

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (3) :261 - 268; 4 March 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.03.002

革兰氏阴性细菌 β -桶状结构外膜蛋白折叠与组装的研究进展

代先祝, 罗峰

西南大学生物能源与环境修复研究中心, 重庆 400715

摘要: β -桶状结构外膜蛋白是革兰氏阴性细菌细胞外膜层的主要组成部分, 在营养吸收、维持外膜完整性、病原菌致病性及多重耐药性等方面发挥着重要的作用, 对细菌的存活至关重要。详细了解这些蛋白的合成、折叠与组装到外膜的过程在增加筛选抗病原菌药物靶位、增强有益菌的生物活性等方面具有重要意义。本文对近年来革兰氏阴性细菌 β -桶状结构外膜蛋白的合成、转运、折叠及组装到外膜过程的研究结果进行了综合论述, 重点叙述了 β -桶状结构外膜蛋白组装复合体的研究进展, 并在此基础对这一类蛋白的折叠与膜整合过程提出一些新的见解, 便于读者快速、全面了解该领域的最新发现和发展。

关键词: 外膜蛋白, 转运, 折叠, 组装, 外膜蛋白组装复合体

中图分类号: Q816 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209(2014)03-0261-08

革兰氏阳性和阴性细菌细胞结构的最大的区别就是前者的细胞壁主要由较厚而致密的肽聚糖组成, 后者的细胞壁成分和结构更为复杂, 除了较薄的肽聚糖层还有外膜层 (Outer Membrane), 在外膜和细胞质膜之间有一个明显的空间, 称为周质空间 (Periplasmic Space)。外膜与外界环境直接接触, 主要由外层脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 和内层磷脂组成的双分子膜及膜蛋白组成, 阻挡有害物质自由出入细胞, 是革兰氏阴性细菌细胞的重要保护屏障。跨膜的外膜蛋白几乎都是 β -桶状结构 (β -barrel), 通常直接称为 (Outer Membrane Protein, OMPs)。

OMPs 是由 8 - 24 个偶数反向平行的 β -折叠 (β -strands) 通过相邻的氢键形成的 β -桶状结构蛋白, β -折叠主要是由面向膜磷脂的疏水性氨基酸和

面向桶状结构内层的亲水性氨基酸构成的两性 (amphipathic) 结构, 各 β -折叠之间由面向细胞外的长环 (Long Loops) 和面向周质空间的短环 (Short Loops) 连接 (图 1)^[1]。OMPs 的合成、转运与正确折叠到外膜中对革兰氏阴性细菌来说是一个巨大的挑战, 因为 OMPs 在细胞质内合成后, 需要跨过细胞内膜, 穿越周质空间, 最后在折叠辅助装置的协助下正确的折叠和整合到外膜中形成 β -桶状结构。关于 OMPs 折叠和整合到外膜的过程一直以来所知甚少, 但近十多年来随着生物学研究技术的发展, 涌现了大量关于其在体内外折叠组装相关的研究报告, 通过这些研究结果 OMPs 的折叠与组装机制已可初见端倪。本文将对 OMPs 的合成、转运、折叠及组装到外膜过程相关的最新研究结果进行综合评述。

基金项目: 中央高校基本科研业务经费 (XDJK2012C033); 西南大学博士基金 (SWU112018)

作者简介: 代先祝 (1978 -), 女, 四川安岳人, 副教授, 博士, 主要从事低温微生物的低温适应机理及其应用研究。Tel: +86-23-68250279;

Fax: +86-23-68250109; E-mail: daixianzhu@126.com

收稿日期: 2013-06-24; 修回日期: 2013-09-04

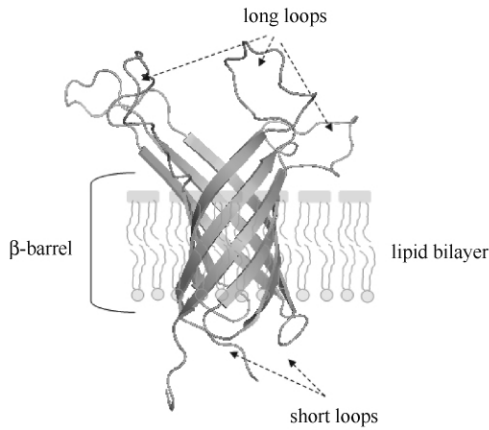


图 1. β -桶状结构外膜整合蛋白结构示意图^[1]

Figure 1. The structure of an outer membrane integrated β -barrel protein^[1].

