

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
55 (2) :126 - 133; 4 February 2015  
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140299

## 环二腺苷酸(c-di-AMP)——细菌的一种新型第二信使

杜斌, 孙建和\*

上海交通大学农业与生物学院, 上海市兽医生物技术重点实验室, 上海 200240

**摘要:**环二腺苷酸(cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是在细菌中新发现的一种第二信使分子,其参与调节多种生理功能,包括细菌的生长、细胞壁的代谢平衡以及细菌的致病力等。c-di-AMP除了在细菌中发挥作用外,它还可作为第二信使分子被真核宿主识别,激活先天性免疫应答。细菌细胞内c-di-AMP的代谢受二腺苷酸环化酶(diadenylate cyclase, DAC)和磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)的调控。本文综述了c-di-AMP的代谢途径、调控机制、受体蛋白、生物学功能以及未来的研究方向和应用前景。

**关键词:**环二腺苷酸, 第二信使, 二腺苷酸环化酶, 磷酸二酯酶, 细菌信号转导

**中图分类号:** Q933      **文章编号:** 0001-6209(2015)02-0126-08

环二腺苷酸(cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是新发现的细菌广泛使用的第二信使,其由两分子ATP或ADP经环化酶(diadenylate cyclase, DAC)作用后形成的一种环状分子,并可被磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)分解为一个线性分子pApA或者两分子的AMP(图1)。在枯草芽孢杆菌、化脓链球菌、金黄色葡萄球菌以及猪链球菌的核酸提取物中均发现了c-di-AMP的存在<sup>[1-4]</sup>。近年来,c-di-AMP备受青睐,其生物学功能也日渐明朗。现已发现其与耻垢分枝杆菌的脂肪酸代谢<sup>[5]</sup>、金黄色葡萄球菌对低磷酸盐环境的耐受<sup>[6]</sup>、枯草芽孢杆菌DNA的完整性<sup>[1]</sup>、多种细菌细胞壁的代谢平衡<sup>[3,7-10]</sup>以及细菌的毒力<sup>[4,11-13]</sup>等密切相关,深入阐明其在细菌中的代谢途径、信号转导机制等将具有重要意义。

### 1 c-di-AMP 的代谢

c-di-AMP最初是在研究海栖热袍菌DNA完整性监测蛋白(DNA integrity scanning protein A, DisA)的结构时发现的<sup>[14]</sup>,随着研究的深入,发现c-di-AMP是由含DAC结构域的蛋白催化合成,并可被含有DHH或DHH/DHHA1结构域的磷酸二酯酶分解。

#### 1.1 c-di-AMP 的合成

在解析海栖热袍菌的DisA蛋白晶体结构时发现,在DAC结构域中出现一个额外电子密度,经分析确认为c-di-AMP。进一步研究表明,在二价阳离子存在的条件下,两分子的ATP通过DisA催化生成一分子的c-di-AMP,ATP与c-di-AMP分布于

