



单增李斯特菌氧化还原蛋白系统研究进展

韩月, 叶佳雯, 程昌勇*, 宋厚辉*

浙江农林大学动物科技学院, 动物医学院, 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311300

摘要: 单增李斯特菌是重要的食源性病原微生物, 抗氧化应激是李斯特菌生存和致病的关键机制之一。活性氧(reactive oxygen species, ROS)浓度升高会破坏氧化还原平衡, 使机体处于氧化胁迫的应激状态, 进而导致生物大分子如蛋白质的损伤。蛋白质中半胱氨酸等含硫氨基酸对 ROS 尤其敏感, 半胱氨酸残基脱氢氧化生成二硫键, 可以稳定蛋白质空间构象, 增加蛋白质的半衰期, 进而使蛋白质免受损坏。抗氧化修复通常指的是对半胱氨酸残基的氧化还原过程, 即二硫键的形成与打开。硫氧还蛋白家族包含硫氧还蛋白、谷氧还蛋白和 Dsb-样蛋白系统, 是生物体中常见的氧化还原修复系统。本文根据现有的文献报道, 结合本课题组的研究进展, 对单增李斯特菌硫氧还蛋白家族进行综述, 以期完善单增李斯特菌硫氧还蛋白调控系统提供参考。

关键词: 单增李斯特菌, 硫氧还蛋白家族, 硫氧还蛋白, 谷氧还蛋白, Dsb-样蛋白

氧化胁迫是细菌生长繁殖中最易受到的压力胁迫之一^[1]。氧化剂是食品储存和运输中常用的高效廉价杀菌物质^[2]。正常细菌体内广泛存在维持细胞内氧化还原稳态的抗氧化物、抗氧化酶和氧化还原系统, 且具有多样性。在革兰氏阴性菌中, 二硫键形成发生在具有氧化环境的细胞周质中, 而在缺少细胞周质的革兰氏阳性菌中, 胞质外巯基-二硫化物氧化还原酶(TDORs)在细胞壁上发挥作用^[3]。细胞结构差异滞后了对革兰氏

阳性菌 TDORs 的研究, 曾一度认为革兰氏阳性菌中缺乏巯基/二硫键的互换通路, 直到近十年, 许多革兰氏阳性菌的 TDORs 才被发现^[4-5]。单核细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*), 简称单增李斯特菌, 为食源性条件致病菌, 抗氧化压力系统是单增李斯特菌生存进而致病的基础^[6]。因此, 对硫氧还蛋白家族展开研究有助于理解单增李斯特菌抗氧化应激调控网络和致病机制。

基金项目: 国家自然科学基金(31902280, 31872620, 31770040); 浙江省自然科学基金(LZ19C180001, LQ19C180002, LQ20C010001); 浙江农林大学人才项目(118-2034020027); 浙江农林大学学生科研训练项目(118-2013200168); 浙江省畜禽绿色生态健康养殖应用技术研究重点实验室科研项目

*通信作者。E-mail: 程昌勇, Lamge@zafu.edu.cn; 宋厚辉, songhh@zafu.edu.cn

收稿日期: 2020-04-04; 修回日期: 2020-06-15; 网络出版日期: 2020-08-07

1 单增李斯特菌硫氧还蛋白系统的生物学功能研究

1.1 硫氧还蛋白系统的组成以及作用机理

硫氧还蛋白系统由硫氧还蛋白(Trx)、硫氧还蛋白还原酶 TrxR(TR)和还原底物烟酰胺腺嘌呤(NADPH)组成,硫氧还蛋白还原酶 TRs在大肠杆菌(*E. coli*)中由 TrxB 编码,负责向氧化态 Trxs 转移电子。Trxs 在 *E. coli* 等革兰氏阴性菌中有 2 个拷贝,位于胞质中的为 Trx1,由 TrxA 编码,是 Trx 系统中的氧化还原蛋白^[7]。位于线粒体中的为 Trx2,由 TrxC 编码,是含有锌离子的独特蛋白,Trx2 表达需要 Trx 系统中的氧化还原蛋白 H₂O₂ 感受器 OxyR 的诱导,提示 Trx2 在氧化环境中执行特殊的功能^[7]。

1964 年 Trx 蛋白在 *E. coli* 中首次被确认为氧化还原蛋白。*E. coli* Trx 含有 108 个氨基酸残基,

分子量为 12–13 kDa,活性位点为“-CGPC-”,结构是 4 个 α 螺旋包裹的 5 个 β 折叠,称为 Trx 折叠,是 Trx 家族特有的结构^[8]。

Trx 系统的工作原理是还原态 Trx[Trx-(SH)₂]传递电子至底物中,实现底物的还原,而 Trx [Trx-(SH)₂]发生氧化转变为氧化态 Trxs(Trx-S₂); NADPH 负责向 TrxR 传递电子,使 TR 保持还原态;还原态的 TRs 向氧化态 Trxs 传递电子,使氧化态 Trxs 转变为还原态,实现氧化还原循环(图 1)。Trx 系统具有以下特点:(1) TR 结构相对保守,无种属特异性,异源的 TR 也可以向 TrxA 传递电子,发挥还原酶作用。(2) Trx 系统的底物具有多样性,一般新陈代谢的参与者、抗氧化系统-抗氧化剂酶、氧化损伤修复循环酶和细胞信号通路调节酶等都是 Trx 系统的底物。通过传递电子到底物中,实现目的蛋白的氧化还原。

