



基于蛋白质跨外膜自转运系统的细菌细胞表面蛋白展示技术研究进展

蔡锬, 储引娣, 黄丕英, 韦良婉, 范恩国*

中国医学科学院基础医学研究所, 北京协和医学院基础学院病原学系, 医学分子生物学国家重点实验室, 北京 100005

蔡锬, 储引娣, 黄丕英, 韦良婉, 范恩国. 基于蛋白质跨外膜自转运系统的细菌细胞表面蛋白展示技术研究进展. 微生物学报, 2022, 62(2): 458–475.

Cai Kun, Chu Yindi, Huang Piying, Wei Liangwan, Fan Enguo. Trend of bacterial cell surface display: the autodisplay technology. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(2): 458–475.

摘要: 革兰氏阴性菌 V 型分泌系统是细菌病原蛋白分泌的主要途径之一, 可分为 Va–Ve 5 个亚型, 其中 Va 型(即经典的单体自转运蛋白)是细菌毒力和黏附因子向细胞外分泌的重要工具, 其在内膜 Sec 易位子和外膜 BAM 蛋白复合体的协助下, 通过 2 个连续的跨膜步骤介导蛋白质穿过阴性菌的内外膜。据信 Va 型是目前已知蛋白质跨膜转运时最简单的分泌途径, 故该蛋白质分泌系统作为一种生物工程手段被认为是进行外源蛋白细菌细胞表面展示的理想系统。本文概括了目前已知的自转运蛋白的种类、结构域组成及其可能的分泌机理, 总结基于自转运蛋白构建细菌细胞表面展示系统的生物工程应用, 特别是其在疫苗研发领域的最新研究进展, 并探讨了其在病原体检测方面的潜在应用, 以期深入拓展该分泌系统在生物工程方面的应用。

关键词: 自转运蛋白; 细菌细胞表面蛋白展示; 蛋白质分泌; 活疫苗; 生物工程技术

基金项目: 国家自然科学基金(31770901); 中国医学科学院医学与健康科技创新工程(2017-I2M-1-012); 国家重点实验室专项经费(2060204)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31770901), by the CAMS Innovation Fund for Medical Sciences (2017-I2M-1-012) and by the State Key Laboratory Special Fund (2060204)

*Corresponding author. Tel: +86-10-69156984; E-mail: enguo.fan@ibms.pumc.edu.cn

Received: 20 May 2021; Revised: 5 October 2021; Published online: 12 October 2021

Trend of bacterial cell surface display: the autodisplay technology

CAI Kun, CHU Yindi, HUANG Piying, WEI Liangwan, FAN Enguo*

State Key Laboratory of Medical Molecular Biology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Basic Medical Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100005, China

Abstract: Type V secretion system, one of the key pathways employed by Gram-negative bacteria to secrete virulence factors, is classified into five subtypes (Va–Ve). Among them, type Va (also known as the classical monomeric autotransporters) is extensively used to export virulence and adhesion factors to the bacterial cell surface or into their surroundings, a process combining the passage across the inner and the outer membrane in two consecutive steps that are facilitated by the Sec translocon and the BAM (β -barrel assembly machinery) complex, respectively. It is believed that type Va is the simplest secretion system for the translocation of proteins across membranes, which is therefore considered as an ideal biotechnological tool to display recombinant proteins on bacterial cell surface. In this review, we first summarized the subtypes, structural domains, and possible secretion mechanisms of autotransporters to enhance the understanding of them as a biotechnological tool for various surface display purposes, particularly vaccine development. Then, we explored the potential application of autodisplay in pathogen detection to further expand its application as a biotechnological tool.

Keywords: autotransporter; bacterial cell surface display; protein secretion; live vaccine; biotechnological tool

革兰氏阴性菌具有内膜(inner membrane, IM)和外膜(outer membrane, OM)双层膜结构。内膜即为细胞质膜,外膜为阴性菌细胞壁肽聚糖层之外的膜结构,内含大量的磷脂、脂多糖和蛋白质。该双层膜结构使得细菌细胞质中合成的蛋白质在转运分泌到胞外的途径中会受到多重限制和阻碍。为此,革兰氏阴性菌进化出至少9种不同的分泌途径(type I—type IX),介导蛋白质穿过细胞膜到达胞外环境^[1]。其中V型分泌系统(type V secretion system)被认为是结构最简单且使用最广泛的一种革兰氏阴性菌毒力因子分泌方式。根据其蛋白结构域的组成及分泌方式,将V型分泌系统分为Va–Ve 5种亚型^[2],即Va型经典的自转运系统(classical monomeric autotransporters, ATs)、Vb型双组

分分泌系统(two partner secretion systems, TPS)、Vc型三聚体自主转运系统(trimeric autotransporter adhesin, TAA)、Vd型(patatin-like autotransporters)、Ve型(the inverse or intimin-like autotransporters)。最近发现的新亚型Vf型也可能属于该系统^[3]。

其中,Va型是细菌毒力和黏附因子输出的重要工具,最初的基因突变研究表明,该蛋白能介导其自身跨外膜的转运过程,故称之为自转运(autotransporter, AT,为叙述简便,故下文所有的自转运蛋白均指Va亚型,即经典型自转运蛋白),也正是基于此,AT被认为是最简单的分泌系统^[4]。然而,最新的研究表明,AT跨外膜的分泌需要BAM(β -barrel assembly machinery, BAM)蛋白复合体的作用^[5]。但BAM

具体的作用机理,尚待深入研究。由于自转运蛋白结构域组成及分泌途径的简单性,使得其在细菌细胞表面展示领域脱颖而出,并逐渐发展成为一种多用途的表面展示工具,涉及全细胞催化、蛋白质文库筛选、生物修复及疫苗开发等多个领域^[6]。本文的目的是通过系统总结目前已发现的自转运蛋白的种类、结构域组成及其可能的分泌机理,以期更好地理解自转运蛋白的分泌过程,为更好地利用自转运蛋白这一生物技术工具奠定基础。同时,本文概括了已报道的基于自转运蛋白所构建的细菌细胞表面展示系统的优势及相关生物工程应用,特别是其在疫苗研发领域的最新研究进展,并提出了自转运蛋白在病原体检测方面的潜在应用。

1 自转运蛋白的结构域组成

自转运蛋白均由 3 个主要的功能结构域组成: N 端信号肽(signal peptide, SP)、被展示在细菌表面或分泌到胞外环境并具有毒力等主要生理功能的乘客结构域(passenger domain)以及锚定在外膜的 C-末端 β -桶状结构域(β -barrel domain),通常在乘客结构域和 β -桶状结构域之间有一段未知功能的连接区(linker region)和一个自切酶位点^[7](图 1A)。大多数情况下,乘客结构域在转运完成后会被自切酶催化切割而释放到细胞外介质中,将 β -桶状结构域留在外膜,但目前对于 β -桶状结构域在外膜上发生的后续生物学过程是未知的。还有少数的自转运

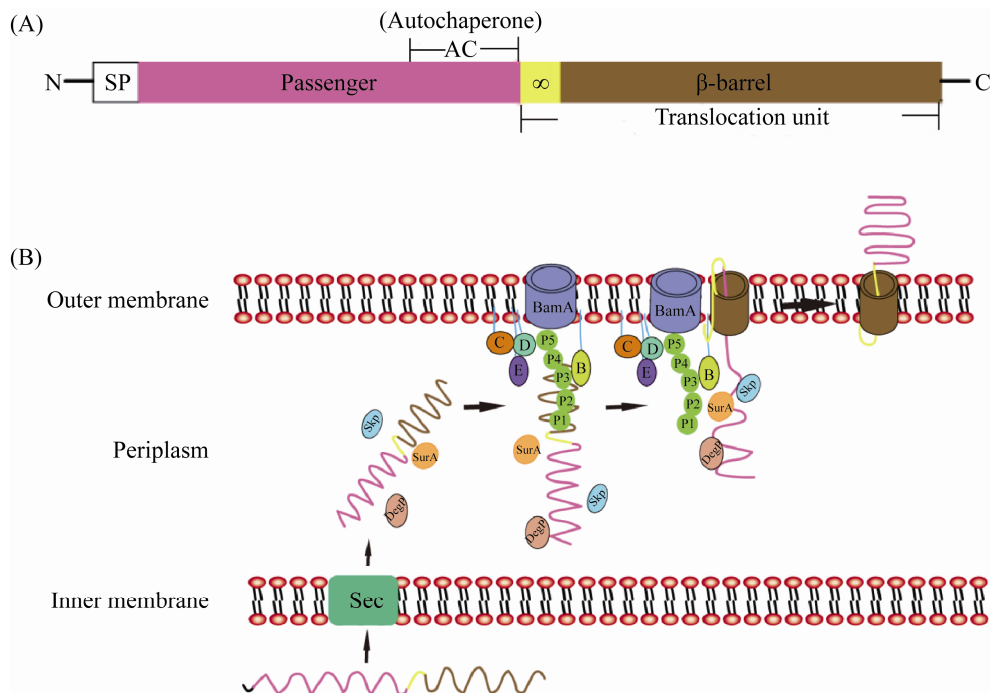


图 1 自转运蛋白的结构及分泌过程^[6]

Figure 1 The domain structure and the biogenesis of classical autotransporter^[6]. A: schematic domain structure of a classical autotransporter. N: amino terminal; C: carboxyl terminal; different domains are represented by rectangular bars of different colors. From N to C: signal peptide (SP, black), passenger domain (pink), linker (yellow), β -barrel domain (brown). B: hypothesized secretion process of a classical autotransporter.

