



铜绿假单胞菌中 PA0847 二鸟苷酸环化酶活性受非催化位点 Y700 调控

肖王鑫¹, 杨婷婷¹, 黄卫东², 袁文肃¹, 张燕^{1*}, 林志^{1*}

1 天津大学生命科学学院, 天津 300072

2 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏 银川 750003

肖王鑫, 杨婷婷, 黄卫东, 袁文肃, 张燕, 林志. 铜绿假单胞菌中 PA0847 二鸟苷酸环化酶活性受非催化位点 Y700 调控[J]. 微生物学报, 2024, 64(7): 2337-2351.

XIAO Wangxin, YANG Tingting, HUANG Weidong, YUAN Wensu, ZHANG Yan, LIN Zhi. The non-catalytic site Y700 regulates diguanylate cyclase activity of PA0847 in *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(7): 2337-2351.

摘要:【目的】鉴定铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中 PA0847 胞内结构域及其突变体的二鸟苷酸环化酶活性, 并初步探究其催化机制。【方法】利用刚果红平板染色法验证 PA0847 胞内域的二鸟苷酸环化酶活性; 采用 PCR 技术构建 PA0847 PAS-GGDEF 结构域及其单点突变体, 并经过表达纯化获得相应蛋白; 经凝胶分子筛层析分析蛋白在溶液中的聚集状态; 通过体外酶促反应鉴定蛋白的二鸟苷酸环化酶活性, 基于噻唑橙荧光染色检测蛋白酶促反应后环鸟苷二磷酸(cyclic diguanylate monophosphate, c-di-GMP)的生成量, 并筛选与二鸟苷酸环化酶活性密切相关的氨基酸残基; 联用结构预测和分子对接获得 PA0847 PAS-GGDEF 二聚体以及结合三磷酸鸟苷(guanosine triphosphate, GTP)的复合物结构模型。【结果】PA0847 PAS-GGDEF 主要以二聚体形式发挥催化活性, PAS 结构域促进二聚体形成, 有效提高二鸟苷酸环化酶活性; 突变筛选发现, 在低蛋白浓度(0.6 mg/mL)下, 非催化位点突变体 Y700A 活性较野生型显著提高; 凝胶分子筛层析表明, 其高活性可能与 Y700A 突变促进 GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe)结构域二聚化有关; 结构模型分析显示, PA0847 PAS-GGDEF 与 GTP 结合位点保守, 其中 K722 的氨基侧链在结合 GTP 的磷酸基团中发挥着重要作用, 而 Y700 芳香环侧链与 K722 所在的 α 螺旋有疏水互作, 因此 Y700A 突变可能改变了 K722 所在螺旋的空间取向, 进而促进 K722 与底物 GTP 的结合以及 GGDEF 二聚化。【结论】铜绿假单胞菌 PA0847 的非催化位点 Y700 可间接调控二鸟苷酸环化酶活性。

关键词: 铜绿假单胞菌; PA0847; 环鸟苷二磷酸(c-di-GMP); 三磷酸鸟苷

资助项目: 宁夏回族自治区自然科学基金(2022AAC03183)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Ningxia Hui Autonomous Region (2022AAC03183).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Yan, zhangyan1992@tju.edu.cn; LIN Zhi, zhi.lin@tju.edu.cn

Received: 2023-12-03; Accepted: 2024-04-03; Published online: 2024-04-15

The non-catalytic site Y700 regulates diguanylate cyclase activity of PA0847 in *Pseudomonas aeruginosa*

XIAO Wangxin¹, YANG Tingting¹, HUANG Weidong², YUAN Wensu¹, ZHANG Yan^{1*}, LIN Zhi^{1*}

¹ School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

² School of Basic Medical Science, Ningxia Medical University, Yinchuan 750003, Ningxia, China