**基金项目:**国家自然科学基金项目(31172381, 31372500);上海市基础研究重点项目(12JC1404700);上海市科技兴农重点攻关项目(2014-3-4)

\* 通信作者。Tel/ Fax: +86-21-34206926; E-mail: sunjhe@sjtu.edu.cn

**作者简介:**杜斌(1983-),男,内蒙古呼和浩特人,博士研究生,研究方向为生物医学工程。E-mail: danieldu83@sjtu.edu.cn

**收稿日期:**2014-06-10; **修回日期:**2014-09-28

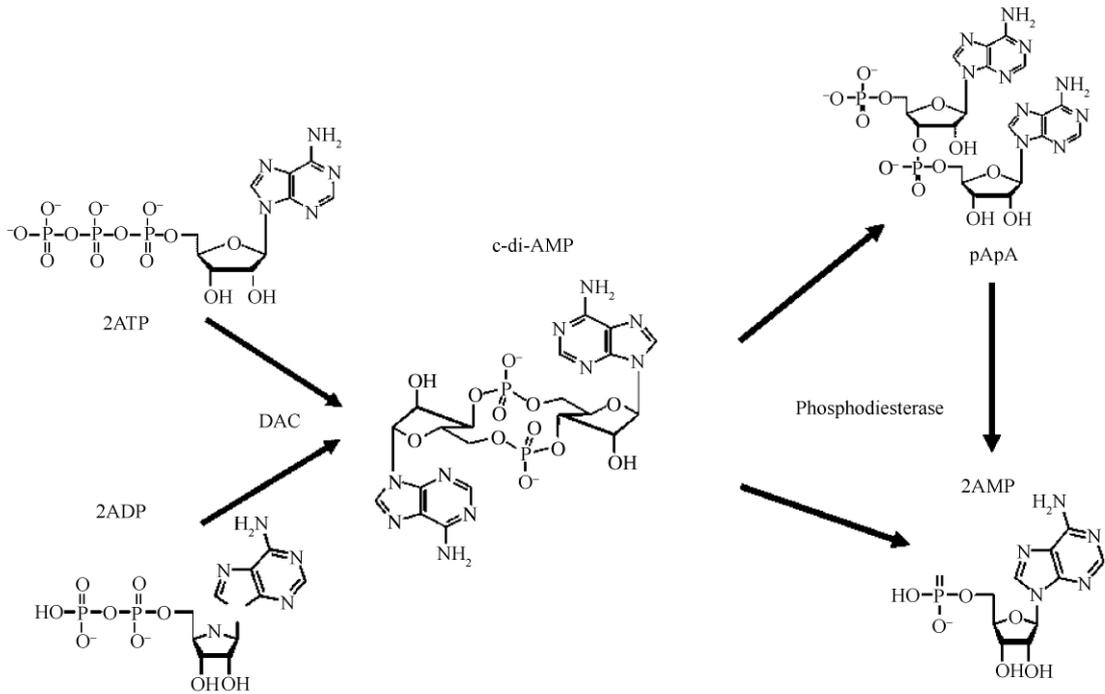


图 1. c-di-AMP 的合成与分解

Figure 1. Synthesis and degradation of c-di-AMP.

DisA 八聚体复合物的不同亚单位中<sup>[14-15]</sup>。配体-DisA 复合物晶体结构解析显示,在 DAC 结构域中存在 DGA 和 RHR 两个特征结构,这两个特征结构在所有具有 DAC 结构域蛋白中均为保守结构,并已有实验证实了它们在催化过程中发挥关键作用<sup>[14-15]</sup>。

通常认为 c-di-AMP 是由两分子的 ATP 经环化酶催化合成的,但 Bai 等<sup>[15]</sup>研究发现,结核分枝杆菌的 c-di-AMP 合成酶 Rv3586 还可以利用 ADP 为底物生成 c-di-AMP, Manikandan 等<sup>[16]</sup>进一步研究发现该合成酶是通过两步反应,即首先催化 ATP 和 ADP 生成对应的中间产物 pppApA 和 ppApA,然后与中间产物继续作用最终转化为 c-di-AMP 的。除了 DisA 外,还有其它一些具有 DAC 结构域蛋白,其中 DacA 蛋白是最为常见的一种,本实验室分析发现猪链球菌中的 DAC 结构域蛋白便属于这一类型,其 DAC 结构域位于羧基端,和一个三螺旋跨膜区相连,该跨膜结构位于氨基端,可能是一个感应区域,通过感知某些特定的细胞膜或细胞壁的变化来调节 c-di-AMP 的合成。我们通过体外活性试验已证明该蛋白具有 c-di-AMP 合成活性,但其具体的生物学功能还在进一步研究中。另外一些不同结构的

含 DAC 结构域蛋白,它们与其它功能蛋白如糖代谢蛋白等相关联<sup>[17]</sup>,其生物学功能也尚待进一步研究。

## 1.2 c-di-AMP 的分解代谢

在发现 c-di-AMP 合成酶的同时,研究者发现了一个可以将 c-di-AMP 水解生成线性 pApA 分子,具有磷酸二酯酶活性的蛋白——YybT<sup>[18]</sup>。该蛋白与其它菌属中的同源蛋白共同被命名为 GdpP,即含有 GGDEF 结构域、具有磷酸二酯酶活性的蛋白(GGDEF domain protein containing PDE, GdpP)。GdpP 蛋白包含两个跨膜螺旋结构、一个 PAS (Per-ARNT-SIM) 感受结构域、一个修饰后的 GGDEF 结构域、一个 DHH 结构域以及一个 DHH 伴随结构域 DHHA1。磷酸二酯酶活性主要位于羧基端的 DHH/DHHA1 区域内,它可以将 c-di-AMP 水解,形成 pApA<sup>[18]</sup>。本实验室通过体外表达以及活性分析证实了猪链球菌中的 GdpP 蛋白具有体外分解 c-di-AMP 的活性,同时通过对该基因的缺失发现,缺失株 c-di-AMP 的含量明显升高,表明 GdpP 在猪链球菌中发挥着调节 c-di-AMP 水平的作用<sup>[4]</sup>。

另外,最新研究发现,其它一些具有 DHH 或 DHH/DHHA1 结构域的蛋白也可以水解 c-di-AMP。

肺炎链球菌中含 DHH/DHHA1 结构域的蛋白 Pde2 不仅可以水解 c-di-AMP, 还可水解其分解产物 pApA, 最终生成 AMP<sup>[19]</sup>; 伯氏疏螺旋体中含 DHH/DHHA1 结构域的蛋白 Dhhp, 能够水解 c-di-AMP 生成 pApA<sup>[13]</sup>; 结核分支杆菌中含 DHH 结构域的蛋白 MtbPDE 可以通过两个步骤最终将 c-di-AMP 水解成为 5'-AMP<sup>[16]</sup>。多种 c-di-AMP 分解蛋白的发现提示 c-di-AMP 在细菌细胞内可能有着不同的分布, 而不同的代谢蛋白可能调节着不同区域内的 c-di-AMP 代谢平衡, 继而完成其不同的生物学功能。