1 β -桶状结构外膜蛋白的功能

根据功能可将 OMPs 分为: (1) 通道蛋白 (Porin), 作为一些小分子营养物质进入细胞的通道, 包括非特异性的孔蛋白 OmpF、OmpC、PhoE 和仅允许特异性底物通过被动扩散或主动运输的方式通过的物质运输通道, 包括 LamB、ScrY 等; (2) 自传递体 (Autotransporter) C-末端的传输结构域 (Transporter domain), 用于分泌其 N-末端的 Passenger 结构域; (3) 转运子 (Translocon), 在多肽、药物或其它分子的外排过程中发挥作用, 如与病原菌多重抗药相关的 TolC; (4) 酶类, 主要是蛋白酶 OmpT 和磷脂酶; (5) 结构性 OMPs, 包括与肽聚糖形成、OMP 组装及传输和组装菌毛 (Pili) 相关的 Usher 蛋白及直接与外膜的刚性和完整性有关的蛋白 (如 OmpA) 等; (6) 粘附因子 (adhesins) 及噬菌体的受体 (acceptors) 等^[1-2]。当然, 这种分类也不是绝对的, 有的蛋白具有多重功能, 如有的结构性 OMPs 也被发现与致病菌的毒力和耐药性有关, 这也更突显出 OMPs 的研究在寻找新的对抗病原微生物的药物和方法中的重要性。

2 β -桶状结构外膜蛋白的胞内合成及转运

OMP 的 N-末端有将其定位到细胞内膜的信号肽序列, 在细胞质中合成后, 非折叠状态的 OMPs 经

过 Sec 系统 (Secretory Translocation System) 转运到周质空间, 同时被信号肽酶 I (SPase I) 切除信号肽序列, 释放到周质空间的 OMPs 通过分子伴侣 DegP/Skp 或 SurA 转运系统到达外膜的内侧进行折叠和组装^[3-4] (图 2)。DegP/Skp 和 SurA 可防止蛋白错误折叠或聚集沉淀, 其中 DegP 兼具蛋白酶和分子伴侣的功能, 可根据结合底物的折叠状态调整其功能, SurA 属于肽基脯氨酰异构酶家族 (Peptidylprolyl Isomerase Family), 兼有分子伴侣的活性, Skp 是常见的分子伴侣, 以三聚体的形式结合非折叠状态的 OMPs, 而不能与细胞质蛋白或周质空间蛋白结合^[5-6]。基因多重敲除实验结果表明, DegP 与 Skp 形成一条 OMPs 转运途径, 而 SurA 形成另外一条转运通路, 只要保留二者之一, 就不会对细胞造成致死性的损害^[7]。DegP/Skp 与 SurA 转运途径的重要性与细胞的生长环境有关, 正常生长情况下, SurA 转运途径更重要, 而在受到不良环境胁迫时, DegP/Skp 发挥更重要的作用^[8]。

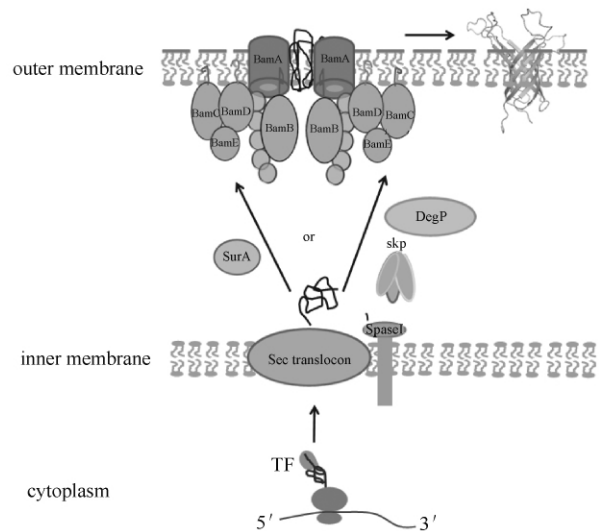


图 2. β -桶状结构外膜整合蛋白合成、转运及折叠与组装示意图

Figure 2. Schematic overview of the biogenesis of OMPs.

