱氨酸,则能使其酶活性丧失,但只是部分降低它的分子伴侣活性。如果去掉N末端的65个氨基酸,则余下的单体DsbC在辅助变性的GAPDH复性时,没有表现出分子伴侣的活性^[37],很明显,DsbC的N-末端(1-65氨基酸残基)是其二聚化和分子伴侣活性所必需的。突变非活性位点二硫键Cys¹⁴¹-Cys¹⁶³中的Cys能导致DsbC分子伴侣活性的降低,但却对DsbC的酶活性没有影响^[37],证实非活性位点的二硫键对DsbC的分子伴侣活性有很重要的影响。

2.3 DsbG的分子伴侣功能

Shao等人^[53]以两种经典的分子伴侣底物柠檬酸合成酶(Citrate synthase)和荧光素酶(Luciferase)作为底物,首次证实DsbG能阻止柠檬酸合成酶和荧光素酶的热聚集,也即具有分子伴侣的作用。DsbG能以很强的吸附力与早期未完成折叠的中间体结合,并且这种辅助折叠活性并不依赖于活性位点的半胱氨酸。DsbG的分子伴侣功能很可能增强它作为蛋白二硫键异构酶的效率。

3 Dsb蛋白在基因工程表达外源蛋白上的应用

Jeong等人^[54]以大肠杆菌为宿主,利用DsbA共表达人Leptin蛋白,得到了非常好的促可溶效果。在不降低Leptin总产量的前提下,37℃表达的Leptin有相当一部分分泌到周质腔中,其中69%是可溶的,约占全菌总蛋白的26%。在同样的条件下,单独表达即使带有枯草杆菌内切木聚糖酶信号

肽的Leptin,绝大多数蛋白仍以不可溶的前体形式存在。

日本科学家Kurokawa等人^[55]以辣根过氧化物酶(HRP)为模式蛋白,采用一系列Dsb共表达载体在大肠杆菌中表达HRP,得到了稳定的可溶活性产物。HRP含有4对由非连续的半胱氨酸形成的蛋白二硫键,在大肠杆菌中单独表达时,很容易以不可溶的形式聚集。当采用信号肽将其引导至周质腔时,HRP也是不稳定的,只能得到产量很低的活性产品。采用Dsb共表达载体,则这些情况基本上被消除了。共表达DsbABCD,能使HRP产量增加2~3倍,分泌到周质腔的部分能增加10倍。通过比较半寿期,单独表达的HRP的半寿期只有25min,而与DsbABCD共表达的HRP却能达到120min。进一步的研究表明,DsbC在HRP的稳定和向周质腔的转运中发挥着主要的作用。随后,Kurokawa等人^[56]采用两套可共存于同一宿主细胞的质粒表达载体系统分别表达Dsb蛋白和含有3个由非连续半胱氨酸构成二硫键的人神经生长因子(NGF),NGF由单独表达时几乎全不可溶到80%的产物可溶且分泌到周质腔中,活性测定试验证实,这样表达的NGF是有功能的产物。此结果是由共表达DsbCD或DsbABCD得到的,而共表达DsbAB或DsbAC却无此效果,表明DsbC/DsbD在促进NGF的可溶表达方面发挥着主要作用。

作者所在实验室将DsbC与DsbG成功地应用于促进单链抗体在大肠杆菌中可溶表达(“Overexpression of DsbC and DsbG Markedly Improves Soluble and Functional Expression of Single-Chain Fv Antibodies in *Escherichia coli*”,待发表)。我们将DsbC或DsbG与抗膀胱癌的单链抗体构成融合表达系统,在大肠杆菌中诱导表达,单链抗体由单独表达时完全不可溶到大部分都以可溶形式存在。更为可喜的结果是,DsbG-单链抗体融合蛋白与DsbC在同一启动子控制下共表达时,DsbG-单链抗体融合蛋白有90%以可溶的形式存在。同时,DsbC与抗卵巢癌X抗CD3双特异性单链抗体的融合蛋白也有约一半的产物是可溶的。这些成功的实验充分证明了Dsb系列蛋白,尤其是DsbC与DsbG蛋白在基因工程表达外源蛋白应用中有着广阔的前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Darby N J, Morin P E, Talbo G *et al.* Refolding of bovine pancreatic trypsin inhibitor via non-native disulphide intermediates. *J Mol Biol*, 1995, **249**: 463 ~ 477
- [2] Schultz S C, Dalbadie M G, Neitzel J J *et al.* Stability of wild-type and mutant RTEM-1 beta-lactamases: effect of the disulfide bond. *Proteins*, 1987, **2**: 290 ~ 297
- [3] Mossner E, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R. Characterization of *Escherichia coli* thioredoxin variants mimicking the active-sites of other thiol/disulfide oxidoreductases. *Protein Sci*, 1998, **7**: 1233 ~ 1244
- [4] Anfinsen C B. Principles that govern the folding of protein chain. *Science*, 1973, **181**: 223 ~ 230
- [5] Saxena V P, Wetlaufer D B. Formation of three-dimensional struc-