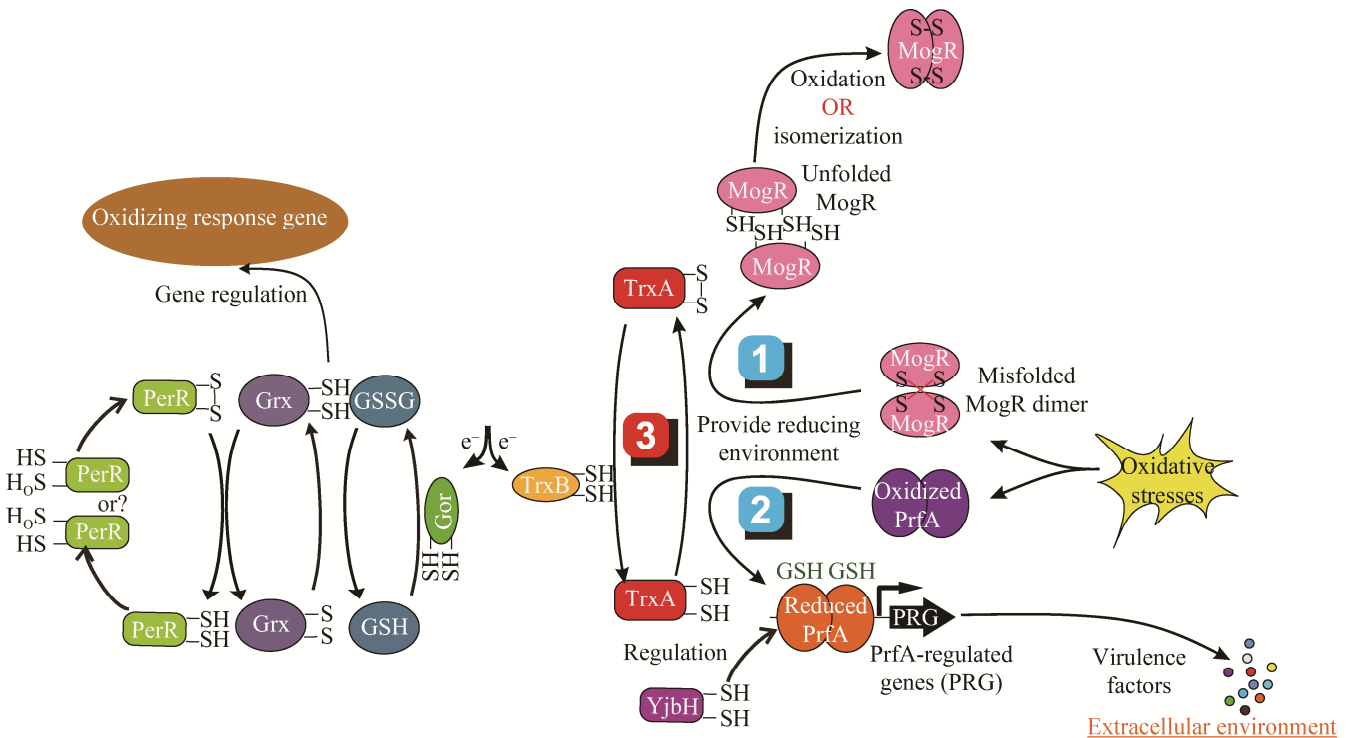


图 1. 单增李斯特菌硫氧还蛋白家族成员的作用模式

Figure 1. Review on roles of the thioredoxin family from *Listeria monocytogenes*.

1.2 单增李斯特菌 Trx 的抗氧化应激和感染生物学功能研究

单增李斯特菌 TrxA 由 *lmo1233* 编码, 含有 103 个氨基酸, 具有 CX₁X₂C 基序和 Trx 折叠, 半胱氨酸残基 Cys28 和 Cys31 是决定 TrxA 功能的活性位点。胰岛素还原试验表明 TrxA 可以高效且特异地还原胰岛素(insulin), 证实 TrxA 具有还原酶活性。生物学特性分析显示缺失 *trxA* 后李斯特菌的生长和存活能力减弱, 致病力显著降低, *actA*、*hly* 等毒力因子的转录水平降低。等温滴定量热(ITC)试验进一步发现 TrxA 与李斯特菌 cAMP 受体蛋白家族转录调控因子 PrfA(毒力中枢调控蛋白, 单体含有 4 个半胱氨酸)在体外能够发生明显的放热式互作, 并对 PrfA 二聚体进行氧化还原修饰使其处于正确折叠和活化状态, 进而调控下游毒力基因的表达并介导李斯特菌发挥致病性^[9-10]。该结果表明 TrxA 通过对 PrfA 进行氧化还原修饰, 进而调控下游毒力因子的表达, 介导李斯特菌的致病过程^[11]。这与已经报道的 GSH 作为 PrfA 的变构激活剂, 通过调控 PrfA 来调控单增李斯特菌的毒力的方式是相似的^[12]。证明 TrxA 催化的氧化还原反应在细菌致病过程中发挥重要作用。

2 单增李斯特菌谷氧还蛋白系统的生物学功能研究

2.1 谷氧还蛋白系统的组成及作用机理

谷氧还蛋白系统(GSH-Grx)由谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽还原酶 Gor(GR)和 NADPH 组成。是机体中另一个主要的巯基依赖性的抗氧化系统, 是 Trx 系统的强有力补充^[13-14]。谷氧还蛋白(Grx)是在 Δ *trx* 缺失株中寻找还原核苷酸还原酶

(ribonucleotide reductase, RNR)的替代物时发现的。Grx 负责催化活性位点 CX₁X₂C 间巯基和二硫键的互换, 参与蛋白质的折叠与修饰, 是维持细胞氧化还原稳态以及消除细胞内 ROS 的另一个重要调节因子^[15]。*E. coli* Grx 是含有 85 个氨基酸残基的小分子蛋白质, 具有 Trx 家族蛋白特有的 Trx 折叠, 其结构是 3 个 α 螺旋包裹的 4 个 β 折叠。Grxs 系统的特点是以 GSH 为还原剂, 参与到底物蛋白二硫键的还原和抗氧化应激防御中。

Grx 催化底物蛋白还原的过程与 Trx 介导的氧化还原过程相似, 即还原态的 Grxs(Grx_{red})与氧化态的底物蛋白(substrate_{ox})作用, 当底物蛋白二硫键打开被还原为巯基时, Grxs 转变为氧化态(Grx_{ox}), 随后被 GSH 还原, 在此过程中 GSH 被氧化成 GSSG, 进而释放还原态的 Grx(Grx_{red})和氧化态的谷胱甘肽(GSSG)分子; GSSG 被 NADPH 依赖的谷胱甘肽还原酶 Gor 还原成 GSH, 实现氧化还原循环^[7]。如图 1 所示。