## 2 c-di-AMP 的受体及其参与的细胞进程

与其它信号分子一样, c-di-AMP 参与的代谢通路也遵循着相似的规则。当菌体感知到环境的变化后, 参与 c-di-AMP 合成或分解的酶的活性会发生变化, 从而导致其在细胞内的浓度发生改变, 通过与其受体的作用, 调节下游效应分子的功能, 进而发挥特定的生物学作用, 现已发现如下几种 c-di-AMP 受体。

### 2.1 转录因子 DarR

耻垢分枝杆菌 Ms5346 基因编码的四环素抗性 (tetracycline resistance, TetR) 家族调节因子是发现的第一个 c-di-AMP 受体蛋白, 后被命名为 c-di-AMP 受体调节因子 (c-di-AMP receptor regulator, DarR)<sup>[5]</sup>, DarR 是从耻垢分枝杆菌大约 500 个预测的转录因子中筛选获得的<sup>[5]</sup>。在耻垢分枝杆菌中, DarR 不但能够与其自身启动子结合并抑制其转录,

它还可以与编码中链脂肪酰基辅酶 A 合成酶和主要易化家族转运蛋白的转录操纵子的启动子结合, 抑制其转录。在耻垢分枝杆菌中, 敲除 *darR* 会导致细胞体积膨大, 相反, 其过表达则对细菌具有毒性作用, 并引起脂肪酸合成显著减少。表明改变细胞内的 c-di-AMP 浓度会影响耻垢分枝杆菌脂肪酸的代谢进而影响细菌的形态。

### 2.2 盐离子转运相关蛋白

应用亲和阻滞分析发现, 金黄色葡萄球菌 Ktr 型钾盐转运系统的 KtrA 蛋白, 是又一个 c-di-AMP 受体蛋白<sup>[6]</sup>。KtrA 是钾盐转运调控因子家族中的一员, 它由一个氨基端的 RCK\_N 结构域和一个羧基端的 RCK\_C 结构域组成, c-di-AMP 则与 RCK\_C 结构域特异性结合。研究发现, KtrA 是金黄色葡萄球菌在低钾盐环境中生长必不可少的<sup>[6]</sup>。组氨酸激酶 KdpD 是另一个通过全基因组筛选得到的 c-di-AMP 受体, 这一蛋白同样有可能参与钾离子的平衡代谢, 另外它还在多种致病菌中参与细菌毒力和细菌在细胞内生存的调控<sup>[20]</sup>。此外, 阳离子反向转运体 A (cation proton antiporter A, CpaA) 也被鉴定为 c-di-AMP 的受体。鉴于 CpaA 同样是一个离子转运蛋白, 提示其有可能参与细胞钾盐和钠盐的摄取<sup>[6]</sup>。

最新研究发现, 在肺炎链球菌中, 一个 Trk 家族钾离子转运蛋白 CabP (SPD\_0077) 可与另一个 Trk 家族钾离子转运蛋白 SPD\_0076 结合, 从而促进钾离子的摄取。而细胞中的 c-di-AMP 又可以与 CabP 发生结合, 阻碍 CabP 与 SPD\_0077 的结合, 从而影响细菌对钾离子的摄取 (图 2)。提示 c-di-AMP 可

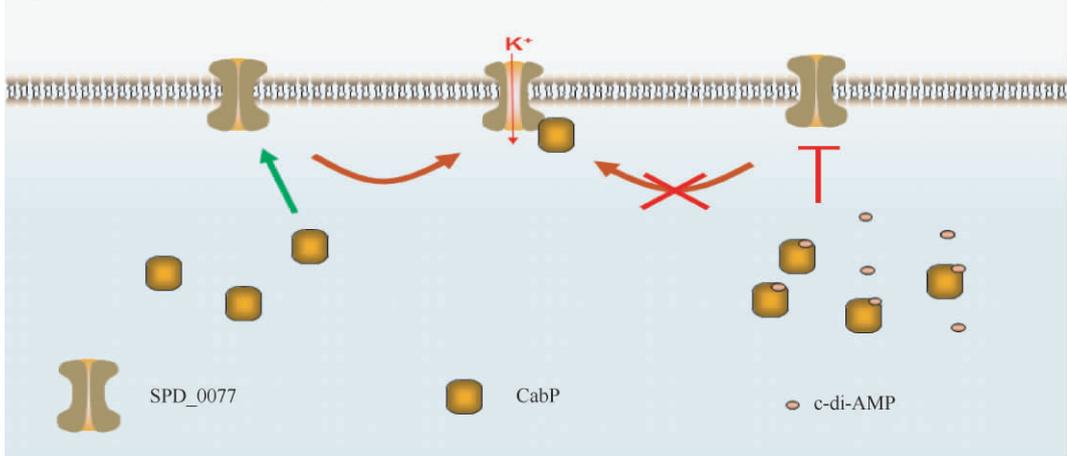


图 2. 肺炎链球菌 c-di-AMP 调控钾离子摄取示意图

Figure 2. Model of c-di-AMP controlled potassium uptake by *S. pneumoniae*.