蛋白不会自催化切割,只是在乘客结构域转位完成后将其固定展示在细胞表面。

1.1 信号肽

大多数自转运蛋白的信号肽含有 20–30 个氨基酸,可以分为带正电荷的 N 区、疏水性的 H 区和具有信号肽酶识别位点的 C 区 3 个区域。其功能是介导自转运蛋白跨过内膜,并随后在信号肽酶的作用下被切除^[8],从而把成熟的自转运蛋白释放入周质空间。大约有 10%的自转运蛋白具有较长的信号肽(约 50–60 个氨基酸),如大肠杆菌的丝氨酸蛋白酶(extracellular serine protease, EspP),其信号肽 N-端含有一个延伸区(N-terminal extension),可区分为 N1、H1、N2、H2 和 C 区 5 个区域。其中 N2、H2 和 C 区类似于经典的信号肽,且表现出显著的序列差异性^[9]。相比之下,构成 N-端延伸区的 N1 和 H1 结构域是非常保守的,目前人们对该保守区的功能是未知的。对 EspP 信号肽延伸区的研究表明,当该延伸区缺失时, EspP 在周质中会发生错误折叠并严重影响其跨外膜的转运。进一步的研究表明,在内膜转运过程中,信号肽延伸区可能通过采用特定构型或与内膜辅助因子相互作用,来延缓自转运蛋白向周质空间的转移,从而维持蛋白的易位活性状态。

1.2 乘客结构域

第一个被解析的乘客结构域是百日咳杆菌的 pertactin^[10]。其乘客结构域是一个简单的右手 β -螺旋结构,并具有一个 V 形的横切面和一个疏水核心。大约 97%自转运蛋白的乘客结构域存在右手 β -螺旋结构^[11],仅少数例外,如铜绿假单胞菌的酯酶 A (esterase A, EstA)的乘客结构域是 α -螺旋结构^[12]。大多数乘客结构域的 β -螺旋都是长的纤维结构,少数例外,如 Ag43 的乘客结构域,其 β -螺旋片段采用类似于字母 L 的弯曲形式^[13]。另外,在部分含有右手

β -螺旋结构的乘客结构域 C-末端还存在一个亚结构域称为自主分子伴侣(autochaperone, AC)^[14]。研究表明,在乘客结构域转运过程中,自主分子伴侣首先到达外膜并迅速折叠成 β -发卡(β -hairpin)结构,作为乘客结构域 β -螺旋折叠的模板,引导乘客结构域的跨膜转运和折叠。

不同自转运蛋白的乘客结构域大小、序列和功能差异很大(表 1),而其不同特性亦决定了自转运蛋白不同的生理功能,且通常与其所参与的发病机制有关。一般来说,含有酶(蛋白酶或脂肪酶)活性的自转运蛋白,在完成自身转运后,会自催化切割将其乘客结构域释放到胞外环境中。例如脑膜炎奈瑟菌的 IgA 蛋白酶,可破坏机体的免疫防御系统,促进一些感染性或炎性疾病的发展。而不能自动催化切割的自转运蛋白则起粘附素的作用^[2],如 AIDA-I 是粘附素,参与了细菌的黏附聚集。

1.3 β -桶状结构域

自转运蛋白的 C-末端结构域为 β -桶状结构域,参与了乘客结构域转运至细菌细胞表面的过程。目前已解析出 EspP、AIDA-1、EstA、NalP 等多种自转运蛋白 β -桶状结构域结构。与乘客结构域的高度多样性相反,不同自转运蛋白的 β -桶状结构域大小和结构相似。 β -桶状结构域是由至少 12 条连续的 β -折叠构成,位于周质中的 β -转角(β -turn)和暴露于胞外的 loop 环将邻近的 β -折叠连接在一起,形成一个狭窄的(约 1 nm×1.25 nm)亲水管腔。乘客结构域与 β -桶状结构域之间的连接区呈 α -螺旋结构,其位于 β -桶状结构域的管腔中,并通过周质中的 loop 环与 β -桶状结构域相连接。 α -螺旋位于 β -桶状结构域的 N-末端,存在于所有自转运蛋白的二级结构中,其长度有很大差异,这跟乘客结构域发生自切的位置有关。未发生自酶切的和细胞外自酶切的自转运蛋白,如 NalP、EstA 和 Hbp

表 1 部分已得到功能验证的自转运蛋白

Table 1 Autotransporters that have been validated with a defined function

Species	Types	Functions	Genes	References
<i>Escherichia coli</i>	Adhesin involved in diffuse adherence I (AIDA-I)	Adhesin, adhesion to surfaces/receptors	<i>aidA</i>	[15]
	Antigen 43 (Ag43)	Adhesin, auto-agglutination and biofilm formation	<i>agn43(flu)</i>	[16]
	Extracellular serine protease (EspP)	Serine protease	<i>espP</i>	[17]
	Hemoglobin protease (Hbp)	Protease	<i>Hbp</i>	[18]
	Cah	Biofilm formation	<i>Cah</i>	[19]
	Plasmid-encoded toxin (Pet)	Virulence factor	<i>Pet</i>	[20]
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Immunoglobulin A1 protease (IgAP)	Protease and immune evasion	<i>Iga</i>	[21]
	NGO2105	Protease, adhesion and invasion	<i>ngo2105</i>	[22]
<i>Neisseria meningitidis</i>	Adhesion and penetration protein (App)	Virulence factor	<i>App</i>	[23]
	NalP	Protease	<i>nalP</i>	[24]
<i>Bordetella pertussis</i>	Pertactin	Adhesin, adhesion to surfaces/receptors	<i>pertactin</i>	[25]
	Bordetella resisistance to killing (BrkA)	Adhesin	<i>brkA</i>	[26]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Esterase A (EstA)	Lipase and biofilm formation	<i>estA</i>	[12]
<i>Haemophilus influenzae</i>	Haemophilus adhesive protein (Hap)	Adhesin	<i>Hbp</i>	[27]
<i>Serratia marcescens</i>	ssp-h1, ssp-h2	Protease	<i>Ssp</i>	[28]
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Moraxella catarrhalis adhesin (McaP)	Adhesin, lipase and phospholipase B	<i>mcaP</i>	[29]
<i>Salmonella Typhimurium</i>	ApeE	Lipase/esterase	<i>apeE</i>	[30]
<i>Helicobacter pylori</i>	VacA	Colonization factor	<i>vacA</i>	[31]
<i>Shigella flexneri</i>	IcsA	Actin-based motility	<i>icsA</i>	[32]
<i>Yersinia spp.</i>	YapV	Actin-based motility	<i>yapV</i>	[33]

等, 其 α -螺旋足以穿过 β -桶状结构域的亲水管腔并延伸到细胞外。相比之下, 那些在 β -桶状结构域内发生自酶切的自转运蛋白有一个较短的 α -螺旋与 β -桶状结构域相连接^[34]。

研究表明, β -转角、 α -螺旋和 loop 环既可防止细菌胞内物质通过 β -桶状结构域形成的通道流失, 也可防止胞外的有害物质通过该通道进入胞内。另外, α -螺旋与 β -桶状结构域之间存在多种作用力(如盐桥、氢键和范德华力等),

这有助于 β -桶状结构域的稳定。电生理实验、抗生素敏感性研究和分子动力学模拟^[35-37]都说明了 α -螺旋在堵塞 β -桶状结构域的管腔和保持其管腔宽度方面的重要性。

2 自转运蛋白的分泌过程与机理

首先, 编码自转运蛋白的基因在细菌细胞质中完成转录翻译后形成一条单链多肽, 然后该单链多肽在 N-端的信号肽作用下靶向于内膜

上的 Sec 易位子(Sec translocon), 并在 Sec 易位子的作用下跨内膜转运至周质空间, 随后其信号肽被信号肽酶切除。自转运蛋白穿过内膜后在周质空间的多种分子伴侣(如 SurA、Skp、VirK 和 DegP 等)相互作用下到达外膜。在此过程中, 分子伴侣可以防止其聚集、错误折叠以及免受蛋白酶的降解。最后, 在完成跨外膜转运和乘客结构域的加工与修饰步骤后, 即成为成熟蛋白^[6]。具体分泌过程如图 1B 所示。

目前对于自转运蛋白多肽跨内膜转运的过程已经有相当充分的认识, 但对于其跨外膜转运及后续过程一直是研究的热点与难点。接下来本文总结目前关于跨外膜转运和乘客结构域的加工修饰的详细机制。