2.2 单增李斯特菌 Grx 的抗氧化应激和感染生物学的功能研究

与 Trx 不同的是, 围绕 Grx 的研究还比较少。已知单增李斯特菌 GSH-Grx 系统中谷胱甘肽还原酶(Gor)由 *lmo0906* 和 *lmo1433* 编码, GSH 由谷胱甘肽合成酶基因 *GshF* 合成, Grx 由 *lmo2344* 编码。胰岛素还原实验发现在二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)存在的条件下, Grx 能够有效催化胰岛素二硫键还原, 证实 Grx 具有还原酶活性。氧化应激结果显示, Grx 缺失后, 李斯特菌更易产生氧化耐受, 在遇到胍、Cu²⁺金属离子氧化剂时 Grx 缺失株较野生株存活率增高。感染生物学研究表明 Grx 缺失株的致病力更强。表明 Grx 在单增李斯特菌氧化耐受和致病过程中扮演着重要角色^[16]。等温

滴定量热(ITC)试验进一步发现 Grx 与 PrfA 之间不存在相互作用, 表明 Grx 不是通过氧化还原 PrfA 来介导单增李斯特菌致病, 提示李斯特菌中存在更为复杂的间接调控网络参与 Grx 介导的致病过程。过氧化物操纵子调节因子(PerR)是革兰氏阳性菌的氧化压力调控因子, 为转录抑制家族成员, 被氧化后活性丢失进而诱导氧化应激基因的转录^[17-18]。研究表明 PerR 缺失后李斯特菌对 H₂O₂ 更敏感, 下游受调控的基因如 *fur*、*trxB*、*kat*、*hema* 的转录水平增高^[6,19]。因此我们推测当 Grx 缺失、李斯特菌暴露于氧化环境时, 转录抑制剂 PerR 发生不可逆的失活, PerR 调控的氧化应激基因便失去了抑制, 进而介导单增李斯特菌的抗氧化应激和致病过程^[16]。

3 单增李斯特菌二硫键氧化还原蛋白(Dsb-like)的抗氧化应激和生物学功能研究

3.1 二硫键氧化还原蛋白家族及作用机理

硫氧还蛋白家族成员还包括二硫键氧化还原蛋白(Dsb-样蛋白)^[20-22]。Dsb 蛋白家族含有 DsbA、DsbB、DsbC 和 DsbD 蛋白。Dsb 家族成员协同合作, 实现蛋白质二硫键的氧化和异构, 完成对新生肽链的正确加工。Dsb 蛋白的作用过程是, 当含有两个半胱氨酸残基的底物蛋白从细胞质进入细胞周质后, 氧化还原电位增高, 产生空间位阻, 促使蛋白质形成二硫键。周质蛋白二硫键的形成由 DsbA 催化, 随后 DsbA 的活性位点被还原^[23]。DsbB 是大小为 20 kDa 的跨膜蛋白, 包含两个二硫键的周质环, 通过电子传递, 实现对 DsbA 的重新氧化, 为开始新一轮催化反应作准备。DsbA

具有高度催化活性, 同时又具有非底物特异性, 当底物中含有多个半胱氨酸时, 在 DsbA 作用下, 相邻的半胱氨酸残基形成二硫键, 所以容易发生二硫键错配进而影响蛋白质活性。为修复蛋白质中错误折叠的二硫键, 在细胞周质中还存有二硫键异构酶 DsbC, 当蛋白质中含有多个半胱氨酸残基时 DsbC 会对蛋白质中的二硫键进行重新排列, 进而修复错误的二硫键^[24]。DsbC 以还原态形式存在, 其功能发挥离不开伴侣蛋白 DsbD 的作用, DsbD 为二硫键异构还原酶, 通过从细胞质向细胞周质传递电子基团在还原 DsbC 过程中起着关键作用^[7]。

原核生物中, Dsb 蛋白尤其是 DsbA 是非常重要的蛋白, 是 Dsb 家族中最早发现和研究的二硫键氧化还原蛋白, 通常与细菌的抗氧化应激和致病密切相关。DsbA 是大小为 21 kDa 的可溶性氧化还原酶, 具有 Trx 折叠, DsbA 活性位点为“-CPHC-”序列^[25]。

3.2 单增李斯特菌 Dsb-like 蛋白的抗氧化应激和生物学功能研究

已知单增李斯特菌使用 DsbA-样蛋白和 DsbG 蛋白参与抗氧化应激, 但是具体编码基因还不清楚^[26-27]。研究报道 DsbA 突变会导致细菌毒素分泌减少, 如霍乱弧菌的霍乱毒素、致病性大肠杆菌的肠毒素和百日咳杆菌的百日咳外毒素; 也会导致志贺氏菌、耶尔森氏菌和鼠伤寒沙门菌的 T3SS 系统不能有效运输效应蛋白^[28]。因此, DsbA 应该具有介导毒力因子二硫键形成的性质。研究报道单增李斯特菌 Spx 家族转录调控因子 SpxA 是响应氧化应激和致病的重要转录调控因子^[29]。在其他革兰氏阳性菌中 SpxA 被蛋白酶体 ClpXP 降解的过程受 YjbH 的调控^[30-31]。因此, 我们猜测