- [6] Pugsley A P , Bayan N , Sauvonnet N . Disulfide bond formation in secretin component PulK provides a possible explanation for the role of DsbA in pullulanase secretion. *J Bacteriol* , 2001 , **183** : 1312 ~ 1319
- [7] Batisson I , der Vartanian M . Extracellular DsbA-insensitive folding of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa *in vitro* . *J Biol Chem* , 2000 , **275** : 10582 ~ 10589
- [8] Holmgren A . Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* , 1989 , **264** : 13963 ~ 13966
- [9] Russel M , Model P . Thioredoxin genetics. *Methods Enzymol* , 1995 , **252** : 264 ~ 274
- [10] Russel M , Model P , Holmgren A . Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *J Bacteriol* , 1990 , **172** : 1923 ~ 1929
- [11] Raina S , Missiakas D . Making and breaking disulfide bonds. *Annu Rev Microbiol* , 1997 , **51** : 179 ~ 202
- [12] Bardwell J C , McGovern K , Beckwith J . Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo* . *Cell* , 1991 , **67** : 581 ~ 189
- [13] Dailey F E , Berg H C . Mutants in disulfide bond formation that disrupt flagellar assembly in *Escherichia coli* . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1993 , **90** : 1043 ~ 1047
- [14] Kamitani S , Akiyama Y , Ito K . Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for correctly folded alkaline phosphatase , a periplasmic enzyme. *EMBO J* , 1992 , **11** : 57 ~ 62
- [15] Missiakas D , Georgopoulos C , Raina S . Identification and characterization of the *Escherichia coli* gene dsbB , whose product is involved in the formation of disulfide bonds *in vivo* . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1993 , **90** : 7084 ~ 7088
- [16] Akiyama Y , Kamitani S , Kusakawa N *et al* . *In vitro* catalysis of oxidative folding of disulfide-bonded proteins by the *Escherichia coli* dsbA (ppfA) gene product. *J Biol Chem* , 1992 , **267** : 22440 ~ 22445
- [17] Joly J C , Swartz J R . Protein folding activities of *Escherichia coli* protein disulfide isomerase. *Biochemistry* , 1994 , **33** : 4231 ~ 4236
- [18] Wunderlich M , Glockshuber R . *In vivo* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J Biol Chem* , 1993 , **268** : 24547 ~ 24550
- [19] Besette P H , Cotto J J , Gilbert H F *et al* . *In vivo* and *in vitro* function of the *Escherichia coli* periplasmic cysteine oxidoreductase DsbG. *J Biol Chem* , 1999 , **274** : 7784 ~ 7792
- [20] Eppens E F , Nouwen N , Tommassen J . Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *EMBO J* 1997 , **16** : 4295 ~ 4301
- [21] Yamanaka H , Kameyama M , Baba T *et al* . Maturation pathway of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin I : requirement of DsbA for disulfide bond formation. *J Bacteriol* , 1994 , **176** (10) : 2906 ~ 2913
- [22] Jonda S , Huber-Wunderlich M , Glockshuber R *et al* . Complementation of DsbA deficiency with secreted thioredoxin variants reveals the crucial role of an efficient dithiol oxidant for catalyzed protein folding in the bacterial periplasm. *EMBO J* , 1999 , **18** : 3271 ~ 3281
- [23] Gauschoff U , Winther J R , Korber P *et al* . Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst ? *Cell* , 1995 , **83** : 947 ~ 955
- [24] Frech C , Wunderlich M , Glockshuber R *et al* . Preferential binding of an unfolded protein to DsbA. *EMBO J* , 1996 , **15** : 392 ~ 398
- [25] Martin J L , Waksman G , Bardwell J C *et al* . Crystallization of DsbA , an *Escherichia coli* protein required for disulphide bond formation *in vivo* . *J Mol Biol* , 1993 , **230** : 1097 ~ 1100
- [26] Martin J L , Bardwell J C , Kuriyan J . Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo* . *Nature* , 1993 , **365** : 464 ~ 468
- [27] Couprie J , Vinci F , Dugave C *et al* . Investigation of the DsbA mechanism through the synthesis and analysis of an irreversible enzyme-ligand complex. *Biochemistry* , 2000 , **39** : 6732 ~ 6742
- [28] Moutiez M , Burova T V , Haertle T *et al* . On the non-respect of the thermodynamic cycle by DsbA variants. *Protein Sci* , 1999 , **8** : 106 ~ 112
- [29] Kihara A , Akiyama Y , Ito K . Dislocation of membrane proteins in FtsH-mediated proteolysis. *EMBO J* , 1999 , **18** : 2970 ~ 2981
- [30] Bader M W , Xie T , Yu C A *et al* . Disulfide bonds are generated by quinone reduction. *J Biol Chem* , 2000 , **275** : 26082 ~ 26088
- [31] Guillhot C , Jander G , Martin N L *et al* . Evidence that the pathway of disulfide bond formation in *Escherichia coli* involves interactions between the cysteines of DsbB and DsbA. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1995 , **92** : 9895 ~ 9899
- [32] Kishigami S , Kanaya E , Kikuchi M *et al* . DsbA-DsbB interaction through their active site cysteines. Evidence from an odd cysteine mutant of DsbA. *J Biol Chem* , 1995 , **270** : 17072 ~ 17074
- [33] Kishigami S , Ito K . Roles of cysteine residues of DsbB in its activity to reoxidize DsbA , the protein disulphide bond catalyst of *Escherichia coli* . *Genes Cells* , 1996 , **1** : 201 ~ 208
- [34] Kobayashi T , Kishigami S , Sone M *et al* . Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1997 , **94** : 11857 ~ 11862
- [35] Missiakas D , Georgopoulos C , Raina S . The *Escherichia coli* dsbC (xprA) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J* , 1994 , **13** : 2013 ~ 2020
- [36] Zapun A , Missiakas D , Raina S *et al* . Structural and functional characterization of DsbC , a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli* . *Biochemistry* , 1995 , **34** : 5075 ~ 5089
- [37] Sun X X , Wang C C . The N-terminal sequence (residues 1 ~ 65) is essential for dimerization , activities , and peptide binding of *Escherichia coli* DsbC. *J Biol Chem* , 2000 , **275** : 22743 ~ 22749
- [38] Shevchik V E , Condemine G , Robert-Baudouy J . Characterization of DsbC , a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *EMBO J* , 1994 , **13** : 2007 ~ 2012
- [39] Rietsch A , Belin D , Martin N *et al* . An *in vivo* pathway for disulfide bond isomerization in *Escherichia coli* . *Proc Natl Acad Sci U S A* , 1996 , **93** : 13048 ~ 13053
- [40] Sone M , Akiyama Y , Ito K . Differential *in vivo* roles played by DsbA and DsbC in the formation of protein disulfide bonds. *J Biol Chem* , 1997 , **272** : 10349 ~ 10352
- [41] Zapun A , Missiakas D , Raina S *et al* . Structural and functional cha-

- racterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 1995, **34**: 5075 ~ 5089
- [42] Joly J C, Swartz J R. *In vitro* and *in vivo* redox states of the *Escherichia coli* periplasmic oxidoreductases DsbA and DsbC. *Biochemistry*, 1997, **36**: 10067 ~ 10072
- [43] Rietsch A, Bessette P, Georgiou G *et al.* Reduction of the periplasmic disulfide bond isomerase, DsbC, occurs by passage of electrons from cytoplasmic thioredoxin. *J Bacteriol*, 1997, **179**: 6602 ~ 6608
- [44] Missiakas D, Schwager F, Raina S. Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1995, **14**: 3415 ~ 3424
- [45] Stafford S J, Humphreys D P, Lund P A. Mutations in *dsbA* and *dsbB*, but not *dsbC*, lead to an enhanced sensitivity of *Escherichia coli* to Hg^{2+} and Cd^{2+} . *FEMS Microbiol Lett*, 1999, **174**: 179 ~ 184
- [46] Katzen F, Beckwith J. Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*, 2000, **103**: 769 ~ 779
- [47] Stewart E J, Katzen F, Beckwith J. Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J*, 1999, **18**: 5963 ~ 5971
- [48] Li Q, Hu H, Xu G. Biochemical characterization of the thioredoxin domain of *Escherichia coli* DsbE protein reveals a weak reductant. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **283**: 849 ~ 853
- [49] Andersen C L, Matthey-Dupraz A, Missiakas D *et al.* A new *Escherichia coli* gene, *dsbG*, encodes a periplasmic protein involved in disulphide bond formation, required for recycling DsbA/DsbB and DsbC redox proteins. *Mol Microbiol*, 1997, **26**: 121 ~ 132
- [50] Bader M W, Hiniker A, Regeimbal J *et al.* Turning a disulfide isomerase into an oxidase: DsbC mutants that imitate DsbA. *EMBO J*, 2001, **20**: 1555 ~ 1562
- [51] Zheng W D, Quan H, Song J L *et al.* Does DsbA have chaperone-like activity? *Arch Biochem Biophys*, 1997, **337**: 326 ~ 331
- [52] Chen J, Song J L, Zhang S *et al.* Chaperone activity of DsbC. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 19601 ~ 19605
- [53] Shao F, Bader M W, Jakob U *et al.* DsbG, a protein disulfide isomerase with chaperone activity. *J Biol Chem*, 2000, **275**: 13349 ~ 13352
- [54] Jeong K J, Lee S Y. Secretory production of human leptin in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **67**: 398 ~ 407
- [55] Kurokawa Y, Yanagi H, Yura T. Overexpression of protein disulfide isomerase DsbC stabilizes multiple-disulfide-bonded recombinant protein produced and transported to the periplasm in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**: 3960 ~ 3965
- [56] Kurokawa Y, Yanagi H, Yura T. Overproduction of bacterial protein disulfide isomerase (DsbC) and its modulator (DsbD) markedly enhances periplasmic production of human nerve growth factor in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 14393 ~ 14399