2.1 跨外膜转运

传统观点认为, 自转运蛋白在进入周质空间后, 其 β -桶状结构域会折叠成 β -桶, 插入到细胞外膜中形成通道, 乘客结构域即通过该通道跨外膜转运到细菌细胞外^[38]。最新的研究表明, Ag43、IcsA、AIDA-I、Pet、Hbp 和 IgAP 等自转运蛋白的跨外膜转运均依赖于 BAM 蛋白复合体的功能^[5]。BAM 蛋白复合体是革兰氏阴性菌外膜上专门负责外膜桶状蛋白正确组装和折叠的一个多组分蛋白质复合体, 在大肠杆菌中是由一个完整的 β -桶状蛋白 BamA 和 4 个脂蛋白 BamB、BamC、BamD 和 BamE 组成^[39]。BamA 和 BamD 是 BAM 蛋白复合体的核心组分, 在自转运蛋白的生物发生过程中发挥着至关重要的作用, 而 BamB、BamC 和 BamE 被认为是 BAM 复合体的辅助成分, 关于其具体作用, 目前还没有定论^[40]。

当前, BAM 蛋白复合体参与自转运蛋白跨膜转运的具体过程及其作用机理, 仍然是未知的。目前提出几种机制模型来阐述这一过程(图 2): (1) BamA-辅助模型(BamA-assisted model):

BAM 复合体将新生的 ATs (折叠或未折叠状态) 定位在外膜上, 然后通过 BamA 造成的局部外膜不稳定, ATs 直接插入外膜; (2) BamA-出芽模型(BamA-budding model): BAM 复合体将新生 ATs 定位到外膜, 然后 BamA β -桶的 β 1 链暴露并作为 AT β -桶合成的模板, 新生的 AT β -桶以“萌芽”或“气泡”的形式脱离 BamA; (3) BamA-摆动模型(BamA-triggered model): BamA β -桶的 β 1 链暴露并作为 AT β -桶合成的模板, 然而新生的 AT 是沿着外膜界面折叠, 须经过 BamA 介导的摆动或剪刀状运动将 AT β -桶拉入外膜。目前并没有任何一种模型能作为“唯一”机制被广泛接受, 但可以肯定的是, 自转运蛋白的 β -桶状结构域的折叠和插入需要 BAM 蛋白复合体的协助^[41]。而对于乘客结构域的跨外膜转运过程, 其需不需要 BAM 复合体的协助, 目前说法不一。现较为认可的乘客结构域跨膜转运的机制假说主要有 2 种^[42]: 发卡模型(hairpin model)和 BamA 模型(BamA model)。在发卡模型中, 认为在自转运蛋白的 β -桶状结构域折叠并插入到外膜后, 乘客结构域才开始其跨膜转运, 此过程不需要 BAM 蛋白复合体的参与。而在 BamA 模型中, BamA 除了参与 β -桶状蛋白的折叠和插入外, 还参与了乘客结构域的跨外膜转运。目前 2 种模型都有大量的实验数据支持, 但均无法完全解释乘客结构域的跨外膜转运过程。

2.2 乘客结构域的加工与修饰

乘客结构域在跨外膜转运完成后会通过共价连接展示在细菌细胞表面或者被切除^[12]。这些被切除的乘客结构域, 有些经过加工修饰后被释放到胞外环境, 以实现其下游效应功能, 例如细胞毒性(如 VacA)等; 而另一些经过加工修饰后则是非共价地附着在细胞表面, 其仍然与 β -桶状结构域相连。

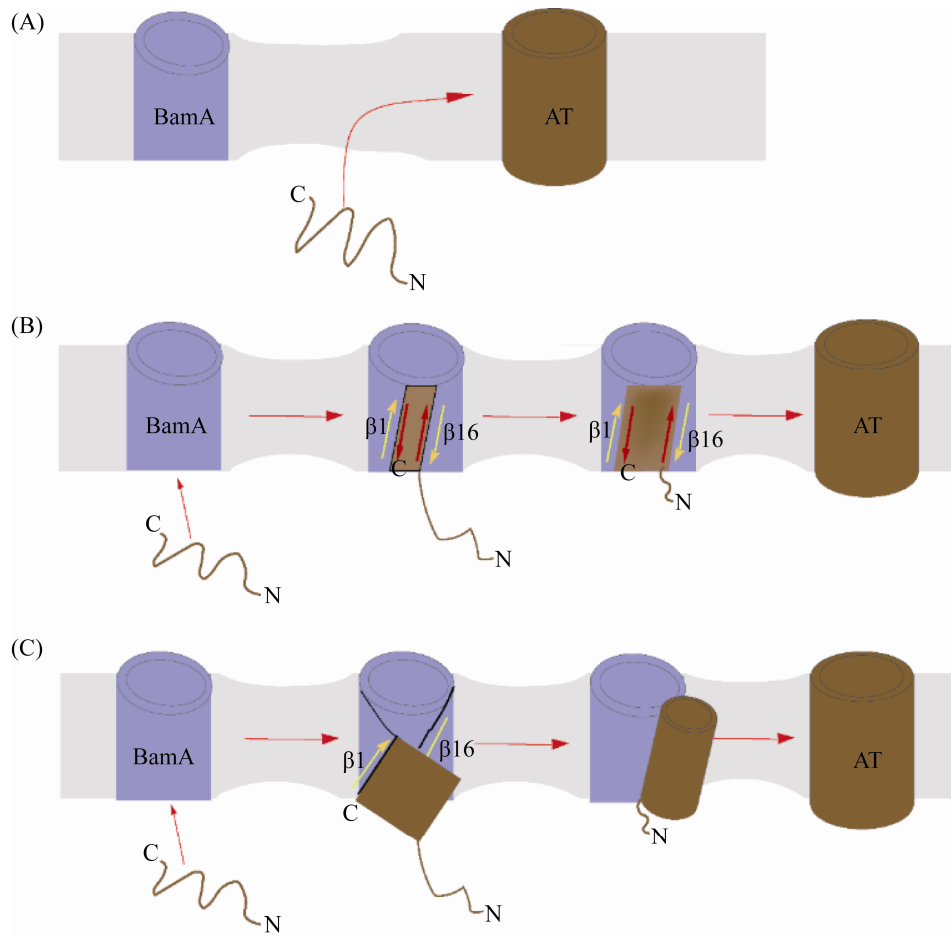


图 2 BAM 蛋白复合体参与自转运蛋白跨膜转运假说

Figure 2 Possible mechanistic models for autotransporter insertion by the BAM complex. A: BamA-assisted mechanism: ATs directly insert into the membrane that is facilitated by a local destabilization of the membrane by BamA. B: BamA-budding mechanism: the exposed edge of BamA's barrel ($\beta 1$) serves as a template for the formation of ATs' barrel via β -augmentation and then the nascent AT is hypothesized to bud or bleb away from the BamA barrel. C: BamA-triggered mechanism: the formation of AT's barrel resembles the process in (B), but the nascent ATs go with a BamA-mediated swinging motion to pull them into the OM. For clarity, the POTRA domains and the BAM lipoproteins have been omitted.

大多数自转运蛋白乘客结构域的切除过程与周质空间或胞外环境中的一些蛋白酶有关。例如福氏杆菌 IcsP (一种与大肠杆菌 OmpT 同源的外膜蛋白酶)负责处理 IcsA 乘客结构域^[43]; 在 NaIP 的乘客结构域中发现的丝氨酸蛋白酶结构域负责几种脑膜炎奈瑟菌自转运蛋白的蛋白水解处理, 包括 IgAP、App 和肽酶 AusI (也

称为 MspA)^[44-45]。仅有少数切除过程是自发进行的, 如自转运蛋白 EspP 的乘客结构域的切除是乘客结构域 Asp1 120 和 Asn1 023 残基相互作用的结果^[46]。此外, 有些自转运蛋白还会经历糖基化修饰^[47]或脂肪酸修饰^[24]。但是对于自转运蛋白加工修饰的过程以及何时何地发生, 目前还有待深入研究。

3 基于自转运蛋白的细菌细胞表面蛋白展示系统的优势与应用

细菌细胞表面蛋白展示技术是通过 DNA 重组技术, 将外源蛋白或多肽表达并定位于特定细菌细胞表面, 以达到一定研究和应用目的。基于自转运蛋白构建的细菌细胞表面蛋白展示系统就是利用自转运蛋白的转运单元(或全长的自转运蛋白)作为运载蛋白, 在信号肽和转运单元(translocation unit, TU)之间插入外源蛋白, 从而将外源蛋白转运并展示到特定细菌细胞表面。目前已经有超过 15 种自转运蛋白被应用于细菌细胞表面蛋白展示, 涉及全细胞催化、疫苗研究、生物修复、蛋白质分泌等多个领域。下文概括了细菌细胞表面蛋白展示系统的优势和应用研究, 重点介绍了其在疫苗研发领域的研究进展, 并创新性地提出了自转运蛋白在病原体检测方面的潜在应用。

3.1 基于自转运蛋白构建的细菌细胞表面蛋白展示系统的优势

自转运蛋白之所以被认为是展示外源蛋白的理想系统, 是因为与其他类型的蛋白表达系统相比, 其具有多种优势。首先, 从表面展示的角度来说, 与胞内表达蛋白相比, 其表达的蛋白是展示在细菌细胞表面, 比游离的蛋白质更稳定; 其次, 表面展示的蛋白, 可以自由接触与其相互作用的蛋白或分子, 而无需底物跨越膜屏障; 另外, 表面展示有利于蛋白质的折叠、溶解和活性与稳定性的维持。特别是易于聚集和降解的蛋白质可以实现从拥挤的细胞质到宽敞的培养基的快速转移, 避免包涵体的形成。