YjbH 有可能参与单增李斯特菌的氧化还原过程。通过生物信息学分析发现单增李斯特菌存在 DsbA 家族蛋白(YjbH), 由 *lmo0964* 编码, 含有 CX₁X₂C 基序。氧化应激结果显示, YjbH 缺失后, 细菌对金属离子氧化剂 CuCl₂ 和 CdCl₂ 的敏感性显著降低, 提示 YjbH 参与单增李斯特菌的抗氧化应激过程。Co-IP 实验显示, 单增李斯特菌 YjbH 与氧化应激转录因子 SpxA1 发生互作, 介导细菌鞭毛蛋白转录抑制子(MogR)二硫键的形成或者异构, 提示单增李斯特菌中存在 Spx-YjbH-ClpXP 的抗氧化应激调控机制。此外, YjbH 缺失后单增李斯特菌在小鼠模型中完全丧失毒力, 在脾脏、肝脏中的定殖能力均下降。在 BHI 富营养培养基中 PrfA 的表达量显著上升且不影响毒力因子转录水平, 表明在营养丰富条件下 YjbH 通过抑制 PrfA 表达来保持细菌毒力与野生株一致。在 CdCl₂ 应激条件下的转录组数据显示, yjbH 缺失后导致受 PrfA 调控的 *hly* 等毒力因子转录水平显著下调, 且能正调控阻遏 PrfA 活性的磷酸转移酶系统(PTS)。进一步说明在氧化胁迫条件下, yjbH 通过调控 PrfA 影响细菌的毒力(数据未发表)。

4 Trx、Grx 以及 Dsb-like 蛋白的关联

4.1 Trx、Grx 以及 Dsb-like 蛋白的共性

硫氧还蛋白家族成员 Trx、Grx 和 Dsb 样蛋白均含有“-CXXC-”催化位点, 且活性位点附近有顺式脯氨酸环, 相同的结构特征赋予了硫氧还蛋白具有识别底物和催化二硫键氧化还原反应的能力^[32]。其次, 可能与谷胱甘肽转移酶 GshT 和谷胱甘肽过氧化物酶 Gsh-Px 等氧化还原蛋白具有同源性, 且均来源于谷胱甘肽结合蛋白^[33]。

氧化还原电荷和氧化还原电位是反映氧还蛋

白的氧化还原能力的指标^[34]。半细胞氧化还原电位(Eh)通常利用 GSH/GSSG 缓冲系统来表示^[35]。Eh 越高, 还原能力越弱。真核细胞线粒体被认为是还原性最强的场所, TrxR 的氧化还原电位与真核细胞线粒体相似, 其 Eh 范围是-280 到-330 mV; Trx 的氧化还原电位与细胞质相似, Eh 范围从-280 到-298 mV; Grx 的氧化还原电位大约是-225 mV; 细胞外胞浆是一个相对氧化的环境, Eh(GSSG)大约是-140 mV, DsbA 的 Eh 是-124 mV^[22]。内质网和细菌细胞周质也是氧化环境, Eh 范围从-150 到-200 mV, 是蛋白质二硫键的主要形成场所。因此, 三个蛋白还原二硫键的能力强弱顺序为 Trx>Grx>DsbA。TrxA 和 Grx 催化的氧化应激反应发生在细胞质中, Dsb 催化的氧化应激反应发生在细胞周质中。

三者具有功能交叉性, 尤其是 Trx 和 Grx 系统的抗氧化应激功能是互补的。缺失了 *trx1* 或 *trx2* 的 *E. coli* 因为有 Grx 系统的补充仍然可以抵御氧化损伤^[36-40]; 同理, 缺失了 Grx 系统的幽门螺旋杆菌、结核分枝杆菌和金黄色葡萄球菌等致病菌因为有 Trx 系统也可以抵御氧化应激^[14]。另有研究表明 GSH-Grx 可以代替 TrxR 还原 Trx, 在缺硒、添加 TrxR 抑制剂和 TrxR 敲除条件下, 降低的 TrxR 可以通过 GSH-Grx 系统得到补偿。表明 GSH-Grx 是为 Trx 提供电子的另一个系统, 也说明 Trx 系统可以还原氧化态 GSH^[41-42]。而 TrxR 又可以为 DsbD 提供电子, 进而参与 Dsb 氧化还原途径。综上, Trx、Grx 和 Dsb 三个系统在抗氧化应激反应中有交互作用。

4.2 Trx、Grx 以及 Dsb-like 蛋白的特性

虽然硫氧还蛋白家族成员均具有氧化还原活性, 但是 Trx、Grx 和 Dsb-like 蛋白又有区别。表

现为: (1) DsbA 为二硫化物氧化酶, 而 Trx 和 Grx 是还原酶。DsbA 的作用方式是催化目标底物形成二硫键, 而 Trx 和 Grx 则是催化底物中二硫键还原为巯基。(2) Trx 参与的细胞功能比较广泛, Trx 是许多关键酶如 RNR、过氧化物酶(Prx)和甲硫氨酸亚砷还原酶(MSRA)的电子供体^[43-44]。在二硫键交换反应中, Trx-折叠结构作为电子流动桥梁, 执行氧化酶功能, 当环境改变时, 又可以作为还原酶。例如大肠杆菌 Trx 在细胞质中是还原酶, 但是当它进入胞质外周时, Trx 成为氧化剂, 有助于蛋白质二硫键的形成^[45]。许多细菌均依赖 Trx 系统来维持巯基/二硫键的稳态和抗氧化应激, 参与能量代谢、生物合成、转录和细胞形态调控的 257 个蛋白均需要 Trx1。在某些细菌中, 尽管存在低分子量硫醇作为氧化还原缓冲液用以保护细胞免受氧化损, 但是 Trx 系统的基因缺失却是致命的^[7]。事实上, 即便是在一些生理条件下, 硫氧还蛋白对结核分枝杆菌、葡萄球菌的生长是必需的, 而 Trx1 的同源物对类球红细菌、枯草芽孢杆菌和葡萄球菌的生长也是必需的^[46-48]。Trx 缺失会导致鲍氏不动杆菌等革兰氏阴性菌的疏水性增强进而有可能影响细菌生物学功能^[49]。且 Trx 互作蛋白(TXNIP)可以通过降低活性氧和一氧化氮来促进胞内存活^[50]。而关于 Grxs 或杆菌素/放线杆菌低分子量硫醇依赖的还原途径中 Grxs 同源物的作用还知之甚少。(3) 调控 Trx 和 Grx 系统的金属离子不同, 含有汞、络和砷的化合物可以抑制 Trx 系统; 而铁离子参与 Grx 的调控^[51]。