3 β -桶状结构外膜蛋白的折叠与组装

被运输到外膜内侧后, OMPs 需要正确折叠并组装到外膜中。体外折叠实验表明, 大多数 OMPs 可以在没有任何能量输入、没有分子伴侣的情况下自动折叠和组装到磷脂双分子膜或表面活性剂的胶

束 (Micelles) 中, 说明 OMPs 的折叠也是由其氨基酸序列决定的^[9-10]。但体外折叠速率非常缓慢, 常常需要数小时才能完全折叠, 这在体内不可行。最近发现的 OMPs 折叠组装辅助因子 BAM (β -Barrel Assembly Machinery) 复合体对 OMPs 体内折叠至关重要, 体外折叠实验结果表明 BAM 复合体能提高 OMPs 的折叠效率, 基因敲出实验结果表明 BAM 复合体的缺失会导致 OMPs 在周质空间异常聚集沉淀, 最终导致细胞死亡^[4, 11-13]。

BAM 复合体由 5 种蛋白组成, Knowles 等将它们分别命名为: BamA、BamB、BamC、BamD 和 BamE^[14]。BamA (也被称为 Omp85) 是 BAM 的核心结构单元, 其它单体都是直接或间接与 BamA 作用的脂蛋白, 通过与其共价结合的脂肪链锚定在外膜上。各个单体都在 OMPs 的生物合成过程中发挥作用, 但仅 BamA 和 BamD 在细菌细胞存活和外膜生物合成过程中是必需的, 其它单体的缺失会导致 OMPs 折叠和组装受损, 但不致死^[15-16]。BAM 复合体识别 OMPs 的 C-末端信号序列 X-Z-X-Z-X-Z-Tyr-Z-Phe/Trp, 其中 X 是疏水性氨基酸, Z 是任意氨基酸, 不同的细菌种群这一序列有少量的差异, 来源于同一个种群的 BAM 复合体只能识别同源的 OMPs 信号序列^[17]。需要指出的是, 有的 OMPs 由膜整合结构域和非膜整合结构域构成, 此处提到的 C-末端信号序列指位于膜整合结构域的 C-末端氨基酸序列。

目前还不知道 BAM 复合体促进 OMPs 折叠和膜插入的详细机理, 但是最近几年获得 BAM 复合体各单体结构及其相互作用的相关信息和基因突变或敲出实验得出的推论, 为解开 OMPs 的折叠和组装之谜奠定了重要的理论基础。

3.1 BamA

BamA 是 BAM 复合体中最重要的核心组成部分, 存在于所有的革兰氏阴性细菌中, 并具有高度的保守性, 它的缺失是致死的^[18]。BamA 由 C-末端整合到外膜的 β -桶状结构域和 N-末端面向周质空间的 5 个 POTRA (Polypeptide Transport-Associated) 结构域组成, 从 N-末端到 C-末端方向依次被命名为 POTRA₁ - POTRA₅, 例外的是蓝细菌的 BamA 只有 3 个 POTRA^[19]。各 POTRA 之间的链接结构具有极强的柔性, 从而使得它们具有移动性和延伸性, 可作为 BamA 与 BAM 复合体的其它单体的结合位点, 还

可通过 β -片层结构间的相互作用 (β -augmentation) 特异性的结合处于未折叠状态的 OMPs^[18, 20-22]。基因敲除实验结果表明, 在不同的菌中, 各 POTRA 的重要性不同, 在 *Neisseria meningitidis* 中, 除了 POTRA₅, 其它 4 个 POTRA 的缺失或突变仅稍微降低 OMPs 折叠的效率, 对其折叠过程没有决定性的影响^[23]。而在 *Escherichia coli* 中有 3 个 POTRA 对蛋白折叠都是必须的, 另外 2 个单体的缺失导致菌体生长受阻^[24]。也有人认为, 在革兰氏阴性细菌细胞中可能还存在其它的结构单元与处于未折叠状态的 OMPs 相互识别。POTRA 与 BAM 复合体其它各组分, 特别是 BamB 的绑定也相关。显然很多时候并不需要 5 个 POTRA 共同作用, 但几乎所有的革兰氏阴性菌都有 5 个 POTRA, 可能为折叠较大的 OMPs 时提供更大的绑定面积。

3.2 BamB

BAM 复合体中 BamB 的功能和结构研究的最为详细, BamB 与 BamA 的 POTRA₂₋₄ 直接接触, 形成 β -propeller, 可能协调 BamA 的 POTRA_s 与复合体的其它单体及折叠底物的结合强度, BamB 的缺失会减少正确折叠和组装到外膜的蛋白量, 但不致死^[22, 25-26]。BamB 缺失突变株和 SurA 的缺失突变株有类似的表型, 表明 BamB 还可能与 SurA 相互作用, 将未折叠的 OMPs 传递给 BamA^[27]。BamB 和 SurA 同时缺失或 BamB 与 DegP 同时缺失对细胞都是致死的^[28], 如上文所述 SurA 与 DegP 都是周质空间中传递未折叠 OMPs 到外膜的分子伴侣, 因此可推测 BamB 是在 OMPs 折叠的初始阶段发挥作用。由于受 BamB 缺失影响的都是较大的 OMPs (16 - 24 个 β -片层), 也有人推测 BamB 可增强 BAM 复合体结合底物的容量。BamB 的晶体结构分析也表明存在蛋白相互作用位点, 说明它具有结合底物功能的可能性^[25-26]。