能在肺炎链球菌摄取钾离子的过程中存在一定的调节作用。

离子转运对细菌的生存极为重要,它可以帮助细菌适应环境中渗透性的变化,调控胞内酶的活性,调节胞内酸碱平衡以及保持一个适当的细胞膜位势。c-di-AMP 信号通路与离子平衡之间的联系提示该分子对细菌生存至关重要。

### 2.3 信号转导蛋白 PstA

金黄色葡萄球菌中又一个被确认的 c-di-AMP 受体是一 P<sub>II</sub> 样信号转导蛋白,被命名为 PstA<sup>[6]</sup>。PstA 是一个胞内蛋白,包含一个未知功能的结构域 DUF970。在含该结构域的蛋白中,P<sub>II</sub> 样氮调节蛋白研究得最为清楚,它属于 GlnB 超家族。这些蛋白都是参与碳与氮代谢的重要因子,提示 c-di-AMP 可能参与氮代谢的调节。

### 2.4 ydaO 核糖开关

核糖开关是一类能够应答配体浓度变化,从而调控基因表达的 mRNA 元件。ydaO 核糖开关通常与细菌细胞壁代谢,适应渗透压的变化以及细菌芽孢的形成相关<sup>[21-22]</sup>,虽然研究发现枯草芽孢杆菌中的 ydaO RNA 能够感受 ATP 并产生一定的反应,但是进一步研究发现,ATP 并不是 ydaO RNA 识别的首要受体<sup>[23]</sup>。Nelson 等证明了 c-di-AMP 可以和 ydaO RNA 紧密结合,ydaO RNA 结构中 M1、M2、M3、M4 和 M5 位点(图 3)上的核苷酸是影响 ydaO RNA 与 c-di-AMP 结合的关键位点<sup>[24]</sup>。此外,该课题组还通过体外以及体内试验证实了 c-di-AMP 与 ydaO 核糖开关的结合可以调控基因的表达,并且进一步研究还发现 c-di-AMP 控制的核糖开关参与调

控细菌的多种生物活动,如放线细菌的细胞壁代谢,蓝藻细菌渗透保护剂的合成以及芽孢杆菌芽孢的形成等<sup>[24]</sup>。c-di-AMP 核糖开关受体的发现,进一步丰富了 c-di-AMP 调控细菌基因表达的机制。

## 3 c-di-AMP 的生物学功能

### 3.1 监测 DNA 的损伤

对 c-di-AMP 的生物学功能的研究,最早是在枯草芽孢杆菌中进行的。枯草芽孢杆菌的 c-di-AMP 合成蛋白 DisA 是一个八聚体蛋白,通过羧基端的 HhH 结构域与 DNA 结合,在对基因组 DNA 进行扫描(scan)的同时,氨基端的 DisA\_N 结构域部分合成 c-di-AMP,并向前移动<sup>[14,25]</sup>。DisA 的移动依赖于 c-di-AMP 的合成<sup>[1,25]</sup>。当检测到分支的 DNA 时,如 Holliday 连接体和复制叉,DisA 的移动以及 c-di-AMP 的合成便停止<sup>[1,14]</sup>,随后,以 c-di-AMP 水平的下降作为信号使 DNA 停止复制直至其修复为止,如图 4 所示。有报道指出 DisA 会在细菌的对数生长期后期以及芽孢形成过程中表达量增加<sup>[25]</sup>。因此,c-di-AMP 作为 DNA 完整性的指示因子,可以确保枯草芽孢杆菌只将没有损伤的 DNA 包装于芽孢中<sup>[1]</sup>。

### 3.2 对细菌生长的影响

研究发现,通过常规生物学方法敲除 c-di-AMP 的合成蛋白基因会导致多种细菌无法生存<sup>[3,26-27]</sup>,提示 c-di-AMP 是细菌生长所必须的信号分子。Mehne 等研究证实 c-di-AMP 是枯草芽孢杆菌生长所必须的分子,但研究同时发现过高的 c-di-AMP 水平却对细菌生长有害<sup>[28]</sup>。在对单增李斯特杆菌、肺炎链球菌以及耻垢分支杆菌等细菌进行研究时发现,这些细菌胞内 c-di-AMP 的改变能够明显影响细菌的生长<sup>[5,8-12]</sup>。同样,本实验室研究发现,猪链球菌 c-di-AMP 分解蛋白基因 *gdpP* 缺失后,随着胞内 c-di-AMP 含量的升高,其生长也受到明显的影响<sup>[4]</sup>,上述结果均提示,细菌通常保持这一个适当的 c-di-AMP 含量并处于一个平衡状态,当平衡被破坏,无论是 c-di-AMP 水平过低或者过高都会影响细菌正常的生长。