Abstract: [Objective] To identify the diguanylate cyclase activity of the intracellular domain and its mutants of PA0847 from *Pseudomonas aeruginosa* and preliminarily probe into its catalytic mechanism. [Methods] Congo red plate staining was employed to verify the diguanylate cyclase activity of the intracellular domain of PA0847. PCR was employed to construct the PA0847 PAS-GGDEF domain and its single-point mutants, and the corresponding proteins were expressed and purified. Gel filtration chromatography was utilized to analyze the aggregation states of proteins in solution. The diguanylate cyclase activity of the proteins was identified by *in-vitro* enzymatic reactions. Based on thiazole orange fluorescence staining, the production of cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP) was determined after the enzymatic reactions, and the amino acid residues closely related to the activity of diguanylate cyclase were screened. The structural models of PA0847 PAS-GGDEF and its complex with guanosine triphosphate (GTP) were obtained by structure prediction combined with molecular docking. [Results] PA0847 PAS-GGDEF primarily exerted its catalytic activity as a dimer, with the PAS domain facilitating the dimer formation and increasing the activity of the diguanylate cyclase. Mutant screening revealed a significant increase in the activity of the non-catalytic site mutant Y700A compared with the wild type at a low protein concentration (<0.6 mg/mL). Gel filtration chromatography indicated that the heightened activity may be attributed to the enhanced GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe) dimerization driven by Y700A. Structural modeling revealed that PA0847 PAS-GGDEF had a conserved GTP binding site, in which the amino side chain of K722 played an important role in binding to the phosphoryl group of GTP. The aromatic ring of Y700 engaged in a hydrophobic interaction with the alpha-helix containing K722. Therefore, the mutation Y700A may alter the spatial orientation of the K722-containing helix, which promoted the binding of K722 to the substrate GTP and the dimerization of GGDEF. [Conclusion] The non-catalytic site Y700 of PA0847 from *Pseudomonas aeruginosa* can indirectly regulate the diguanylate cyclase activity.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; PA0847; cyclic diguanylate monophosphate (c-di-GMP); Guanosine triphosphate (GTP)

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种常见的条件致病菌,广泛存在于自然界中。临床上,铜绿假单胞菌是造成医院内感染的主要病原菌之一,具有较强的耐药性。同时,

由于其相对清晰的遗传背景,铜绿假单胞菌也作为一种实验模式菌,经常被用于进行感染与免疫相关研究^[1-2]。据报道,在细菌感染进程中,环鸟苷二磷酸(cyclic diguanylate monophosphate,

c-di-GMP)作为一种新型第二信使,参与调控各种复杂的细胞活动,如生物膜形成、毒力因子释放、运动性、细胞分化及感染过程中的免疫调节等^[3],其中严格受信号调控的生物膜形成过程是使铜绿假单胞菌具备较强耐药性的重要原因。c-di-GMP的合成是由具有高度保守的氨基酸序列 GGDEF (Gly-Gly-Asp-Glu-Phe)结构域的二鸟苷酸环化酶催化2分子的GTP进行的^[4]。据报道,铜绿假单胞菌感染导致的继发性院内感染可致严重烧伤病人死亡,其致病性与胞内c-di-GMP调控的各类表型密切相关^[5]。因此,基于c-di-GMP浓度变化对生物膜的调控作用,阐明c-di-GMP在铜绿假单胞菌中的代谢过程,能够为解决生物膜形成导致铜绿假单胞菌耐药性增强且难以根除的问题提供新的思考角度和解决方法。

PA0847来自铜绿假单胞菌PAO1,是一个包含了GGDEF结构域的蛋白^[3]。本课题组之前的研究已经证实,PA0847 PAS-GGDEF蛋白具有二鸟苷酸环化酶活性,其活性位点(A-site)上的氨基酸是二鸟苷酸环化酶活性的关键,并且发现PA0847 PAS-GGDEF虽然能够与c-di-GMP结合,但是由产物抑制位点(I-site)导致的活性减弱效应并不明显^[6],这一现象提示,PA0847有望作为制备大量c-di-GMP的生物工

具来源。研究表明,c-di-GMP可以作为免疫调节剂、免疫增强剂、免疫治疗、免疫预防或疫苗佐剂在人类和动物的临床上使用^[7-8]。鉴于c-di-GMP的潜在应用价值^[6],我们尝试对其进行改造以提高催化活性,用于生物合成,并初步探讨其产物抑制效应较低的机制,为进一步研究PA0847在c-di-GMP信号通路中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

克隆菌株[大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α]感受态细胞、表达菌株[*E. coli* BL21(DE3)]感受态细胞与pET-32a(+)质粒由本实验室保存。引物序列见表1,引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 主要试剂和仪器

Trans 100 bp Plus DNA Marker、Protein Marker,北京全式金生物技术有限公司;Q5 DNA聚合酶、T4 DNA Ligase、*Hind* III、*Bam*H I、*Dpn* I,安诺伦(北京)生物科技有限公司;胰蛋白酶、酵母提取物、NaCl、咪唑、异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷(isopropyl β -D-thiogalactoside, IPTG)、三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、氨苄青霉