3.3 BamC

BamC 在 γ -变形杆菌中高度保守, 它的缺失会影响部分 OMPs 的折叠, 但不致死^[29]。非变性凝胶电泳结合蛋白印迹杂交技术研究结果表明 BamC 的缺失会影响 BAM 复合体的稳定性^[30]。限制性蛋白酶解分析 (Limited Proteolysis) 和核磁共振结构分析发现 BamC 的 C-末端和 N-末端形成独立的 2 个结构域, 中间以高柔性的 linker 链接, 具有高度构象可塑性, N-末端 70 - 100 个氨基酸残基片段无固定的

构象^[31-32]。与 BamD 的复合结晶分析也表明,其 N-末端在复合结晶形成中至关重要,而且与预测的 BamD 底物结合位点重合,因此推测 BamC 可能有调节底物结合的功能^[33]。有意思的是, BamC 的很大一部分结构被发现暴露在细胞表面,具有到目前为止还未发现过的细菌脂蛋白结构^[30],这种特殊的结构可能在跨膜的 OMPs 折叠和组装过程中具有重要的意义,但具体的功能和结构还有待进一步研究。

3.4 BamD

BamD 是 BAM 复合体中必需的脂蛋白单体,也是脂蛋白单体中保守性最强的,与折叠底物 OMPs 直接接触,其缺失是致死的^[18]。已有的研究表明, BamD 与 BamA 的 POTRA₅、BamC 和 BamE 相互作用,其立体结构主要是由 α -螺旋和 5 个 34 肽重复序列 (Tetratricopeptide Repeat) 构成,可特异性的识别和结合双极性多肽序列,可能在识别与结合外膜蛋白 C-末端保守信号序列中起着关键的作用^[33]。

3.5 BamE

BamE 是 BAM 复合体中最新发现的单体,可能以二聚体的形式存在,不是 BAM 的必需组分,它的缺失仅引起轻微的 OMPs 折叠缺陷^[15]。在缺失 BamE 的情况下, BAM 复合体的稳定性降低,表明它的功能是维持复合体的结构稳定性, *E. coli* 的 BamB 和 BamE 双重缺失突变株表现出条件致死性, BamA 的折叠亦受到严重影响,对蛋白酶解抵抗力降低,但 BamA 的 β -桶状结构域单个氨基酸的突变即可回补这种因 BamE 缺失引起的缺陷,从另一个角度证明了 BamA 的中心作用^[15, 34]。核磁共振谱分析显示 BamE 特异性的与磷脂酰甘油结合,结合位点与 BamD 的相互作用位点部分重合,可见 BamE 可能通过与 BamD 的相互作用调节 BamA 的构象和稳定性^[20]。磷脂酰甘油可促进 OMPs 体外折叠的膜插入效率, BamE 可能在体内通过向复合体提供磷脂酰甘油从而提高膜插入效率^[35]。我们对低温菌 *Shewanella livingstonensis* Ac10 的外膜蛋白 Omp74 的研究中也发现,含多聚不饱和脂肪酸二十碳五烯酸的磷脂在体外可促进 Omp74 的二级结构的形成,提高其折叠效率,而且还影响 Omp74 在体内的结构^[36],可见与 BamE 特异性结合的磷脂质的确有可能影响 OMPs 的折叠与组装过程。