### 3.3 调节细胞壁的动态平衡

最近,众多研究表明,改变细胞内 c-di-AMP 的水平会导致细菌细胞壁的变化。例如,在葡萄球菌中,GdpP 的失活可引起细胞内 c-di-AMP 升高近 15

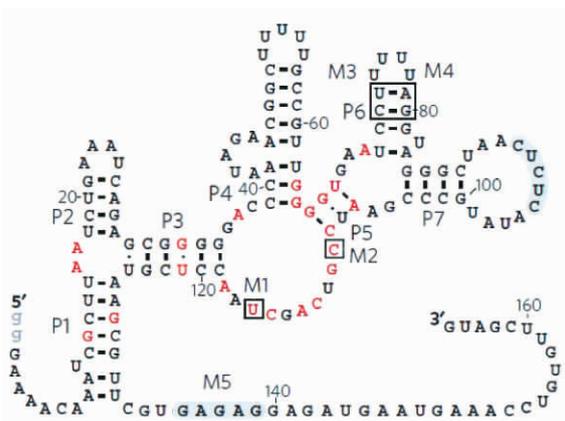


图 3. 165 ydaO RNAs 结构意图<sup>[24]</sup>

Figure 3. Characteristics of 165 ydaO RNAs<sup>[24]</sup>.

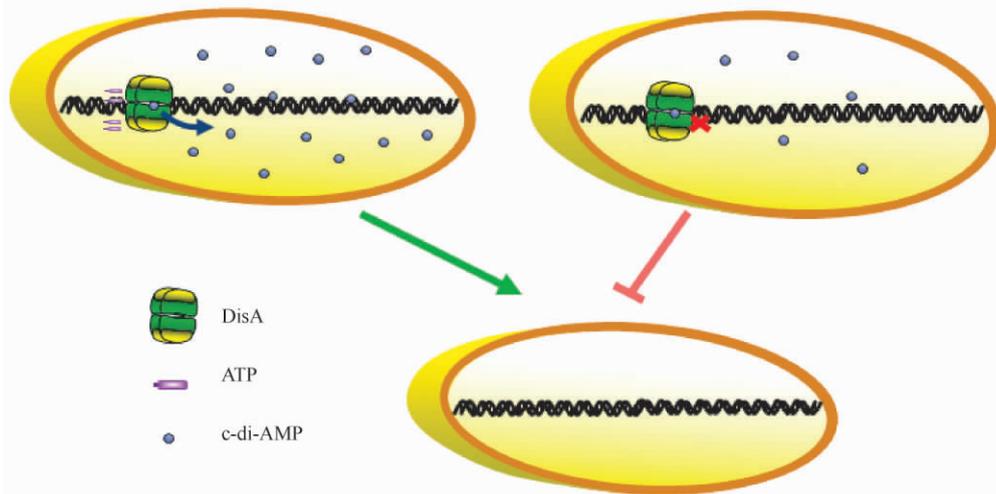


图 4. c-di-AMP 作为 DNA 损伤第二信使分子模型示意图<sup>[1]</sup>

Figure 4. A schematic illustration of the activity of c-di-AMP as a secondary molecule signalling DNA damage<sup>[1]</sup>.

倍,而这一过程可以恢复多聚脂磷壁酸 (polymer lipoteichoic acid, LTA) 缺失型菌株的生存能力<sup>[3]</sup>。金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌在 *gdpP* 发生突变后均表现出对  $\beta$ -内酰胺类药物敏感性的降低,这更进一步说明 c-di-AMP 水平的变化影响了这两种细菌细胞壁的结构。而本实验室研究发现,虽然猪链球菌 *gdpP* 基因缺失后, c-di-AMP 水平有所上升,但其  $\beta$ -内酰胺类药物的敏感性却没有显著变化,同样在伯氏疏螺旋体也发现这一现象<sup>[13]</sup>,其原因可能为猪链球菌在 *gdpP* 基因缺失后 c-di-AMP 的上升没有达到金黄色葡萄球菌和枯草芽孢杆菌的水平(约 2 倍),或者 c-di-AMP 在不同细菌中发挥的作用不同,产生这一现象的原因尚待进一步研究。

### 3.4 诱导真核宿主细胞的免疫反应

I 型干扰素应答是机体激活的抵抗病毒感染的一类先天性免疫反应。报道显示, c-di-AMP 是激活这一应答信号通路的信号分子之一。

单增李斯特杆菌是一种胞内寄生性致病菌,在其进入宿主细胞后, c-di-AMP 通过多药外排泵 (multidrug efflux pumps) MdrM 和 MdrT 分泌到宿主的细胞溶质中<sup>[29-31]</sup>,接着诱导机体 I 型干扰素应答产生  $\beta$ -干扰素<sup>[26,31]</sup>。这一应答依赖于宿主细胞的解旋酶 DDX41 以及跨膜受体分子 STING (STimulator of INterferon Genes)<sup>[32-33]</sup>。最近,研究发现 c-di-AMP 可以与 DDX41 结合,然后与 STING 形成一个复合体, DDX41 可能作为一个共同受体而发挥作用<sup>[34]</sup>。当 STING 被激活后便会促发一系列