进一步分析发现, Trx、Grx 和 DsbA 的活性位点 CX₁X₂C 基序也有很大区别。Trx 为-Cys-Gly-Pro-Cys-(-CGPC-); Grx 为-Cys-Pro-Tyr-Cys-(-CPTC-); DsbA 为-Cys-Pro-His-Cys-(-CPHC-)。此外 Grx 还

存在单巯基形式, 结构域为 CXXS^[52]。研究表明, 活性位点 CX₁X₂C 对氧化还原酶活力产生影响。当 *E. coli* Trx 活性位点-CGPC-中的 P 突变为 H 时, 成为蛋白质二硫键异构酶(PDI)的活性位点“-CGHC-”, 突变株的氧化还原电位增高, 接近于 PDI 的氧化还原电位, 活性增强, 催化二硫键形成的能力提高了大约 10 倍^[53]。提示活性位点不同氧化还原蛋白催化二硫键形成能力不同。另有研究表明 Cys^N 的解离常数(pKa)也是影响氧化还原酶活力的因素。pKa 值因 Trx 样蛋白的不同而不同, Trx 的 Cys^N 的 pKa 值大约为 7; Grx 的 Cys^N 的 pKa 值约为 3.8; DsbA 的 Cys^N 的 pKa 值为 4.4-6.7^[54]。较低的 pKa 值影响相关硫化物的亲核性和离解能力, 提示 X₁X₂ 序列不同对 pKa 值有显著影响^[55]。X₁X₂ 残基不同, 向 Cys^N-硫化物提供的氢键数量不同, 进而影响 Trx 家族蛋白的标准氧化还原电位。据此, 研究人员提出了 Trx 家族蛋白和 CX₁X₂C 基序发挥作用的基本原理模型, 即较稳定的半胱氨酸残基倾向于二硫键氧化反应, 不稳定的半胱氨酸残基倾向于二硫键还原反应^[55]。因此, 活性位点中的 X₁X₂ 残基通过浓度硫氧还蛋白的氧化还原电位和 Cys^N 的 pKa 值来影响其氧化还原酶活力。

5 展望

研究报道其他细菌中硫氧还蛋白具有抗应激功能^[7,56]。我们的试验结果首次证实了硫氧还蛋白参与李斯特菌的抗应激过程, 但具体的调控机制还有待进一步研究。在单增李斯特菌中含有 100 多种不同的转录调控子, 包括 4-5 个 σ 因子和多达 15 种二元调控系统^[57]。已知 SigB、PerR、YjbH 是重要的转录调控因子。sigB 是主要的压力调控

因子, 细菌受到酸、低温、盐以及氧化胁迫后会激发 *sigB* 的调控作用^[58], *opuCA/B/C/D*、*prfA* 等基因组上近 1/10 的基因均受 *sigB* 的调控^[59], 其中包括 *qoxA/B/C/D*、*SpxA* 在内的 14 个基因参与氧化应激反应^[60]。研究报道在次氯酸钠胁迫下, *sigB* 对谷胱甘肽还原酶基因 *lmo0906* 的转录无影响, 但对抗氧化胁迫蛋白 *lmo2344*(*grx*)和谷胱甘肽还原酶 *lmo1433* 有正向调控作用。表明在次氯酸钠胁迫条件下, *SigB* 参与对 *grx* 的调控^[61]。我们的研究发现, 在氧化剂胍应激下 *Grx* 缺失株中 *lmo1433* 的转录水平上升 4.52 倍, *sigB* 转录水平下降 3.55 倍, 氧化应激蛋白 *lmo0722*、*qoxA/B*、*opuCA/B/C/D* 的转录水平上升, 提示在不同应激条件下, 李斯特菌 *Grx* 发挥调控的方式具有多样性。*PerR* 是主要的过氧化物感应转录抑制因子, 可以抑制过氧化氢酶 *kat*、硫氧还蛋白还原酶 *trxB* 和预测的过氧化氢酶 *lmo1604*^[62]。在枯草芽孢杆菌中, 受 *PerR* 调控的植物过氧化氢酶 1(*katA*)、氧化还原全局调控因子(*spx*)和烷基过氧化氢还原酶(*ahpC*、*ahpF*)均参与对 *TrxA* 的调控^[56]。其中 *Spx* 能够在巯基特异性的氧化应激条件下调控 140 多个基因的转录, 包括激活 *trxA* 和 *trxB* 转录来修复胞内氧化应激损伤^[63]。而在非应激条件下 *Spx* 被蛋白酶体 *ClpXP* 降解而识别不到, *YjbH* 特异性识别 *SpxA* 的 C 端又进一步加速了这一降解过程^[30-31]。*YjbH* 具有二硫键氧化还原酶活性, 是促进全局转录调控因子 *Spx* 降解的接头蛋白, *YjbH* 与 *Spx* 相互作用进而介导细菌的抗氧化应激反应^[30,64]。由此可见, 在单增李斯特菌中硫氧还蛋白的调控机制是非常复杂的。因此, 研究硫氧还蛋白的调控因子以及 *TrxA*、*Grx* 和 *YjbH* 之间的调控网络对于揭示氧化还原蛋白的应激生物学机

制有重要的意义。

与文献报道相似的是, 我们的结果表明硫氧还蛋白也可以介导李斯特菌致病^[7]。但是不同硫氧还蛋白家族成员如 *TrxA*、*Grx* 和 *YjbH* 对李斯特菌毒力的贡献并不相同, 甚至完全相反, 这也提示李斯特菌硫氧还蛋白家族的致病机制较为复杂精巧, 它们之间可能存在相互协作或互为补充的关系。我们下一步将综合前期结果对这些蛋白参与细菌毒力的生物学功能和机理进行全面研究, 为揭示单增李斯特菌硫氧还蛋白家族的感染生物学机制奠定基础。