从自转运蛋白自身的特点来说, 与其他蛋白表面展示系统相比: (1) 首先且最重要的是易于纯化所分泌的蛋白质。由于某些自转运蛋白

的乘客结构域转运到细菌细胞表面后, 可发生自切, 而将其从细菌细胞表面释放或以非共价的作用附着在细胞表面, 因而只需简单的操作(如加热)来破坏这种非共价作用, 即可获得所表达的外源蛋白, 而无需复杂的蛋白纯化步骤。另外, 如果期望所展示的外源蛋白固定在细菌细胞表面, 则可以通过简单的突变位于乘客结构域和 β -桶状结构域之间的蛋白水解裂解位点, 即可将外源蛋白的细菌细胞外释放转换为细菌细胞表面展示^[48]。或者, 也可以引入外膜蛋白酶 OmpT 的识别位点, 通过在野生型或 OmpT 敲除菌株中的表达来控制外源蛋白释放与否^[49]。(2) 利用自转运蛋白展示外源蛋白具有高效性, 外源蛋白表达量大。研究表明, 利用自转运蛋白 AIDA-I 在单个大肠杆菌表面可展示超过 10^5 个分子的乘客结构域^[50]。(3) 可以展示相对分子量较大的蛋白质, 如利用自转运蛋白 EstA 可将大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段(68 kDa)展示到大肠杆菌的表面^[51]。(4) 具有良好的相容性。已发现的各类自转运蛋白具有相似的结构和跨膜转运过程, 因此, 基于自转运蛋白构建的表面展示系统, 可在多种宿主菌中实现功能性表达。例如 Ag43 可以在大肠杆菌、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和沙门氏菌(*Salmonella enterica* serovar Typhimurium)等多种革兰氏阴性菌宿主中进行表达^[52]; 另外也已有多种自转运蛋白系统在大肠杆菌表面实现外源蛋白的功能性表面展示^[53]。(5) 由于自转运蛋白将乘客结构域定位于细胞膜外, 利用其展示外源蛋白可以大幅度降低外源蛋白对表达菌株的毒性。

3.2 基于自转运蛋白的细菌细胞表面蛋白展示系统的应用

3.2.1 全细胞催化

酶和微生物在化学合成中的应用被称为生

物催化。它为化学合成提供了一种环境友好的替代方法。利用自转运蛋白将酶蛋白展示细菌细胞表面,即可获得全细胞催化剂。全细胞催化剂的优势主要体现在:(1)酶蛋白展示在细胞表面,能够直接与对应的底物发生反应,避免交叉反应并可以解决其他全细胞催化剂中底物和产物跨越膜屏障的问题。(2)较自由酶相比,更容易从反应体系中快速回收和再利用,可避免酶的使用受到其纯化昂贵和难以在连续反应中使用的限制^[54]。

目前用于全细胞生物催化研究的自转运蛋白主要是 AIDA-I,并利用大肠杆菌进行表面展示。在这个系统中,AIDA-I 的 TU 最初与 CTB 信号肽结合使用^[55]。后来还应用了不同的信号肽,如 PelB、OmpA 和天然 AIDA-I 信号肽。采用缺乏外膜蛋白酶(如 OmpT)的大肠杆菌进行表达,以避免将乘客结构域释放到培养基中。利用该系统,在大肠杆菌的细胞表面展示了几种真核和原核来源的酶^[54]。Schumacher 等^[56]利用 AIDA-I,在大肠杆菌表面自动展示了 *Bacillus megaterium* 的细胞色素 P450 单加氧酶(CYP106A2)。通过对底物的催化结果显示,利用自转运蛋白可以实现 P450 单加氧酶的功能性表面展示,并且活性酶分子数可达 20 000/细胞。Balderas 等^[57]利用该 AIDA-1 表面展示系统,在大肠杆菌表面展示了 β -1,4-木聚糖酶(XynA)。在 55 °C 和 pH 6.5 的条件下,米氏方程催化常数 V_{\max} 和 K_m 分别为 149 U/gDCW 和 6.01 mg/mL。在添加 5 mol/L CaCl₂ 时,其木聚糖分解活性高达 2.4 倍。说明,该表面展示系统可功能性表达木聚糖酶以进行全细胞生物催化。

3.2.2 生物修复

目前,自转运蛋白在生物修复领域主要应用在重金属去除、除草剂降解和污染物降解等方面。将自转运蛋白 IgAP 应用于金属硫杆菌

CH34^[58]和恶臭假单胞菌中的金属硫蛋白^[59](metallothionein)的表面展示,在 Cd²⁺污染的土壤中接种工程化的金属硫杆菌 CH34 可有效地降低烟草植株生长的毒性效应。使用该展示系统,Detzel 等^[60]将从肺炎克雷伯菌中提取的腈水解酶(nitrilase)展示到大肠杆菌表面以分解除草剂,实现对除草剂污染土壤的生物修复。另外,Fathi-Roudsari 等^[61]利用 AIDA-1 将漆酶(laccase)展示在大肠杆菌表面后,可显著降低污水中酚类化合物的浓度。

3.2.3 肽或蛋白质文库的筛选

肽或蛋白质文库的筛选需要先进行基因型-表型链接,然后再筛选所需的特性。肽或蛋白质的表面展示提供了基因型和表型之间的这种必不可少的联系。

目前,基于自转运蛋白的展示方法已用于酶文库的筛选、抗体文库的构建以及筛选抗体突变体等方面。例如,Becker 等^[62]利用自转运蛋白 EstA 成功在大肠杆菌细胞表面展示了枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的脂肪酶 A 和粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)的脂肪酶,将表面展示的酶作为酶文库用于高通量筛选。另一项研究中使用该展示技术在大肠杆菌表面展示了人磷脂酰肌醇 4-磷酸-5-激酶 I 型(hPIP5K1 α),并将其作为底物测试了 3 种吡喃苯醌类化合物的抑制作用。将该细菌表面展示酶作为一种抑制剂鉴定底物,同时还解决了 hPIP5K1 α 纯化困难的问题^[63]。Andersson 等^[64]利用自转运蛋白 AIDA-1 在大肠杆菌表面展示了亲和抗体文库,并用流式细胞分选技术(fluorescence activating cell sorter, FACS)针对 5 个不同的靶标(HER2、HER3、IL3RA、CD69、DGCR2)对文库进行了质量评估。发现该亲和抗体文库可与除 IL3RA 外的其他所有靶标结合,且与 HER2 的亲合力在 nmol 的范围内。

3.2.4 蛋白质表达纯化

Sevastyanovich 等利用自转运蛋白 Pet 构建了一个表达系统, 用于生产细胞外重组蛋白^[65]。利用该系统, 他们表达了许多结构不同的蛋白质, 发现该系统获得的产量与其他细菌分泌系统获得的产量相似。

IgE 的 Fc ϵ 3 结构域是治疗哮喘和其他过敏性疾病的有效免疫治疗靶点。Huang 等^[66]利用 Ag43 将 Fc ϵ 3 在大肠杆菌细胞表面表达, 细菌所在环境加热至 60 °C 即可将 Ag43/Fc ϵ 3 与细菌表面分离, 并可保持 Fc ϵ 3 的活性。将获得的 Ag43/Fc ϵ 3 作为蛋白疫苗, 在小鼠哮喘模型中可以产生抗小鼠 IgE 的中和抗体, 诱导显著的抗哮喘作用, 并调节 IgE 和辅助性 T 细胞因子。Ko 等^[67]在大肠杆菌 YfaL 乘客结构域的 C 末端和 TU 之间引入了烟草蚀刻病毒蛋白酶(tobacco etch virus protease, TEVp)切割位点, 使降解酵母菌的琼脂酶(agarase)可控性地从大肠杆菌细胞表面释放。在此基础上, Ahan 等^[68]利用 Ag43 自转运蛋白, 在外源蛋白和 Ag43 乘客结构域之间插入了 TEVp 位点, 通过改变 TEVp 的量即可控制外源蛋白的释放, 从而实现外源蛋白释放的可控性。这些结果共同显示了自转运蛋白在表达纯化蛋白方面的应用潜力。

综上, 利用自转运蛋白所构建的细菌表面展示系统来进行抗原或其他蛋白表达, 可以避免复杂而昂贵的蛋白纯化步骤, 降低其生产成本, 为其在工业领域的广泛应用奠定基础。由于利用自转运蛋白可将外源蛋白分泌到细胞外培养基在不久前才引起注意, 所以涉及这方面的研究不多, 但基于目前的研究成果, 利用自转运蛋白来进行外源蛋白的表达和纯化具有良好的应用前景和潜力。