下游反应,激活 I 型干扰素信号通路,产生  $\beta$ -干扰素。Yang 等<sup>[35]</sup>构建了结核分枝杆菌 c-di-AMP 合成基因缺失株  $\Delta disA$  以及分解基因缺失株  $\Delta cnpB$ ,分析结果显示,  $\Delta disA$  胞内以及分泌到胞外的 c-di-AMP 的含量显著降低,而  $\Delta cnpB$  相应的 c-di-AMP 含量则明显升高。用这两个菌株分别感染由 C57BL/6 WT 小鼠分离获得的骨髓源巨噬细胞,并检测  $\beta$ -干扰素的分泌情况,结果显示,与各菌株胞内以及分泌到胞外的 c-di-AMP 的含量变化相对应,  $\Delta disA$  感染组细胞的  $\beta$ -干扰素的分泌量较野生株低约 4 倍,而  $\Delta cnpB$  感染组细胞的  $\beta$ -干扰素的分泌量则高出野生组 10 倍,提示结核分枝杆菌分泌的 c-di-AMP 能够刺激感染的宿主细胞分泌 IFN- $\beta$ 。细菌诱导的这一反应是否对细菌的增殖有利还是只是细菌为了调节胞内 c-di-AMP 水平而产生的反应仍需进一步研究。

### 3.5 影响细菌毒力

Kyu Hong Cho 等<sup>[11]</sup>研究发现,在化脓链球菌中, GdpP 缺失会影响其重要的毒力蛋白——致热外毒素 (secreted pyrogenic exotoxin B, SpeB) 的活化过程,同时 GdpP 的缺失降低了该菌的毒力。在对肺炎链球菌 c-di-AMP 相关代谢蛋白的研究中发现,缺失 c-di-AMP 分解相关蛋白 Pde1 和 Pde2 会影响菌体内 c-di-AMP 的代谢平衡,影响细菌的生长,并且导致肺炎链球菌毒力的下降<sup>[12]</sup>。结核分枝杆菌在 c-di-AMP 分解基因缺失后,伴随着细菌产生 c-di-AMP 水平的升高,其对实验小鼠的毒力明显下

降<sup>[35]</sup>。本实验室在对猪链球 2 型进行研究时发现, 敲除 c-di-AMP 水解蛋白基因 *gdpP*, 在导致细胞内 c-di-AMP 水平升高的同时, 也降低了细菌的溶血活性, 以及对 Hep-2 细胞的黏附与侵入能力, 同时动物实验结果显示, *gdpP* 基因缺失株对实验动物的致病力也明显降低<sup>[4]</sup>, 由此可见, c-di-AMP 在调节致病细菌的毒力方面发挥着重要的作用。

## 4 问题与展望

自 2008 年发现 c-di-AMP 以来, 已在多种细菌中发现其存在, 并引发越来越多的关注。其水平升降可导致一系列细菌表型发生改变, 无疑表明该分子作为一类重要的第二信使, 调控着一系列重要的细胞进程。但是 c-di-AMP 的研究仍处于起步阶段, 仍有许多问题亟待回答: 含 DAC 结构域蛋白的微生物中是否一定存在 c-di-AMP 信号通路? 是否还存在其它的 c-di-AMP 的降解蛋白(在一些含 DAC 结构域蛋白的微生物中并未发现 GdpP 及其相似蛋白的存在)<sup>[17]</sup>? 是否存在其它直接调节 c-di-AMP 水平的信号分子? 菌体内的受体分子及效应蛋白仍有待进一步发现。

虽然 c-di-AMP 在细菌细胞中发挥作用的机理仍待进一步阐明, 但其在应用方面已显现出一定的潜力。由于其能激发机体先天性免疫应答, 因此已有将其作为佐剂应用于粘膜以及全身免疫的报道<sup>[36-38]</sup>。深入研究该分子与细胞壁的相互作用, 有可能在细菌耐药性的问题上形成新的理论。另外, 鉴于多种致病菌中 c-di-AMP 的发现及其对致病作用的影响, 研究其在细胞中的信号转导通路就显得十分必要, 可以为发展新的干预治疗方法提供新的理论和产品。

## 参考文献

- [1] Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, Yavin E, Ben-Yehuda S. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Reports*, 2011, 12(6): 594-601.
- [2] Kamegaya T, Kuroda K, Hayakawa Y. Identification of a *Streptococcus pyogenes* SF370 gene involved in production of c-di-AMP. *Nagoya Journal of Medical Science*, 2011, 73(1-2): 49-57.
- [3] Corrigan RM, Abbott JC, Burhenne H, Kaever V,

Grundling A. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002217.