3.6 β -桶状结构外膜蛋白折叠与组装模式

综合现有的研究结果,研究者们提出了多种不

同 OMPs 折叠组装模式^[14]: (1) BamA 孔内折叠模式 (the Pore-folding Model), BAM 复合体的其它单体及分子伴侣协作将 OMPs 引入 BamA 的 β -桶状结构孔腔内折叠然后释放到膜中,这一模式存在的问题是 BamA 的孔腔大小并不足以容纳处于折叠状态的 OMPs,另外折叠后的 OMPs 的释放在这一模式也很难实现; (2) 复合体孔内折叠模式 (the Complex Pore-folding Model), 外膜折叠的环境不是 BamA 的桶状结构内部,而是在 BAM 形成多聚体之间的空隙,这一模式可以很好的解决第一种模式中存在的两个问题; (3) 模板模式 (the Barrel-folding Model), BamA 为 OMPs 的折叠提供模板,这一模式实际上跟其它模式并不矛盾,在其它模式所设定的机制下, BamA 同样可以作为 OMPs 的折叠模板; (4) 分子伴侣折叠模式 (the Chaperone-folding Model), 周质空间的分子伴侣,特别是 DegP, 在转运 OMPs 的过程中就将其折叠完毕,这一模式与 SurA 可替代 DegP/Skp 分子伴侣转运途径的实验结果存在矛盾,从能量消耗的角度考虑也不合理; (5) 辅助模式 (the Accessory Folding Model), BAM 复合体负责折叠 OMPs,然后将折叠好的蛋白交给分子伴侣插入外膜中,分子伴侣中 DegP 最有可能协助 OMPs 插入外膜,如果是这样,这一模式又与 SurA 可替代 DegP/Skp 分子伴侣转运途径的实验结果存在矛盾。

4 β -桶状结构外膜蛋白生物合成过程模式的改进

使用脂质体 (Liposome) 对 OMP 的体外折叠实验表明 OMP 先吸附在磷脂膜的表面形成部分 β -片层的二级结构并相互靠近,然后再在跨膜的同时形成 β -桶状结构^[10],并且膜上预先存在的 OMPs 能提高折叠效率^[37]。可以将 OMPs 体外折叠的研究结果与文中所叙述的 BAM 复合体相关研究结果结合得出如下的 OMPs 的生物合成过程 (图 2)。

(1) OMPs 在核糖体上合成后被导向内膜的 Sec 转运子,通过内膜的同时信号肽被切除,然后以非折叠的状态被分子伴侣 Skp 或 DegP/SurA 运送到 BAM 复合体; (2) BamD 识别 OMPs 的 C-末端标定序列,将 OMPs 传递给 BamA,必要时 BamBCE 可为底物结合提供更多的位点或调节 BamD 的底物结合能力; (3) 然后 BamA 的 POTRA_s 与底物结合并将其

导向到由 2 个以上 BAM 复合体聚集形成的 β -桶状结构围成跨膜的疏水性内腔, 该疏水性内腔既为 OMPs 提供一个折叠的支架, 也可作为 β -折叠的提供折叠模板, 当然 BAM 的其它单体也可能参与这一过程, 如 BamE 可吸引磷脂促进底物结合或提高折叠效率, 这些因素使得 OMPs 可以实现快速跨膜和折叠; (4) 最后折叠好的 OMPs 通过 BAM 复合体在膜内的移动从 BamAs 间的疏水腔释放到膜中进行自我平衡完成整个折叠过程, 这种 OMP 折叠并整合到膜中后自我平衡过程曾被傅里叶能量共振转移测量体外折叠的 OmpA 证明^[38], 磷脂的烃基链组成和膜内其它蛋白组分可能通过影响 BamAs 在膜中的横向移动。

5 β -桶状结构外膜蛋白生物合成过程中 BAM 复合体与磷脂相互作用的研究前景

目前关于 OMPs 在外膜上的折叠和组装相关研究主要限于 BAM 复合体的结构和功能, 但却很少有人考虑到磷脂的组成对 BAM 复合体及其功能的影响。我们对 *S. livingstonensis* Ac10 的磷脂组成、二十碳五烯酸合成缺失突变与膜蛋白组成分析结果显示, 磷脂的组成会受培养的温度、盐度等各种外界因素影响, 二十碳五烯酸一种脂肪酸的缺失就会导致 Ac10 的膜蛋白组成及部分膜蛋白结构发生改变^[36]。BAM 复合体的核心组成部分 BamA 是跨膜蛋白, 存在于磷脂双分子层中, 而磷脂的烃基链组成, 如烃链长度、饱和度和亲水头部的大小等会导致磷脂双分子层的流动性、亲水性头部间和疏水性烃链间的侧向压力等发生改变, 从而在很大程度上影响镶嵌在磷脂膜中的蛋白质构象及其在膜中的侧向移动能力, 因此今后研究 BAM 复合体的结构及其单体间的相互作用研究的同时, 探索磷脂的组成对 BAM 复合体各单体的构象和它们相互作用的影响、对 OMPs 生物合成的影响可能会是另外一个解开 OMPs 外膜折叠与组装之谜的良好途径。

遗憾的是, 到目前为止还未见关于磷脂与 BAM 复合体相互作用的相关报道, 其实可以通过体内原位研究和体外重折叠系统两种方式进行这方面的研究。体内研究可以采用对 BAM 复合体中各组分的定点突变, 结合限制性蛋白酶切、蛋白印迹杂交等方