3.2.5 疫苗研发

(1) 活疫苗研究。活疫苗是指经过各种处理

后, 发生变异, 毒性减弱, 但仍保留其免疫原性的病原体。将其接种到机体内, 不会引起疾病的发生, 但可在机体内生长繁殖, 引发机体的免疫反应, 起到长期或终生保护的作用。通过自转运蛋白展示抗原是开发活疫苗的一种手段。使用这种方法, 抗原或抗原片段可以展示在减毒疫苗株(通常是沙门氏菌或大肠杆菌衍生物)的表面。由于宿主菌的固有佐剂活性以及抗原直接暴露于免疫系统, 这种呈现抗原的方式可以引起强烈的免疫反应。Jong 等^[48]利用 Hbp, 证明了已知的结核分枝杆菌抗原和疫苗靶点 ESAT6、Ag85B 和 Rv2660c 在大肠杆菌和减毒鼠伤寒沙门氏菌疫苗株中的高效分泌和高密度展示。同时, 还实现了沙眼衣原体主要外膜蛋白(MOMP)和甲型流感病毒的多个抗原片段的有效表面展示。Xu 等^[69]利用志贺氏菌自转运蛋白 IcsA 实现了人乳头瘤病毒 HPV16L1 在宋内志贺氏菌和大肠杆菌的表面展示, 证明了利用自转运蛋白进行表面展示大的异源病毒蛋白的可能性。然而, 尽管有良好的实验室数据, 但出于安全考虑, 这种活疫苗还没有在人类身上进行试验。

(2) 细菌外膜囊泡(OMV)疫苗。OMV 是革兰氏阴性细菌在生长过程中由外膜自然释放的球形纳米结构。由于 OMV 无活性、结构较小(直径约 50 nm), 且包含其来源菌的固有佐剂活性, 因此可以作为疫苗载体安全使用^[70]。目前, OMV 已经出现在人类使用的脑膜炎球菌疫苗配方中^[71]。前述已有人利用 Hbp 在减毒沙门氏菌菌株表面展示了结核分枝杆菌抗原和肺炎链球菌等多种抗原, 通过突变 Tol-Pal 系统使表面展示肺炎链球菌抗原的减毒沙门氏菌菌株过度囊泡化, 促进重组 OMV 的产生。将重组的 OMV 对小鼠鼻免疫后, 可诱导局部 IL-17 产生, 从而产生保护效应^[72]。可见 OMV 结合自转运蛋

白似乎是一个值得深入探讨的多功能疫苗平台。然而,该平台的一个缺点是 OMV 中存在的 LPS 的固有佐剂活性太强,因此可能具有一定毒性^[73]。通过对脂质 A 进行去污剂提取或基因修饰,在免疫原性和反应原性之间找到适当的平衡,或许可以避免 OMV 疫苗递送平台的这个缺点。另外,通过自转运系统分泌重组蛋白的缺点是外膜 β -桶状蛋白的容量有限。而且这种限制似乎是由融合蛋白结构的复杂性而不是长度决定的,具有快速折叠成复杂结构倾向的融合蛋白可能更容易被阻断分泌^[74]。

最近,有人使用蛋白质连接策略(protein ligation strategy)将纯化的蛋白质与表面展示的自转运蛋白相连接来避免转运单元容量有限的问题^[75-76]。化脓性链球菌(*Streptococcus*)的纤维连接蛋白结合蛋白(fibronectin-binding protein FbaB)可以催化相邻的赖氨酸和天冬氨酸残基之间形成分子内肽键。可以将该结构域分裂成 2 个片段,13 个氨基酸的肽称为 SpyTag,138 个氨基酸的片段称为 SpyCatcher,因此产生了一个 Spy Catcher/Tag 对,共同催化融合蛋白的分子间偶联。研究发现,Catcher 或 Tag 并入 Hbp 并不会损害其表面展示,并能在细胞表面将纯化的重组蛋白(包括结构复杂的抗原和纳米体)与 Hbp 高效(>80%)偶联。可见,自转运蛋白介导的抗原表面展示与 OMV 的结合有望通过提供一个模式化和强大的抗原递送平台来帮助疫苗的开发(表 2)。

3.2.6 病原体检测

酶联免疫吸附试验(ELISA)是用来检测人血清中特异性抗原抗体反应的常用技术。Petermann 等^[91]利用 AIDA-1 在大肠杆菌表面展示了 RO/SS-A 抗原。在 ELISA 反应中,用表面展示 RO/SS-A 抗原的细菌细胞代替纯化的抗原。通过对 39 例患者和 30 例对照血清进行

Ro/SS-A 抗体检测。结果显示,新的 ELISA 方法(即表面展示 ELISA[SD-ELISA])灵敏度为 86.67%,特异性为 83.33%,临界值为 0.28。结果表明,基于自转运蛋白的表面展示使 ELISA 筛选抗特异性抗体反应简单、快速且廉价。因此,理论上,我们也可以用自转运蛋白构建的表面展示系统来展示特异性病原体抗原,在 ELISA 反应中,用表面展示的抗原代替纯化的抗原,可以避免耗时且昂贵的抗原纯化步骤,使病原体检测更加简单、快速、廉价。但目前该方法还存在一些缺点,比如一些需要糖基化或任何其他类型修饰以获得其抗原构象的蛋白质,其在大肠杆菌中表达会受限,则不适用于 SD-ELISA。另外,几乎所有的人血清都可能含有针对不同类型大肠杆菌的抗体,因此,在将血清用于新的 ELISA 方法之前,需要将人血清与没有展示抗原的大肠杆菌预孵育以去除这些“非特异性”抗体。因此还需进一步的研究来优化表面展示 ELISA,使之更加简单快速从而可以产品化。

除了 ELISA 这种常用的检测技术外,表面等离子体共振(SPR)生物传感器目前也已成功应用于蛋白质、药物、DNA、微生物等多种分析物的检测。SPR 免疫传感器基于特异性抗原-抗体反应,具有灵敏、特异、快速、无标记等优点,已成为定量检测的一种很有前景的工具。但是随机固定在二维介质上的抗体,其暴露的抗原结合位点不到 20%,使得免疫传感器的敏感性严重降低。为了使抗体的识别位点不会受到空间位阻的影响,需要控制传感器表面抗体的方向以及给予其自由活动的空间,才能提高 SPR 免疫传感器检测病原体的灵敏度^[92]。研究发现,蛋白 A (protein A)的 B-结构域可以与人、兔以及鼠抗体的 Fc 段特异性结合。因此利用 B-结构域的工程类似物-Z 结构域,其与抗体 Fc

表 2 基于自转运蛋白构建的表面展示系统在疫苗研究中的应用

Table 2 Application of autotransporter-based surface display system in vaccine research

Autotransporters		Foreign proteins	Hosts	References
Types	Species			
AIDA-I	<i>E. coli</i>	Hsp6074–86	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	[77]
		Urease A	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	[78]
		B-subunit of heat labile enterotoxin (LTB)	<i>E. coli</i>	[79]
		T-cell epitopes of Hsp60	<i>E. coli</i>	
		Flagellar protein (H:gm)	<i>E. coli</i>	[80]
		SE serotype-specific fimbrial protein (SefA)	<i>E. coli</i>	
		Murine melanoma antigen Melan-A	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	[81]
MisL	<i>S. enterica</i>	BH3 domain of the pro-apoptotic Baxprotein(BaxBH3)	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	[82]
		(NANP)4epitopes	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , <i>E. coli</i>	[83]
		NANP8/53epitopes (NANP)8epitope	<i>E. coli</i>	[84]
		Shiga toxin B subunit (StxB)	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , <i>E. coli</i>	[85]
		ESAT6	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> , <i>E. coli</i>	[86]
Hbp	<i>E. coli</i>	Ag85B	<i>E. coli</i>	
		Rv2660c		
Ag43	<i>E. coli</i>	IgE Fcε3 domain	<i>E. coli</i>	[66]
		Angiogenesis-related endoglin (END(e))	<i>E. coli</i>	[87]
IcsA	<i>Shigella flexneri</i>	CTP3, Chlam12, FimH	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	[88]
		HPV16L1	<i>S. sonnei</i> , <i>E. coli</i>	[69]
BrkA	<i>Bordetella pertussis</i>	VP1 capsidprotein fragment	<i>B. pertussis</i>	[89]
		Single chain antibody fragment (scFv)	<i>E. coli</i>	[26]
EspP	<i>E. coli</i>	B subunit of shiga-like toxin 1(Stx1B)	<i>E. coli</i>	[90]

区特异性结合后, 可使得抗体的 2 个抗原结合位点暴露, 从而使抗体更容易与抗原结合^[93]。Jose 等^[94]利用 AIDA-I 在大肠杆菌表面展示 Z-结构域之后, 将表面展示的细菌细胞制备成带有 Z-结构域的脂质体, 形成了一个方向受控的免疫亲和层, 用于捕获更多抗原, 提高了 SRP 检测的灵敏度。另外, 通过使用酸性缓冲液可

以破坏抗原-抗体的结合反应, 使免疫亲和层可以重复使用。Jeon 等^[95]继续优化了再生缓冲液, 减少其对包含自动展示的 Z 结构域、磷脂等的 OM 层的损害。实验结果显示 SPR 生物传感器再生免疫亲和层可重复使用 5 次, 信号差异小于 2%。因此, 新开发的具有抗体定向控制的再生免疫亲和层可以提高 SRP 生物传感灵敏度,