生物信息学分析显示, 除了 *TrxA*、*Grx* 和 *YjbH*, 单增李斯特菌还含有其他硫氧还蛋白。*Gopal* 等预测出单增李斯特菌中有 14 个含有典型保守硫氧还蛋白活性位点 CX_1X_2C 的同源蛋白^[65]。早期研究报道革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌仅编码 *DsbA*, 不编码其他任何 *Dsb* 蛋白。但是生物信息学分析显示李斯特菌中还含有 *DsbA* 家族蛋白的 *YjbH* 以及 *DsbA*-样的 *Lmo1059*, 且我们试验结果显示 *Lmo1059* 可以催化蛋白质间二硫键交换, 具有 *DsbG* 蛋白的异构酶特性。推测 *Dsb* 家族蛋白在不同细菌中的分布不同, 如 *DsbAs* 和 *DsbBs* 之间的相互作用在其他细菌比在 *E. coli* K-12 中更为复杂; 又如在尿路致病性大肠杆菌(UPEC)CFT073 或者沙门菌中, 除了经典的 *DsbA*-*DsbB* 系统, 还有异构酶系统 *DsbL*-*DsbI* 氧化还原对和毒力质粒编码的 *DsbA*-样蛋白-*SrgA*^[66]。进一步研究发现, *Lmo1059* 与李斯特致病无关(数据未发表)。这也提示我们, 含有 CX_1X_2C 基序的蛋白在单增李斯特菌中发挥的功能并不完全相同。那么单增李斯特菌中含有 CX_1X_2C 基序的其他蛋白是否具有氧化还原活

性? 各硫氧还蛋白之间是否具有功能交叉性? 也是我们未来要探索的内容。

参考文献

- [1] Mohamed FA, Shaker GH, Askoura MM. Oxidative stress influences *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility to antibiotics and reduces its pathogenesis in host. *Current Microbiology*, 2020, 77(3): 479–490.
- [2] Vaze N, Pyrgiotakis G, Mena L, Baumann R, Demokritou A, Ericsson M, Zhang YP, Bello D, Eleftheriadou M, Demokritou P. A nano-carrier platform for the targeted delivery of nature-inspired antimicrobials using Engineered Water Nanostructures for food safety applications. *Food Control*, 2019, 96: 365–374.
- [3] Kadokura H, Beckwith J. Mechanisms of oxidative protein folding in the bacterial cell envelope. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2010, 13(8): 1231–1246.
- [4] Davey L, Halperin SA, Lee SF. Thiol-Disulfide exchange in gram-positive firmicutes. *Trends in Microbiology*, 2016, 24(11): 902–915.
- [5] Kouwen TRHM, van Dijl JM. Interchangeable modules in bacterial thiol-disulfide exchange pathways. *Trends in Microbiology*, 2009, 17(1): 6–12.
- [6] Rea R, Hill C, Gahan CGM. *Listeria monocytogenes* PerR mutants display a small-colony phenotype, increased sensitivity to hydrogen peroxide, and significantly reduced murine virulence. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(12): 8314–8322.
- [7] Ezraty B, Gennaris A, Barras F, Collet JF. Oxidative stress, protein damage and repair in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(7): 385–396.
- [8] Laurent TC, Moore EC, Reichard P. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *The Journal of Biological Chemistry*, 1964, 239: 3436–3444.
- [9] Reniere ML, Whiteley AT, Hamilton KL, John SM, Lauer P, Brennan RG, Portnoy DA. Glutathione activates virulence gene expression of an intracellular pathogen. *Nature*, 2015, 517(7533): 170–173.
- [10] Scotti M, Monzó HJ, Lacharme-Lora L, Lewis DA, Vázquez-Boland JA. The PrfA virulence regulon. *Microbes and Infection*, 2007, 9(10): 1196–1207.
- [11] Cheng CY, Dong ZM, Han X, Wang H, Jiang L, Sun J, Yang YC, Ma TT, Shao CY, Wang XD, Chen ZW, Fang WH, Freitag NE, Huang HR, Song HH. Thioredoxin A is essential for motility and contributes to host infection of *Listeria monocytogenes* via redox interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2017, 7: 287.
- [12] Ku JWK, Gan YH. Modulation of bacterial virulence and fitness by host glutathione. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 47: 8–13.
- [13] Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2007, 9(7): 775–806.
- [14] Lu J, Holmgren A. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, 66: 75–87.
- [15] Holmgren A, Roberts G. Nuclear magnetic resonance studies of redox-induced conformational changes in thioredoxin from *Escherichia coli*. *FEBS Letters*, 1976, 71(2): 261–265.
- [16] Sun J, Hang Y, Han Y, Zhang X, Gan L, Cai C, Chen ZW, Yang Y, Song QJ, Shao CY, Yang YC, Zhou YS, Wang XD, Cheng CY, Song HH. Deletion of glutaredoxin promotes oxidative tolerance and intracellular infection in *Listeria monocytogenes*. *Virulence*, 2019, 10(1): 910–924.
- [17] Lee JW, Helmann JD. The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation. *Nature*, 2006, 440(7082): 363–367.
- [18] Ahn BE, Baker TA. Oxidization without substrate unfolding triggers proteolysis of the peroxide-sensor, PerR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2016, 113(1): E23–E31.
- [19] Rea RB, Gahan CGM, Hill C. Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infection and Immunity*, 2004, 72(2): 717–727.
- [20] Depuydt M, Messens J, Collet JF. How proteins form disulfide bonds. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 15(1): 49–66.
- [21] Shouldice SR, Heras B, Walden PM, Totsika M, Schembri MA, Martin JL. Structure and function of DsbA, a key bacterial oxidative folding catalyst. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2011, 14(9): 1729–1760.
- [22] Lu J, Holmgren A. The thioredoxin superfamily in oxidative protein folding. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 21(3): 457–470.