法进行, 整合在膜里的 BamA 由于细胞外膜的保护, 对蛋白酶 K 的降解具有一定的抵抗力, Rigel 等用这些方法证明了 BAM 复合体中的脂蛋白单体在 OMP 折叠过程中会影响 BamA 的构象^[39], 如果再结合对特定磷脂成分的缺失突变, 就可以研究磷脂组分对 BAM 复合体的影响。在线粒体中就采用缺失突变的方法获得了磷脂组分, 如磷脂酰乙醇胺和心磷脂对其外膜蛋白生物合成的影响。如果要知道某些特殊的脂肪酸对 BAM 复合体的共价修饰, 可以合成相应的探针, 用动态组合化学 (Click Chemistry) 的方法进行研究。我们曾经合成二十碳五烯酸的探针, 通过动态组合化学结合免疫共沉淀的方法发现 *S. livingstonensis* Ac10 中的多种重要的膜蛋白被二十碳五烯酸修饰 (未发表数据)。但由于细菌细胞膜的结构与组成复杂, 很多时候胞内原位研究磷脂与膜蛋白的相互作用比较困难, 特别是当研究磷脂膜仅仅引起 BAM 复合体的轻微构象变化或对 OMPs 折叠效率有影响的时候。这种情况下可以采用含特定磷脂的脂质体胞外重折叠系统结合 OMPs 体外折叠常用方法进行, 如 SDS-PAGE、色氨酸荧光光谱分析、核磁共振分析、傅里叶能量共振转移分析等。我们用体外折叠系统结合 CD、荧光猝灭、限制性酶切分析等方法曾发现脂质体中 5% 摩尔百分含量二十碳五烯酸的磷脂就可以引起外膜蛋白 Omp74 的构象变化 (未发表数据)。McMorran 等也通过 OMPs 体外重折叠系统表明磷脂与分子伴侣 Skp 之间的静电相互作用可促进 Skp 传递 OMPs 到膜上^[40]。BAM 复合体可以在 *E. coli* 中大量表达, 然后以复合体的形式纯化并整合到脂质体中促进外膜蛋白折叠^[16]。可见体外研究 BAM 复合体与磷脂的相互作用及其对 OMPs 折叠效率的影响是可行的。当然, 通过巧妙的实验设计, 还有很多其它生物学研究方法可以利用, 此处限于篇幅不再赘述, 希望能起到抛砖引玉的作用, 在不久的将来外膜蛋白折叠与组装过程不再是一个谜。

参考文献

- [1] Gatsos X, Perry AJ, Anwari K, Dolezal P, Wolyne PP, Likic VA, Purcell AW, Buchanan SK, Lithgow T. Protein secretion and outer membrane assembly in Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32 (6) :995-1009.