- [4] Du B, Ji W, An H, Shi Y, Huang Q, Cheng Y, Fu Q, Wang H, Yan Y, Sun J. Functional analysis of c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, in *Streptococcus suis* serotype 2. *Microbiological Research*, 2014.
- [5] Zhang L, Li W, He ZG. DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a cyclic di-AMP-responsive repressor in *Mycobacterium smegmatis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(5): 3085-3096.
- [6] Corrigan RM, Campeotto I, Jeganathan T, Roelofs KG, Lee VT, Grundling A. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 9084-9089.
- [7] Luo Y, Helmann JD. Analysis of the role of *Bacillus subtilis* sigma (M) in beta-lactam resistance reveals an essential role for c-di-AMP in peptidoglycan homeostasis. *Molecular Microbiology*, 2012, 83(3): 623-639.
- [8] Witte CE, Whiteley AT, Burke TP, Sauer JD, Portnoy DA, Woodward JJ. Cyclic di-AMP Is Critical for *Listeria monocytogenes* Growth, Cell Wall Homeostasis, and Establishment of Infection. *mBio*, 2013, 4(3).
- [9] Griffiths JM, O'Neill AJ. Loss of function of the *gdpP* protein leads to joint beta-lactam/glycopeptide tolerance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012, 56(1): 579-581.
- [10] Pozzi C, Waters EM, Rudkin JK, Schaeffer CR, Lohan AJ, Tong P, Loftus BJ, Pier GB, Fey PD, Massey RC, O' Gara JP. Methicillin resistance alters the biofilm phenotype and attenuates virulence in *Staphylococcus aureus* device-associated infections. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(4): e1002626.
- [11] Cho KH, Kang SO. *Streptococcus pyogenes* c-di-AMP Phosphodiesterase, GdpP, Influences SpeB Processing and Virulence. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69425.
- [12] Bai Y, Yang J, Eisele LE, Underwood AJ, Koestler BJ, Waters CM, Metzger DW, Bai G. Two DHH subfamily 1 proteins in *Streptococcus pneumoniae* possess c-di-AMP phosphodiesterase activity and affect bacterial growth and virulence. *Journal of Bacteriology*, 2013.
- [13] Ye M, Zhang JJ, Fang X, Lawlis GB, Troxell B ZY, Gomelsky M, Lou Y, XF. Y. DhhP, a c-di-AMP phosphodiesterase of *Borrelia burgdorferi*, is essential for

- cell growth and virulence. *Infection and Immunity*, 2014, 82(5):1840–1844.
- [14] Witte G, Hartung S, Buttner K, Hopfner KP. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Molecular Cell*, 2008, 30(2):167–178.
- [15] Bai Y, Yang J, Zhou X, Ding X, Eisele LE, Bai G. *Mycobacterium tuberculosis* Rv3586 (DacA) is a diadenylate cyclase that converts ATP or ADP into c-di-AMP. *PLoS One*, 2012, 7(4):e35206.
- [16] Manikandan K, Sabareesh V, Singh N, Saigal K, Mechold U, Sinha KM. Two-step synthesis and hydrolysis of cyclic di-AMP in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One*, 2014, 9(1):e86096.
- [17] Corrigan RM, Grundling A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nature reviews Microbiology*, 2013.
- [18] Rao F, See RY, Zhang D, Toh DC, Ji Q, Liang ZX. YybT is a signaling protein that contains a cyclic dinucleotide phosphodiesterase domain and a GGDEF domain with ATPase activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(1):473–482.
- [19] Bai Y, Yang J, Eisele LE, Underwood AJ, Koestler BJ, Waters CM, Metzger DW, Bai G. Two DHH subfamily 1 proteins in *Streptococcus pneumoniae* possess cyclic di-AMP phosphodiesterase activity and affect bacterial growth and virulence. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(22):5123–5132.
- [20] Freeman ZN, Dorus S, Waterfield NR. The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(3):e1003201.
- [21] Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, Collins J, Lee M, Roth A, Sudarsan N, Jona I, Wickiser JK, Breaker RR. New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(17):6421–6426.
- [22] Marchais A, Duperrier S, Durand S, Gautheret D, Stragier P. CsfG, a sporulation-specific, small non-coding RNA highly conserved in endospore formers. *RNA Biology*, 2011, 8(3):358–364.
- [23] Watson PY, Fedor MJ. The ydaO motif is an ATP-sensing riboswitch in *Bacillus subtilis*. *Nature Chemical Biology*, 2012, 8(12):963–965.
- [24] Nelson JW, Sudarsan N, Furukawa K, Weinberg Z, Wang JX, Breaker RR. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(12):834–839.
- [25] Bejerano-Sagie M, Oppenheimer-Shaanan Y, Berlatzky I, Rouvinski A, Meyerovich M, Ben-Yehuda S. A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell*, 2006, 125(4):679–690.
- [26] Woodward JJ, Iavarone AT, Portnoy DA. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*, 2010, 328(5986):1703–1705.
- [27] French CT, Lao P, Loraine AE, Matthews BT, Yu H, Dybvig K. Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*. *Molecular Microbiology*, 2008, 69(1):67–76.
- [28] Mehne FM, Gunka K, Eilers H, Herzberg C, Kaefer V, Stulke J. Cyclic di-AMP homeostasis in *Bacillus subtilis*: both lack and high level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(3):2004–2017.
- [29] Schwartz KT, Carleton JD, Quillin SJ, Rollins SD, Portnoy DA, Leber JH. Hyperinduction of host beta interferon by a *Listeria monocytogenes* strain naturally overexpressing the multidrug efflux pump MdrT. *Infection and Immunity*, 2012, 80(4):1537–1545.
- [30] Crimmins GT, Herskovits AA, Rehder K, Sivick KE, Lauer P, Dubensky TW, Jr., Portnoy DA. *Listeria monocytogenes* multidrug resistance transporters activate a cytosolic surveillance pathway of innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2008, 105(29):10191–10196.
- [31] Yamamoto T, Hara H, Tsuchiya K, Sakai S, Fang R, Matsuura M, Nomura T, Sato F, Mitsuyama M, Kawamura I. *Listeria monocytogenes* strain-specific impairment of the TetR regulator underlies the drastic increase in cyclic di-AMP secretion and beta interferon-inducing ability. *Infection and Immunity*, 2012, 80(7):2323–2332.
- [32] Sauer JD, Sotelo-Troha K, von Moltke J, Monroe KM, Rae CS, Brubaker SW, Hyodo M, Hayakawa Y, Woodward JJ, Portnoy DA, Vance RE. The N-ethyl-N-nitrosourea-induced Goldenticket mouse mutant reveals an essential function of Sting in the in vivo interferon response to *Listeria monocytogenes* and cyclic