提高病原体抗原检测及定量检测的灵敏度,降低医疗诊断成本。

除了用于 SPR 外,利用表面展示来固定抗体的方法还可用于 ELISA 等免疫检测技术。Park 等^[96]将来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)的蛋白 A 的抗体结合域(Z-结构域)展示在大肠杆菌的细胞表面。从而改善了抗体的方向,提高了 ELISA 检测 C 反应蛋白(炎症疾病的生物标志物)的敏感性。

4 总结与展望

基于自转运蛋白构建细菌细胞表面展示系统的前提是自转运蛋白的正确分泌与折叠。自 1987 年 Pohlner 等^[97]首次在淋球菌中发现了 IgAP 自转运分泌系统以来,在随后三十多年里研究人员围绕自转运蛋白的结构、分泌和转运机制等进行了系列深入研究,虽然已有几种自转运蛋白的三级结构被解析,也初步阐明了自转运蛋白的转运过程及机理,但仍存在许多未解之谜,特别是由于缺乏合适的研究方法,极大地限制了 β -桶状结构域是如何整合到细菌的外膜中以及 BAM 蛋白复合物在这一过程中是如何发挥具体作用等的机理研究。我们课题组前期使用外膜衍生的膜囊泡及脂质体等构建了通用型外膜蛋白研究系统,该系统是专门用于研究外膜蛋白的首个通用型离体研究方法。结果表明,该系统可实现 BAM 蛋白复合体介导的自转运蛋白 Ag43 的 β -桶状结构域的组装及膜整合,从而在体外重现其自转运过程^[98]。而且该研究系统具有较大的可拓展性,利用该体外重组系统将有利于我们对 β -桶状蛋白折叠和组装途径进行更加深入的分析。另外,近期我们课题组研究结果表明,嗜热杆菌的单个 *Ttomp85* 蛋白可代替 *E. coli* BAM 蛋白复合体 5 个亚基的功能,为阐明 BAM 蛋白复合体中核

心蛋白的功能及作用机理等提供了极大的便利^[99]。随着对自转运蛋白结构及分泌和折叠机制的深入了解,有助于将自转运蛋白发展成为一个生产和展示外源蛋白的多功能系统。

另外,自转运蛋白作为外源蛋白表面展示的工具,已成功应用于全细胞生物催化、活疫苗开发、筛选、生物修复和蛋白质分泌等领域。对天然自转运蛋白和融合蛋白的深入了解,将有助于确定实现外源蛋白表面展示所需的基本元素。第一是信号肽的选择。信号肽能介导融合蛋白穿过内膜。目前多种不同来源的信号肽已成功应用到外源蛋白的展示。第二是外源蛋白在乘客结构域中位置的选择,并非每个外源蛋白都可以被乘客结构域正确展示在细菌细胞表面。因为乘客结构域的分泌折叠需要与跨外膜转运相协调。到目前为止,尚无确定这种相容性的通用规则,但应尽量减少广泛的周质空间内的折叠(由于形成二硫键)。另外,自转运蛋白自身的乘客结构域在外源蛋白跨外膜转运中的作用很少被描述。尽管大多数报道认为,由 β -桶状结构域和 α -螺旋组成的转运单元足以实现外源蛋白的表面展示,但利用自转运蛋白表达外源蛋白时是否需要其自身的乘客结构域及需要多少长度的肽链还是个未解之谜。第三是转运单元的确定。通过自转运蛋白分泌融合蛋白的一个缺点是转运通道的容量有限,而且这种限制似乎是由融合蛋白结构复杂性而不是长度决定的。目前对于哪种自转运蛋白的转运单元分泌外源蛋白的能力更强,则尚无报道。我们课题组目前正在通过构建不同的自转运蛋白细菌细胞表面展示系统,从而来探索展示外源蛋白所需的最优化组合。相信随着对自转运蛋白结构、分泌机制以及对自转运蛋白表面展示系统的深入研究,将有助于更好地实现外源蛋白在菌体表面的功能性展示,为我们更好地利用自转运蛋白这一生物技术工具奠定基础。

参考文献

- [1] Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, Waksman G. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, 13(6): 343–359.
- [2] Leo JC, Grin I, Linke D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2012, 367(1592): 1088–1101.
- [3] Grijpstra J, Arenas J, Rutten L, Tommassen J. Autotransporter secretion: varying on a theme. *Research in Microbiology*, 2013, 164(6): 562–582.
- [4] Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends in Microbiology*, 1998, 6(9): 370–378.
- [5] Wu RR, Stephenson R, Gichaba A, Noinaj N. The big BAM theory: an open and closed case? *Biochimica et Biophysica Acta: BBA-Biomembranes*, 2020, 1862(1): 183062.
- [6] Nicolay T, Vanderleyden J, Spaepen S. Autotransporter-based cell surface display in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 2015, 41(1): 109–123.
- [7] Desvaux M, Parham NJ, Henderson IR. The autotransporter secretion system. *Research in Microbiology*, 2004, 155(2): 53–60.
- [8] Hegde RS, Bernstein HD. The surprising complexity of signal sequences. *Trends in Biochemical Sciences*, 2006, 31(10): 563–571.
- [9] Desvaux M, Scott-Tucker A, Turner SM, Cooper LM, Huber D, Nataro JP, Henderson IR. A conserved extended signal peptide region directs posttranslational protein translocation via a novel mechanism. *Microbiology: Reading, England*, 2007, 153(Pt 1): 59–70.
- [10] Emsley P, Charles IG, Fairweather NF, Isaacs NW. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P.69 pertactin. *Nature*, 1996, 381(6577): 90–92.
- [11] Nishimura K, Tajima N, Yoon YH, Park SY, Tame JRH. Autotransporter passenger proteins: virulence factors with common structural themes. *Journal of Molecular Medicine*, 2010, 88(5): 451–458.
- [12] Van Den Berg B. Crystal structure of a full-length autotransporter. *Journal of Molecular Biology*, 2010, 396(3): 627–633.
- [13] Heras B, Totsika M, Peters KM, Paxman JJ, Gee CL, Jarrott RJ, Perugini MA, Whitten AE, Schembri MA. The antigen 43 structure reveals a molecular Velcro-like mechanism of autotransporter-mediated bacterial clumping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(1): 457–462.
- [14] Rojas-Lopez M, Zorgani MA, Kelley LA, Bailly X, Kajava AV, Henderson IR, Politicelli F, Pizza M, Rosini R, Desvaux M. Identification of the autochaperone domain in the type Va secretion system (T5aSS): prevalent feature of autotransporters with a β -helical passenger. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2607.
- [15] Benz I, Schmidt MA. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infection and Immunity*, 1992, 60(1): 13–18.
- [16] Van Der Woude MW, Henderson IR. Regulation and function of Ag43 (flu). *Annual Review of Microbiology*, 2008, 62: 153–169.
- [17] Weiss A, Brockmeyer J. Prevalence, biogenesis, and functionality of the serine protease autotransporter EspP. *Toxins (Basel)*, 2012, 5(1): 25–48.
- [18] Otto BR, Van Dooren SJ, Nuijens JH, Luirink J, Oudega B. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *The Journal of Experimental Medicine*, 1998, 188(6): 1091–1103.
- [19] Torres AG, Perna NT, Burland V, Ruknudin A, Blattner FR, Kaper JB. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 2002, 45(4): 951–966.
- [20] Domingo Meza-Aguilar J, Fromme P, Torres-Larios A, Mendoza-Hernández G, Hernandez-Chiñas U, Arreguin-Espinosa De Los Monteros RA, Eslava Campos CA, Fromme R. X-ray crystal structure of the passenger domain of plasmid encoded toxin (Pet), an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 445(2): 439–444.
- [21] Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 1987, 325(6103): 458–462.
- [22] Huang J, Zhang Q, Chen J, Zhang T, Chen ZH, Chen ZY, Yang JR, Wang YX, Min ZS, Huang MR, Min X. *Neisseria gonorrhoeae* NGO2105 is an autotransporter protein involved in adhesion to human cervical epithelial cells and *in vivo* colonization. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1395.