- [2] Dalbey RE, Kuhn A. Protein Traffic in Gram-negative bacteria – how exported and secreted proteins find their way. *FEMS Microbiology Reviews*, 2012, 36 (6) :1023–1045.
- [3] Randall LL, Crane JM, Lilly AA, Liu GP, Mao CF, Patel CN, Hardy SJS. Asymmetric binding between SecA and SecB two symmetric proteins: Implications for function in export. *Journal of Molecular Biology*, 2005, 348 (2) :479–489.
- [4] Gatzeva-Topalova PZ, Walton TA, Sousa MC. Crystal Structure of YaeT: Conformational Flexibility and Substrate Recognition. *Structure*, 2008, 16 (12) :1873–1881.
- [5] Volokhina EB, Grijpstra J, Stork M, Schilders I, Tommassen J, Bos MP. Role of the periplasmic chaperones Skp, SurA, and DegQ in outer membrane protein biogenesis in *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (7) :1612–1621.
- [6] Krojer T, Garrido-Franco M, Huber R, Ehrmann M, Clausen T. Crystal structure of DegP (HtrA) reveals a new protease-chaperone machine. *Nature*, 2002, 416 (6879) :455–459.
- [7] Sklar JG, Wu T, Kahne D, Silhavy TJ. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, 2007, 21 (19) :2473–2484.
- [8] Spiess C, Beil A, Ehrmann M. A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell*, 1999, 97 (3) :339–347.
- [9] Conlan S, Bayley H. Folding of a monomeric porin, OmpG, in detergent solution. *Biochemistry*, 2003, 42 (31) :9453–9465.
- [10] Kleinschmidt JH, Bulieris PV, Qu J, Dogterom M, den Blaauwen T. Association of neighboring β -strands of outer membrane protein A in lipid bilayers revealed by site-directed fluorescence quenching. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 407 (2) :316–332.
- [11] Wu T, Malinverni J, Ruiz N, Kim S, Silhavy TJ, Kahne D. Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*. *Cell*, 2005, 121 (2) :235–245.
- [12] Voulhoux R, Bos MP, Geurtsen J, Mols M, Tommassen J. Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science*, 2003, 299 (5604) :262–265.
- [13] Hagan CL, Kahne D. The reconstituted *Escherichia coli* Bam complex catalyzes multiple rounds of β -barrel assembly. *Biochemistry*, 2011, 50 (35) :7444–7446.
- [14] Knowles TJ, Scott-Tucker A, Overduin M, Henderson IR. Membrane protein architects: the role of the BAM complex in outer membrane protein assembly. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7 (3) :206–214.
- [15] Rigel NW, Schwalm J, Ricci DP, Silhavy TJ. BamE modulates the *Escherichia coli* beta-barrel assembly machine component BamA. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (5) :1002–1008.
- [16] Hagan CL, Kim S, Kahne D. Reconstitution of outer membrane protein assembly from purified components. *Science*, 2010, 328 (5980) :890–892.
- [17] Robert V, Volokhina EB, Senf F, Bos MP, Van Gelder P, Tommassen J. Assembly factor Omp85 recognizes its outer membrane protein substrates by a species-specific C-terminal motif. *PLoS Biology*, 2006, 4 (11) :1984–1995.
- [18] Ricci DP, Hagan CL, Kahne D, Silhavy TJ. Activation of the *Escherichia coli* β -barrel assembly machine (Bam) is required for essential components to interact properly with substrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109 (9) :3487–3491.
- [19] Sanchez-Pulido L, Devos D, Genevrois S, Vicente M, Valencia A. POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of β -barrel outer membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 2003, 28 (10) :523–526.
- [20] Gatzeva-Topalova PZ, Warner LR, Pardi A, Sousa MC. Structure and flexibility of the complete periplasmic domain of BamA: the protein insertion machine of the outer membrane. *Structure*, 2010, 18 (11) :1492–1501.
- [21] Knowles TJ, Jeeves M, Bobat S, Dancea F, McClelland D, Palmer T, Overduin M, Henderson IR. Fold and function of polypeptide transport-associated domains responsible for delivering unfolded proteins to membranes. *Molecular Microbiology*, 2008, 68 (5) :1216–1227.
- [22] Heuck A, Schleiffer A, Clausen T. Augmenting β -Augmentation: Structural Basis of How BamB Binds BamA and May Support Folding of Outer Membrane Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 406 (5) :659–666.
- [23] Bos MP, Robert V, Tommassen J. Functioning of outer membrane protein assembly factor Omp85 requires a single POTRA domain. *EMBO Reports*, 2007, 8 (12) :1149–1154.
- [24] Workman P, Heide K, Giuliano N, Lee N, Mar J, Vuong P, Bennion D, Misra R. Genetic, biochemical, and