- [23] Bardwell JC, Lee JO, Jander G, Martin N, Belin D, Beckwith J. A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993, 90(3): 1038–1042.
- [24] Shevchik VE, Condemine G, Robert-Baudouy J. Characterization of DsbC, a periplasmic protein of *Erwinia chrysanthemi* and *Escherichia coli* with disulfide isomerase activity. *EMBO Journal*, 1994, 13(8): 2007–2012.
- [25] Martin JL, Bardwell JCA, Kuriyan J. Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature*, 1993, 365(6445): 464–468.
- [26] Dutton RJ, Boyd D, Berkmen M, Beckwith J. Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(33): 11933–11938.
- [27] Heras B, Kurz M, Jarrott R, Shouldice SR, Frei P, Robin G, Cemazar M, Thöny-Meyer L, Glockshuber R, Martin JL. *Staphylococcus aureus* DsbA does not have a destabilizing disulfide. a new paradigm for bacterial oxidative folding. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(7): 4261–4271.
- [28] Smith RP, Paxman JJ, Scanlon MJ, Heras B. Targeting bacterial Dsb proteins for the development of anti-virulence agents. *Molecules*, 2016, 21(7): 811.
- [29] Whiteley AT, Ruhland BR, Edrozo MB, Reniere ML. A redox-responsive transcription factor is critical for pathogenesis and aerobic growth of listeria monocytogenes. *Infection and Immunity*, 2017, 85(5): e00978–16.
- [30] Al-Eryani Y, Ib Rasmussen M, Kjellström S, Højrup P, Emanuelsson C, von Wachenfeldt C. Exploring structure and interactions of the bacterial adaptor protein YjbH by crosslinking mass spectrometry. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 2016, 84(9): 1234–1245.
- [31] Engman J, von Wachenfeldt C. Regulated protein aggregation: a mechanism to control the activity of the ClpXP adaptor protein YjbH. *Molecular Microbiology*, 2015, 95(1): 51–63.
- [32] Ukuwela AA, Bush AI, Wedd AG, Xiao ZG. Glutaredoxins employ parallel monothiol-dithiol mechanisms to catalyze thiol-disulfide exchanges with protein disulfides. *Chemical Science*, 2018, 9(5): 1173–1183.
- [33] Netto LES, de Oliveira MA, Tairum CA, da Silva Neto JF. Conferring specificity in redox pathways by enzymatic thiol/disulfide exchange reactions. *Free Radical Research*, 2016, 50(2): 206–245.
- [34] Padayachee L, Rohwer JM, Pillay CS. The thioredoxin redox potential and redox charge are surrogate measures for flux in the thioredoxin system. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2020, 680: 108231.
- [35] Ukuwela AA, Bush AI, Wedd AG, Xiao ZG. Reduction potentials of protein disulfides and catalysis of glutathionylation and deglutathionylation by glutaredoxin enzymes. *Biochemical Journal*, 2017, 474(22): 3799–3815.
- [36] Ritz D, Beckwith J. Roles of thiol-redox pathways in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 2001, 55(1): 21–48.
- [37] Vlamis-Gardikas A, Potamitou A, Zarivach R, Hochman A, Holmgren A. Characterization of *Escherichia coli* null mutants for glutaredoxin 2. *Journal of Biological Chemistry*, 2002, 277(13): 10861–10868.
- [38] Ortenberg R, Gon S, Porat A, Beckwith J. Interactions of glutaredoxins, ribonucleotide reductase, and components of the DNA replication system of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(19): 7439–7444.
- [39] Russel M, Model P, Holmgren A. Thioredoxin or glutaredoxin in *Escherichia coli* is essential for sulfate reduction but not for deoxyribonucleotide synthesis. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172(4): 1923–1929.
- [40] Toledano MB, Kumar C, Le Moan N, Spector D, Tacnet F. The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Letters*, 2007, 581(19): 3598–3607.
- [41] Du YT, Zhang HH, Lu J, Holmgren A. Glutathione and glutaredoxin act as a backup of human thioredoxin reductase 1 to reduce thioredoxin 1 preventing cell death by aurothioglucose. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(45): 38210–38219.
- [42] Tan SX, Greetham D, Raeth S, Grant CM, Dawes IW, Perrone GG. The thioredoxin-thioredoxin reductase system can function *in vivo* as an alternative system to reduce oxidized glutathione in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(9): 6118–6126.
- [43] Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(24): 13963–13966.