- dinucleotides*. *Infection and Immunity*, 2011, 79 (2) : 688-694.
- [33] Burdette DL, Monroe KM, Sotelo-Troha K, Iwig JS, Eckert B, Hyodo M, Hayakawa Y, Vance RE. STING is a direct innate immune sensor of cyclic di-GMP. *Nature*, 2011, 478 (7370) : 515-518.
- [34] Parvatiyar K, Zhang Z, Teles RM, Ouyang S, Jiang Y, Iyer SS, Zaver SA, Schenk M, Zeng S, Zhong W, Liu ZJ, Modlin RL, Liu YJ, Cheng G. The helicase DDX41 recognizes the bacterial secondary messengers cyclic di-GMP and cyclic di-AMP to activate a type I interferon immune response. *Nature Immunology*, 2012, 13 (12) : 1155-1161.
- [35] Yang J, Bai Y, Zhang Y, Gabrielle VD, Jin L, Bai G. Deletion of the cyclic di-AMP phosphodiesterase gene (*cnpB*) in *Mycobacterium tuberculosis* leads to reduced virulence in a mouse model of infection. *Molecular Microbiology*, 2014, 93 (1) : 65 - 79.
- [36] Karaolis DK, Cheng K, Lipsky M, Elnabawi A, Catalano J, Hyodo M, Hayakawa Y, Raufman JP. 3',5'-Cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) inhibits basal and growth factor-stimulated human colon cancer cell proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 329 (1) : 40-45.
- [37] Ebsensen T, Libanova R, Schulze K, Yevsa T, Morr M, Guzman CA. Bis-(3', 5')-cyclic dimeric adenosine monophosphate: strong Th1/Th2/Th17 promoting mucosal adjuvant. *Vaccine*, 2011, 29 (32) : 5210-5220.
- [38] Chen W, Kuolee R, Yan H. The potential of 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant. *Vaccine*, 2010, 28 (18) : 3080-3085.

## Cyclic diadenosine monophosphate — a new second messenger in bacteria – A review

Bin Du, Jianhe Sun \*

School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Shanghai 200240, China

**Abstract:** Cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP), a new second messenger found recently in bacteria, regulates various aspects of bacterial physiology, including cell growth, cell wall homeostasis and virulence. In addition to its functions in bacterial physiology, c-di-AMP represents a putative bacterial secondary signaling molecule sensed by eukaryotic host cells and triggers innate immunity. The level of c-di-AMP in bacteria is regulated by the activities of diadenylate cyclase (DAC) and phosphodiesterases (PDE), the former harbors a DisA\_N domain, and the latter a DHH or DHH/DHHA1 domain. This review gives an overview on metabolic pathway, regulatory mechanism, receptor proteins and biological function of c-di-AMP in bacteria, as well as its application and trends of development.

**Keywords:** cyclic diadenosine monophosphate, second messenger, diadenylate cyclase, phosphodiesterase, bacterial signal transduction

(本文责编:王晋芳)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31172381, 31372500), by the Basic Research Programs of Science and Technology Commission Foundation of Shanghai (12JC1404700) and by the Key Project of Shanghai Municipal Agricultural Commission (2014-3-1)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-21-34206926; E-mail: sunjhe@sjtu.edu.cn

Received: 10 June 2014/ Revised: 28 September 2014