- [23] Hadi HA, Wooldridge KG, Robinson K, Ala'Aldeen DAA. Identification and characterization of App: an immunogenic autotransporter protein of *Neisseria meningitidis*. *Molecular Microbiology*, 2001, 41(3): 611–623.
- [24] Roussel-Jazédé V, Grijpstra J, Van Dam V, Tommassen J, Van Ulsen P. Lipidation of the autotransporter NalP of *Neisseria meningitidis* is required for its function in the release of cell-surface-exposed proteins. *Microbiology: Reading, England*, 2013, 159(Pt 2): 286–295.
- [25] Leininger E, Roberts M, Kenimer JG, Charles IG, Fairweather N, Novotny P, Brennan MJ. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88(2): 345–349.
- [26] Sun F, Pang XY, Xie T, Zhai YJ, Wang GG, Sun F. BrkAutoDisplay: functional display of multiple exogenous proteins on the surface of *Escherichia coli* by using BrkA autotransporter. *Microbial Cell Factories*, 2015, 14: 129.
- [27] Fink DL, St Geme JW. Chromosomal expression of the *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter allows fine-tuned regulation of adhesive potential via inhibition of intermolecular autoproteolysis. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185(5): 1608–1615.
- [28] Ohnishi Y, Beppu T, Horinouchi S. Two genes encoding serine protease homologues in *Serratia marcescens* and characterization of their products in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry*, 1997, 121(5): 902–913.
- [29] Lipski SL, Akimana C, Timpe JM, Wooten RM, Lafontaine ER. The *Moraxella catarrhalis* autotransporter McaP is a conserved surface protein that mediates adherence to human epithelial cells through its N-terminal passenger domain. *Infection and Immunity*, 2007, 75(1): 314–324.
- [30] Carinato ME, Collin-Osdoby P, Yang X, Knox TM, Conlin CA, Miller CG. The *apeE* gene of *Salmonella typhimurium* encodes an outer membrane esterase not present in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(14): 3517–3521.
- [31] Gangwer KA, Mushrush DJ, Stauff DL, Spiller B, McClain MS, Cover TL, Lacy DB. Crystal structure of the *Helicobacter pylori* vacuolating toxin p55 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(41): 16293–16298.
- [32] Goldberg MB, Theriot JA. *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995, 92(14): 6572–6576.
- [33] Besingi RN, Chaney JL, Clark PL. An alternative outer membrane secretion mechanism for an autotransporter protein lacking a C-terminal stable core. *Molecular Microbiology*, 2013, 90(5): 1028–1045.
- [34] Fan EG, Chauhan N, Udatha DBRKG, Leo JC, Linke D. Type V secretion systems in bacteria. *Microbiology Spectrum*, 2016, 4(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.vmbf-0009-2015.
- [35] Khalid S, Sansom MS. Molecular dynamics simulations of a bacterial autotransporter: NalP from *Neisseria meningitidis*. *Molecular Membrane Biology*, 2006, 23(6): 499–508.
- [36] Dé E, Saint N, Glinel K, Meli AC, Lévy D, Jacob-Dubuisson F. Influence of the passenger domain of a model autotransporter on the properties of its translocator domain. *Molecular Membrane Biology*, 2008, 25(3): 192–202.
- [37] Oomen CJ, Van Ulsen P, Van Gelder P, Feijen M, Tommassen J, Gros P. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *The EMBO Journal*, 2004, 23(6): 1257–1266.
- [38] Páli T, Marsh D. Tilt, twist, and coiling in beta-barrel membrane proteins: relation to infrared dichroism. *Biophysical Journal*, 2001, 80(6): 2789–2797.
- [39] Hagan CL, Silhavy TJ, Kahne D. β -barrel membrane protein assembly by the Bam complex. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, 80: 189–210.
- [40] Rossiter AE, Leyton DL, Tveen-Jensen K, Browning DF, Sevastyanovich Y, Knowles TJ, Nichols KB, Cunningham AF, Overduin M, Schembri MA, Henderson IR. The essential β -barrel assembly machinery complex components BamD and BamA are required for autotransporter biogenesis. *Journal of Bacteriology*, 2011, 193(16): 4250–4253.
- [41] Ryoo D, Rydmark MO, Pang YT, Lundquist KP, Linke D, Gumbart JC. BamA is required for autotransporter secretion. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - General Subjects*, 2020, 1864(7): 129581.
- [42] Leyton DL, Rossiter AE, Henderson IR. From self sufficiency to dependence: mechanisms and factors important for autotransporter biogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 2012, 10(3): 213–225.
- [43] Shere KD, Sallustio S, Manassis A, D'Aversa TG, Goldberg MB. Disruption of IcsP, the major *Shigella* protease that cleaves IcsA, accelerates actin-based motility. *Molecular Microbiology*, 1997, 25(3): 451–462.

- [44] Van Ulsen P, Van Alphen L, Ten Hove J, Fransen F, Van Der Ley P, Tommassen J. A *Neisserial* autotransporter NalP modulating the processing of other autotransporters. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(3): 1017–1030.
- [45] Turner DPJ, Marietou AG, Johnston L, Ho KKL, Rogers AJ, Wooldridge KG, Ala'Aldeen DAA. Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity*, 2006, 74(5): 2957–2964.
- [46] Brockmeyer J, Spelten S, Kuczius T, Bielaszewska M, Karch H. Structure and function relationship of the autotransport and proteolytic activity of EspP from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2009, 4(7): e6100. DOI: 10.1371/journal.pone.0006100.
- [47] Sherlock O, Dobrindt U, Jensen JB, Munk Vejborg R, Klemm P. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(5): 1798–1807.
- [48] Jong WSP, Soprova Z, De Punder K, Ten HC, Wagner S, Wickstrom D, De Gier JW, Andersen P, Van Der Wel NN, Luirink J. A structurally informed autotransporter platform for efficient heterologous protein secretion and display. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11: 85.
- [49] Fleetwood F, Andersson KG, Ståhl S, Löfblom J. An engineered autotransporter-based surface expression vector enables efficient display of affibody molecules on OmpT-negative *E. coli* as well as protease-mediated secretion in OmpT-positive strains. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 179.
- [50] Li CK, Zhu YR, Benz I, Schmidt MA, Chen W, Mulchandani A, Qiao CL. Presentation of functional organophosphorus hydrolase fusions on the surface of *Escherichia coli* by the AIDA-I autotransporter pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 99(2): 485–490.
- [51] Chung ME, Goroncy K, Kolesnikova A, Schönauer D, Schwaneberg U. Display of functional nucleic acid polymerase on *Escherichia coli* surface and its application in directed polymerase evolution. *Biotechnology and Bioengineering*, 2020, 117(12): 3699–3711.
- [52] Kjærgaard K, Schembri MA, Hasman H, Klemm P. Antigen 43 from *Escherichia coli* induces inter- and intraspecies cell aggregation and changes in colony morphology of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(17): 4789–4796.
- [53] Quehl P, Hollender J, Schüürmann J, Brossette T, Maas R, Jose J. Co-expression of active human cytochrome P450 1A2 and cytochrome P450 reductase on the cell surface of *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2016, 15: 26.
- [54] Jose J, Maas RM, Teese MG. Autodisplay of enzymes—molecular basis and perspectives. *Journal of Biotechnology*, 2012, 161(2): 92–103.
- [55] Maurer J, Jose J, Meyer TF. Autodisplay: one-component system for efficient surface display and release of soluble recombinant proteins from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(3): 794–804.
- [56] Schumacher SD, Hannemann F, Teese MG, Bernhardt R, Jose J. Autodisplay of functional CYP106A2 in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, 2012, 161(2): 104–112.
- [57] Balderas Hernández VE, Salas-Montantes CJ, Barba-De La Rosa AP, De Leon-Rodriguez A. Autodisplay of an endo-1,4- β -xylanase from *Clostridium cellulovorans* in *Escherichia coli* for xylans degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 149: 109834.
- [58] Valls M, Atrian S, De Lorenzo V, Fernández LA. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nature Biotechnology*, 2000, 18(6): 661–665.
- [59] Valls M, De Lorenzo V, González-Duarte R, Atrian S. Engineering outer-membrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhanced heavy-metal bioadsorption. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2000, 79(1/2/3/4): 219–223.
- [60] Detzel C, Maas R, Tubeleviciute A, Jose J. Autodisplay of nitrilase from *Klebsiella pneumoniae* and whole-cell degradation of oxynil herbicides and related compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(11): 4887–4896.
- [61] Fathi-Roudsari M, Behmanesh M, Salmanian AH, Sadeghizadeh M, Khajeh K. Functional surface display of laccase in a phenol-inducible bacterial circuit for bioremediation purposes. *Iranian Biomedical Journal*, 2018, 22(3): 202–209.
- [62] Becker S, Michalczyk A, Wilhelm S, Jaeger KE, Kolmar H. Ultrahigh-throughput screening to identify *E. coli* cells expressing functionally active enzymes on their surface. *Chem Bio Chem*, 2007, 8(8): 943–949.
- [63] Strätker K, Haidar S, Dubiel M, Estévez-Braun A, Jose J. Autodisplay of human PIP5K1 α lipid kinase on *Escherichia coli* and inhibitor testing. *Enzyme and Microbial Technology*, 2021, 143: 109717.