- [44] Rozhkova A, Stirnimann CU, Frei P, Grauschopf U, Brunisholz R, Grütter MG, Capitani G, Glockshuber R. Structural basis and kinetics of inter- and intramolecular disulfide exchange in the redox catalyst DsbD. *EMBO Journal*, 2004, 23(8): 1709–1719.
- [45] Debarbieux L, Beckwith J. The reductive enzyme thioredoxin 1 acts as an oxidant when it is exported to the *Escherichia coli* periplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(18): 10751–10756.
- [46] Lin K, O'Brien KM, Trujillo C, Wang RJ, Wallach JB, Schnappinger D, Ehrt S. *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin reductase is essential for thiol redox homeostasis but plays a minor role in antioxidant defense. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(6): e1005675.
- [47] Uziel O, Borovok I, Schreiber R, Cohen G, Aharonowitz Y. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(2): 326–334.
- [48] Marteyn B, Domain F, Legrain P, Chauvat F, Cassier-Chauvat C. The thioredoxin reductase-glutaredoxins-ferredoxin crossroad pathway for selenate tolerance in *Synechocystis* PCC6803. *Molecular Microbiology*, 2009, 71(2): 520–532.
- [49] May HC, Yu JJ, Shrihari S, Seshu J, Klose KE, Cap AP, Chambers JP, Guentzel MN, Arulanandam BP. Thioredoxin modulates cell surface hydrophobicity in *Acinetobacter baumannii*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2849.
- [50] Hu H, Tian MX, Li P, Guan X, Lian ZM, Yin Y, Shi WT, Ding C, Yu SQ. *Brucella* infection regulates thioredoxin-interacting protein expression to facilitate intracellular survival by reducing the production of nitric oxide and reactive oxygen species. *The Journal of Immunology*, 2020, 204(3): 632–643.
- [51] Ouyang YF, Peng Y, Li J, Holmgren A, Lu J. Modulation of thiol-dependent redox system by metal ions via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Metallomics*, 2018, 10(2): 218–228.
- [52] Berndt C, Lillig CH. Glutathione, glutaredoxins, and iron. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2017, 27(15): 1235–1251.
- [53] Lundström J, Krause G, Holmgren A. A Pro to His mutation in active site of thioredoxin increases its disulfide-isomerase activity 10-fold. New refolding systems for reduced or randomly oxidized ribonuclease. *The Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(13): 9047–9052.
- [54] Roos G, Foloppe N, Messens J. Understanding the pK_a of redox cysteines: the key role of hydrogen bonding. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2013, 18(1): 94–127.
- [55] Sousa SF, Neves RPP, Waheed SO, Fernandes PA, Ramos MJ. Structural and mechanistic aspects of S-S bonds in the thioredoxin-like family of proteins. *Biological Chemistry*, 2019, 400(5): 575–587.
- [56] Mostertz J, Hochgräfe F, Jürgen B, Schweder T, Hecker M. The role of thioredoxin TrxA in *Bacillus subtilis*: a proteomics and transcriptomics approach. *Proteomics*, 2008, 8(13): 2676–2690.
- [57] Zhang CM, Nietfeldt J, Zhang M, Benson AK. Functional consequences of genome evolution in *Listeria monocytogenes*: the lmo0423 and lmo0422 genes encode σ^C and LstR, a lineage II-specific heat shock system. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(21): 7243–7253.
- [58] Huang YN, Eells TC, Hansen LT. Role of sigB and osmolytes in desiccation survival of *Listeria monocytogenes* in simulated food soils on the surface of food grade stainless steel. *Food Microbiology*, 2015, 46: 443–451.
- [59] Chaturongakul S, Raengpradub S, Palmer ME, Bergholz TM, Orsi RH, Hu YW, Ollinger J, Wiedmann M, Boor KJ. Transcriptomic and phenotypic analyses identify coregulated, overlapping regulons among PrfA, CtsR, HrcA, and the alternative sigma factors σ^B , σ^C , σ^H , and σ^L in *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(1): 187–200.
- [60] Liu YC, Orsi RH, Gaballa A, Wiedmann M, Boor KJ, Guariglia-Oropeza V. Systematic review of the *Listeria monocytogenes* σ^B regulon supports a role in stress response, virulence and metabolism. *Future Microbiology*, 2019, 14(9): 801–828.
- [61] Zhou M, Tang YY, Wang X, Zhang WJ, Pan YJ, Zhao Y. Comparative analysis of the expression of antioxidation related genes in *Listeria monocytogenes* WaX12 and its sigB gene deletion mutant under sodium hypochlorite stress. *Food Science*, 2017, 38(10): 49–54. (in Chinese)
周密, 唐毓祎, 王旭, 张炜佳, 潘迎捷, 赵勇. NaClO 胁迫下单核细胞增生李斯特菌 WaX12 及其 sigB 基因缺失突变株抗氧化胁迫相关功能基因表达比较. *食品科学*, 2017, 38(10): 49–54.

- [62] Ruhland BR, Reniere ML. Sense and sensor ability: redox-responsive regulators in *Listeria monocytogenes*. *Current Opinion in Microbiology*, 2019, 47: 20–25.
- [63] Zuber P. Spx-RNA polymerase interaction and global transcriptional control during oxidative stress. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186(7): 1911–1918.
- [64] Reniere ML, Whiteley AT, Portnoy DA. An *in vivo* selection identifies *Listeria monocytogenes* genes required to sense the intracellular environment and activate virulence factor expression. *PLoS Pathogens*, 2016, 12(7): e1005741.
- [65] Gopal S, Srinivas V, Zameer F, Kreft J. Prediction of proteins putatively involved in the thiol: disulfide redox metabolism of a bacterium (*Listeria*): the CXXC motif as query sequence. *In Silico Biology*, 2009, 9(5/6): 407–414.
- [66] Grimshaw JPA, Stirnimann CU, Brozzo MS, Malojcic G, Grütter MG, Capitani G, Glockshuber R. DsbL and DsbI form a specific dithiol oxidase system for periplasmic arylsulfate sulfotransferase in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 380(4): 667–680.

Thioredoxin system in *Listeria monocytogenes*

Yue Han, Jiawen Ye, Changyong Cheng^{*}, Houhui Song^{*}

Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province, College of Animal Science and Technology & College of Veterinary Medicine, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang Province, China

Abstract: *Listeria monocytogenes* is an important foodborne pathogenic microorganism. Its oxidative stress tolerance is the key ability to survive and mediate pathogenesis. Increasing of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS) leads to imbalance of redox homeostasis, oxidative stress, and further damage of proteins as well as other large biological molecules. Cysteine and sulfur-containing amino acid of proteins are especially sensitive to ROS, and formation of disulfide bonds is an oxidation reaction, with two electrons removed from cysteine residues, which contributes to stabilizing protein structures and preventing protein damages. Antioxidant repair usually refers to the oxidation reaction of cysteine residues, consisting of disulfide bonds formation and breaking. Thioredoxin (Trx) family, including thioredoxin, glutaredoxin, and Dsb-like system, is a widely-distributed system responsible for oxidation repair in microorganisms. Here, we review the most recent research development of the Trx family from bacterial species and present our opinions of this family in *L. monocytogenes*, to better understand the regulatory network of *Listeria* during environmental adaption and host infection.

Keywords: *Listeria monocytogenes*, thioredoxin family, thioredoxin, glutaredoxin, Dsb-like protein

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31902280, 31872620, 31770040), by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (LZ19C180001, LQ19C180002, LQ20C010001), by the Zhengjiang A&F University Talent Initiative Project(118-2034020027), by the Student Research and Training Program of Zhejiang A&F University (118-2013200168) and by the Scientific Research Project of Key Laboratory of Applied Technology on Green-Eco-Healthy Animal Husbandry of Zhejiang Province

^{*}Corresponding authors. E-mail: Changyong Cheng, lamge@zafu.edu.cn; Houhui Song, songhh@zafu.edu.cn

Received: 4 April 2020; Revised: 15 June 2020; Published online: 7 August 2020