- molecular characterization of the polypeptide transport-associated domain of *Escherichia coli* BamA. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (13) :3512-3521.
- [25] Kim KH, Paetzel M. Crystal Structure of *Escherichia coli* BamB, a Lipoprotein Component of the β -Barrel Assembly Machinery Complex. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 406 (5) :667-678.
- [26] Noinaj N, Fairman JW, Buchanan SK. The Crystal Structure of BamB Suggests Interactions with BamA and Its Role within the BAM Complex. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 407 (2) :248-260.
- [27] Palomino C, Marin E, Fernandez LA. The Fimbrial Usher FimD Follows the SurA-BamB Pathway for Its Assembly in the Outer Membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193 (19) :5222-5230.
- [28] Onufryk C, Crouch ML, Fang FC, Gross CA. Characterization of six lipoproteins in the sigmaE regulon. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (13) :4552-4561.
- [29] Anwari K, Webb CT, Poggio S, Perry AJ, Belousoff M, Celik N, Ramm G, Lovering A, Sockett RE, Smit J. The evolution of new lipoprotein subunits of the bacterial outer membrane BAM complex. *Molecular Microbiology*, 2012, 84 (5) :832-844.
- [30] Webb CT, Selkraig J, Perry AJ, Noinaj N, Buchanan SK, Lithgow T. Dynamic association of BAM complex modules includes surface exposure of the lipoprotein BamC. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 422 (4) :545-555.
- [31] Warner LR, Varga K, Lange OF, Baker SL, Baker D, Sousa MC, Pardi A. Structure of the BamC two-domain protein obtained by Rosetta with a limited NMR data set. *Journal of Molecular Biology*, 2011, 411 (1) :83-95.
- [32] Albrecht R, Zeth K. Structural Basis of Outer Membrane Protein Biogenesis in Bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (31) :27792-27803.
- [33] Kim KH, Aulakh S, Paetzel M. Crystal structure of β -barrel assembly machinery BamCD protein complex. *The Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286 (45) :39116-39121.
- [34] Tellez R Jr, Misra R. Substitutions in the BamA β -barrel domain overcome the conditional lethal phenotype of a DeltabamB DeltabamE strain of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (2) :317-324.
- [35] Knowles TJ, Browning DF, Jeeves M, Maderbocus R, Rajesh S, Sridhar P, Manoli E, Emery D, Sommer U, Spencer A. Structure and function of BamE within the outer membrane and the β -barrel assembly machine. *Embo Reports*, 2011, 12 (2) :123-128.
- [36] Dai XZ, Kawamoto J, Sato SB, Esaki N, Kurihara T. Eicosapentaenoic acid facilitates the folding of an outer membrane protein of the psychrotrophic bacterium, *Shewanella livingstonensis* Ae10. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 425 (2) :363-367.
- [37] Ye C, Chai Q, Zhong M, Wei YN. Effect of crowding by Ficolls on OmpA and OmpT refolding and membrane insertion. *Protein Science*, 2013, 22 (2) :239-245.
- [38] Kang GP, Lopez-Pena I, Oklejas V, Gary CS, Cao WH, Kim JE. Forster resonance energy transfer as a probe of membrane protein folding. *BBA Biomembranes*, 2012, 1818 (2) :154-161.
- [39] Rigel NW, Ricci DP, Silhavy TJ. Conformation-specific labeling of BamA and suppressor analysis suggest a cyclic mechanism for beta-barrel assembly in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110 (13) :5151-5156.
- [40] McMorran LM, Bartlett AI, Huysmans GH, Radford SE, Brockwell DJ. Dissecting the Effects of Periplasmic Chaperones on the *In Vitro* Folding of the Outer Membrane Protein PagP. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425 (17) :3178-3191.

Research progress on the folding and membrane-insertion mechanisms of β -barrel outer membrane protein of gram-negative bacteria—A review

Xianzhu Dai^{*}, Feng Luo

Research Center of Bioenergy and Bioremediation, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: β -Barrel outer membrane proteins are the major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria, which are in contact with the extracellular environment directly. β -barrel outer membrane proteins play key roles in nutrients absorption and keeping membrane integrity. They are also involved in the pathogenicity and multiple-antibiotic resistance of pathogenic bacteria. Therefore, β -barrel outer membrane proteins are very important for the survive of bacteria cells, and full understanding of the biosynthesis, folding and membrane insertion of these proteins is of great significance for fighting against pathogenic bacteria and utilization of beneficial bacteria. In this article, the research progress on the biosynthesis in cytoplasm, the translocation across the inner membrane, transportation to periplasm and the folding and membrane insertion of β -barrel outer membrane proteins are reviewed, and the progress on the study of OMPs assembly machinery is emphasized.

Keywords: Outer membrane protein, transportation, folding, membrane insertion, OMP assembly machinery

(本文责编:张晓丽)

Supported by the Basic Scientific Research Foundation of Central Colleges (XDJK2012C033) and by the Doctoral Foundation of Southwest University (SWU112018)

^{*} Corresponding author. Tel: +86-23-68250279; Fax: +86-23-68250109; E-mail: daixianzhu@126.com

Received: 24 June 2013 / Revised: 4 September 2013

《微生物学报》审稿程序

本刊严格遵守“三审制”，即：编辑部内审，专家外审，主编总审。从投稿日期开始，争取在2个月之内给出审稿结果，3-6个月之内发表。

- (1) 收到来稿后，首先要由编辑初审，通过后再送外审。将请2位专家进行审阅，再送主编进行最后的总审，这个过程一般不会超过2个月。如果初审2位专家的意见分歧较大，编辑部将再请第3位专家进行初审，之后再送主编总审，那么此稿的审理时间可能会超过2个月。
- (2) 完成审稿后（即主编给出总审意见），编辑会给作者发出E-mail告知修改意见（包括学术上的和写作格式上的）。作者在返回修改稿后，经本刊审核合格后方可被录用。

在此提醒作者，在没有完成全部审稿之前，不要在远程系统中看到初审意见时就急于返回修改稿件。