- [64] Andersson KG, Persson J, Ståhl S, Löfblom J. Autotransporter-mediated display of a naïve affibody library on the outer membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(4): 1800359.
- [65] Sevastyanovich YR, Leyton DL, Wells TJ, Wardius CA, Tveen-Jensen K, Morris FC, Knowles TJ, Cunningham AF, Cole JA, Henderson IR. A generalised module for the selective extracellular accumulation of recombinant proteins. *Microbial Cell Factories*, 2012, 11(1): 1–11.
- [66] Huang FY, Wang CC, Huang YH, Zhao HG, Guo JL, Zhou SL, Wang H, Lin YY, Tan GH. Antigen 43/Fcε3 chimeric protein expressed by a novel bacterial surface expression system as an effective asthma vaccine. *Immunology*, 2014, 143(2): 230–240.
- [67] Ko HJ, Park E, Song J, Yang TH, Lee HJ, Kim KH, Choi IG. Functional cell surface display and controlled secretion of diverse agarolytic enzymes by *Escherichia coli* with a novel ligation-independent cloning vector based on the autotransporter YfaL. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3051–3058.
- [68] Ahan RE, Kirpat BM, Saltepe B, Şeker UÖŞ. A self-actuated cellular protein delivery machine. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(4): 686–696.
- [69] Xu D, Wang DP, Yang XF, Cao M, Yu J, Wang YL. Fusion of HPV L1 into *Shigella* surface IcsA: a new approach in developing live attenuated *Shigella*-HPV vaccine. *Antiviral Research*, 2014, 102: 61–69.
- [70] Gerritzen MJH, Martens DE, Wijffels RH, Van Der Pol L, Stork M. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(5): 565–574.
- [71] Gorringer AR, Pajón R. Bexsero: a multicomponent vaccine for prevention of meningococcal disease. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2012, 8(2): 174–183.
- [72] Kuipers K, Jong WSP, Van Der Gaast-De Jongh CE, Houben Diane, Van Opzeeland F, Simonetti E, Van Selm S, De Groot R, Koenders MI, Azarian T, Pupo E, Van Der Ley P, Langereis JD, Zomer A, Luirink J, De Jonge MI. Th17-mediated cross protection against pneumococcal carriage by vaccination with a variable antigen. *Infection and Immunity*, 2017, 85(10). DOI: 10.1128/iai.00281-17.
- [73] Zariri A, Van Der Ley P. Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant. *Expert Review of Vaccines*, 2015, 14(6): 861–876.
- [74] Sauri A, ten Hagen-Jongman CM, Van Ulsen P, Luirink J. Estimating the size of the active translocation pore of an autotransporter. *Journal of Molecular Biology*, 2012, 416(3): 335–345.
- [75] Van Den Berg Van Saparoea HB, Houben Diane, De Jonge MI, Jong WSP, Luirink J. Display of recombinant proteins on bacterial outer membrane vesicles by using protein ligation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(8). DOI: 10.1128/aem.02567-17.
- [76] Van Den Berg Van Saparoea HB, Houben DE, Kuijl C, Luirink J, Jong WSP. Combining protein ligation systems to expand the functionality of semi-synthetic outer membrane vesicle nanoparticles. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 890.
- [77] Kramer U, Rizos K, Apfel H, Autenrieth IB, Lattemann CT. Autodisplay: development of an efficacious system for surface display of antigenic determinants in *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity*, 2003, 71(4): 1944–1952.
- [78] Rizos K, Lattemann CT, Bumann D, Meyer TF, Aebischer T. Autodisplay: efficacious surface exposure of antigenic UreA fragments from *Helicobacter pylori* in *Salmonella* vaccine strains. *Infection and Immunity*, 2003, 71(11): 6320–6328.
- [79] Konieczny MPJ, Suhr M, Noll A, Autenrieth IB, Alexander Schmidt M. Cell surface presentation of recombinant (poly-) peptides including functional T-cell epitopes by the AIDA autotransporter system. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2000, 27(4): 321–332.
- [80] Nhan NT, Gonzalez De Valdivia E, Gustavsson M, Hai TN, Larsson G. Surface display of *Salmonella* epitopes in *Escherichia coli* and *Staphylococcus carnosus*. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10: 22.
- [81] Mei Y, Zhao LX, Liu YH, Gong HL, Song Y, Lei L, Zhu Y, Jin ZQ, Ma SB, Hu B, Sun Q, Liu HY. Combining DNA vaccine and AIDA-1 in attenuated *Salmonella* activates tumor-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell responses. *Cancer Immunology Research*, 2017, 5(6): 503–514.
- [82] Mateos-Chávez AA, Muñoz-López P, Becerra-Báez EI, Flores-Martínez LF, Prada-Gracia D, Moreno-Vargas LM, Baay-Guzmán GJ, Juárez-Hernández U, Chávez-Munguía B, Cabrera-Muñoz L, Luria-Pérez R. Live attenuated *Salmonella enterica* expressing and releasing cell-permeable ba_x BH₃ peptide through the MisL autotransporter system elicits antitumor activity in a murine xenograft model of human B non-Hodgkin's lymphoma. *Frontiers in Immunology*, 2019, 10: 2562.
- [83] Ruiz-Pérez F, León-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M, González-

- Bonilla C. Expression of the *Plasmodium falciparum* immunodominant epitope (NANP)(4) on the surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infection and Immunity*, 2002, 70(7): 3611–3620.
- [84] Ruiz-Olvera P, Ruiz-Pérez F, Sepulveda NV, Santiago-Machuca A, Maldonado-Rodríguez R, Garcia-Elorriaga G, González-Bonilla C. Display and release of the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein using the autotransporter MisL of *Salmonella enterica*. *Plasmid*, 2003, 50(1): 12–27.
- [85] Zhu CR, Ruiz-Perez F, Yang ZL, Mao Y, Hackethal VL, Greco KM, Choy W, Davis K, Butterton JR, Boedeker EC. Delivery of heterologous protein antigens via hemolysin or autotransporter systems by an attenuated ler mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vaccine*, 2006, 24(18): 3821–3831.
- [86] Jong WSP, Daleke-Schermerhorn MH, Vikström D, Ten Hagen-Jongman CM, De Punder K, Van Der Wel NN, Van De Sandt CE, Rimmelzwaan GF, Follmann F, Agger EM, Andersen P, De Gier JW, Luirink J. An autotransporter display platform for the development of multivalent recombinant bacterial vector vaccines. *Microbial Cell Factories*, 2014, 13: 162.
- [87] Huang FY, Li L, Liu Q, Li YN, Bai RZ, Huang YH, Zhao HG, Guo JL, Zhou SL, Wang H, Lin YY, Tan GH. Bacterial surface display of endoglin by antigen 43 induces antitumor effectiveness via bypassing immunotolerance and inhibition of angiogenesis. *International Journal of Cancer*, 2014, 134(8): 1981–1990.
- [88] Kjaergaard K, Hasman H, Schembri MA, Klemm P. Antigen 43-mediated autotransporter display, a versatile bacterial cell surface presentation system. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(15): 4197–4204.
- [89] Xin KW, Chow VTK, Alonso S. Exploring the versatility of the autotransporter BrkA for the presentation of *Enterovirus 71* vaccine candidates at the surface of attenuated *Bordetella pertussis*. *Procedia in Vaccinology*, 2010, 2(1): 66–72.
- [90] Byrd W, Ruiz-Perez F, Setty P, Zhu CR, Boedeker EC. Secretion of the Shiga toxin B subunit (Stx1B) via an autotransporter protein optimizes the protective immune response to the antigen expressed in an attenuated *E. coli* (rEPEC E22Δler) vaccine strain. *Veterinary Microbiology*, 2017, 211: 180–188.
- [91] Petermann K, Vordenbäumen S, Pyun JC, Braukmann A, Bleck E, Schneider M, Jose J. Autodisplay of 60-kDa Ro/SS-A antigen and development of a surface display enzyme-linked immunosorbent assay for systemic lupus erythematosus patient sera screening. *Analytical Biochemistry*, 2010, 407(1): 72–78.
- [92] Dudak FC, Boyacı İH. Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors. *Biotechnology Journal*, 2009, 4(7): 1003–1011.
- [93] Iijima M, Kadoya H, Hatahira S, Hiramatsu S, Jung G, Martin A, Quinn J, Jung J, Jeong SY, Choi EK, Arakawa T, Hinako F, Kusunoki M, Yoshimoto N, Niimi T, Tanizawa K, Kuroda S. Nanocapsules incorporating IgG Fc-binding domain derived from *Staphylococcus aureus* protein A for displaying IgGs on immunosensor chips. *Biomaterials*, 2011, 32(6): 1455–1464.
- [94] Jose J, Park M, Pyun JC. Highly sensitive immunoassay based on *E. coli* with autodisplayed Z-domain. *Analytica Chimica Acta*, 2010, 667(1/2): 113–118.
- [95] Jeon D, Pyun JC, Jose J, Park M. A regenerative immunoaffinity layer based on the outer membrane of Z-domains autodisplaying *E. coli* for immunoassays and immunosensors. *Sensors*, 2018, 18(11): 4030.
- [96] Park M, Jose J, Pyun JC. Hypersensitive immunoassay by using *Escherichia coli* outer membrane with autodisplayed Z-domains. *Enzyme and Microbial Technology*, 2010, 46(3/4): 309–314.
- [97] Pohlner J, Halter R, Beyreuther K, Meyer TF. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature*, 1987, 325(6103): 458–462.
- [98] Norell D, Heuck A, Tran-Thi TA, Götzke H, Jacob-Dubuisson F, Clausen T, Daley DO, Braun V, Müller M, Fan EG. Versatile *in vitro* system to study translocation and functional integration of bacterial outer membrane proteins. *Nature Communications*, 2014, 5: 5396.
- [99] Chu YD, Wang Z, Weigold S, Norrell D, Fan EG. TtOmp85, a single Omp85 member protein functions as a β -barrel protein insertase and an autotransporter translocase without any accessory proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, 552: 73–77.

(本文责编 张晓丽)