Escherichia coli Disulfide-forming Related Proteins Structures Functions and Their Application in Gene Engineering for Expressing Heterologous Proteins in *Escherichia coli*

ZHANG Zhong HUANG Hua-Liang*

(Institute of Genetics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract The formation of disulfide bonds in secreted proteins of *E. coli* is a synergetic process depending on a series of Dsb proteins containing DsbA, DsbB, DsbC, DsbD, DsbE and DsbG. DsbA functions as an oxidant to form a disulfide bond between two -SH- *in vivo* and DsbB reactivates DsbA by reoxidizing it. Both DsbC and DsbG, two periplasmic proteins with isomerase activity, can correct mis-paired disulfide bonds introduced by DsbA although they recognize different substrates. DsbD, an inner membrane protein, plays a role in reducing DsbC and DsbG *in vivo*. It is regarded that DsbE has the similar function with DsbD. All DsbA, DsbC and DsbG have chaperone activity besides involving in the formation of disulfide bonds. Furthermore, their chaperone activity can promote the formation of protein disulfide bonds. There are a few reports dealing with soluble expression of heterologous proteins containing disulfide bonds assisted by DsbA and DsbC in *E. coli*. So far there has been no reports about the soluble expression of heterologous proteins promoted by DsbG. Our experiments first demonstrated that both DsbC and DsbG can improve the expression of single chain antibodies as soluble and functional forms in *E. coli*, and DsbG has additive effects with DsbC.

Key words disulfide bond, soluble expression, chaperone activity, DsbC, DsbG, single-chain antibodies

Received: 09-20-2001

This work was supported by Grant from the State "863" High Technology R&D Project of China (No. 863-102-09-04-01).

* Corresponding author. Tel: 86-10-64857285, 86-10-64889350; Fax: 86-10-64857285; E-mail: hlhuang@genetics.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>