表1 野生型及突变体引物序列

Table 1 Wild-type and mutant primer sequences

Primer	Sequences (5'→3')
PA0847 GGDEF-F	CGCGGATCCCAGATCGCCTACCAGCAGCAATTG
PA0847 GGDEF-R	TAGCAAGCTTTTCAGGCTGGCGCCTGGTAC
PA0847 PAS-GGDEF-F	CGGATCCCGCGACCGGGCGATCCTCCAGT
PA0847 PAS-GGDEF-R	TAGCAAGCTTTTCAGGCTGGCGCCTGGTAC
PA0847 PAS-GGDEF_Y700A-F	AGCATCGGCATCGCTCTCGCACCGCGGCATGC
PA0847 PAS-GGDEF_Y700A-R	GCCGGCATGCCGCGGTGCGAGAGCGATGCC
PA0847 PAS-GGDEF_Y700W-F	AGCATCGGCATCGCTCTCTGGCCGCGGCATGC
PA0847 PAS-GGDEF_Y700W-R	GCCGGCATGCCGCGGCCAGAGAGCGATGCC

素(ampicillin, Amp)、 β -巯基乙醇、刚果红、考马斯亮蓝 G250、 $MgCl_2$ ，生工生物工程(上海)股份有限公司；琼脂粉，北京索莱宝科技有限公司；GTP、c-di-GMP 标准品及噻唑橙，Merck 公司；High Affinity Ni-NTA Resin，南京金斯瑞生物科技有限公司；质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒，天根生化科技(北京)有限公司。

电泳仪、凝胶成像仪和 PCR 仪，Bio-Rad 公司；高速冷冻离心机，Eppendorf 公司；蛋白质液相色谱仪、凝胶过滤层析柱，GE HealthCare 公司；酶标仪，珀金埃尔默企业管理(上海)有限公司；选择 T7 作为测序引物，由北京擎科生物科技股份有限公司经 Sanger 技术完成测序验证。

1.3 载体构建与蛋白表达纯化

PA0847 基因 GGDEF 及 PAS-GGDEF 结构域序列 PCR 扩增：根据 PA0847 胞内结构域的基因序列设计引物。用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切目的片段并与载体 pET-32a(+)使用 T4 DNA Ligase 在 20 °C 连接过夜后转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞。PA0847 基因 PAS-GGDEF 结构域序列单个氨基酸突变：使用突变位点引物，以 PA0847 基因 PAS-GGDEF 结构域重组质粒为模板进行 PCR，产物通过琼脂糖凝胶回收试剂盒回收，回收产物经 *Dpn*I 消化去除模板，热激法转化入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞。将验证成功的重组质粒转入 *E. coli* BL21(DE3)并优化表达条件。PA0847 胞内蛋白及其突变体重组蛋白诱导表达的最适条件：IPTG 浓度为 0.05 mmol/L，诱导温度为 20 °C，诱导时间 14–16 h。诱导表达后的菌液经 4 °C、4 000 r/min 离心 20 min，弃去上清，吸取适量裂解液(20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 1.4 mmol/L β -巯基乙醇, 10 mmol/L 咪唑, pH 8.0)充分重悬沉淀，进行细胞压力破碎，4 °C、18 000 r/min 离心 40 min

分离上清与沉淀。

含 PA0847 蛋白的上清进行 Ni-NTA 纯化操作：将含有目的蛋白的上清经 0.22 μ m 微孔滤膜过滤后，与用 Binding buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 1.4 mmol/L β -巯基乙醇, 5 mmol/L 咪唑, pH 8.0)平衡好的重力镍柱介质用 Washing buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 1.4 mmol/L β -巯基乙醇, 50 mmol/L 咪唑, pH 8.0)充分洗去杂蛋白，收集漂洗液。用适量 Elution buffer (20 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 1.4 mmol/L β -巯基乙醇, 500 mmol/L 咪唑, pH 8.0)洗脱目的蛋白。洗脱的目的蛋白封装于透析袋(截留分子量为 3 000–14 000 Da)中，以 1:30 (体积比)的比例加入 TEV 蛋白酶，在 3 L 透析液(50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0)中于 4 °C 进行过夜透析及酶切，酶切后的蛋白溶液经 4 °C、18 000 r/min 离心 30 min 去除沉淀后进一步经镍柱纯化。

1.4 凝胶分子筛分析蛋白聚集状态

Superdex 75 凝胶层析色谱柱经 1 倍柱体积的缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0)平衡后，将 5 mL 经 Ni-NTA 纯化后的蛋白样品上样分离检测。将图谱输出为 cvs 格式文件，导入 GraphPad Prism 10.0.2 中进行可视化处理，得到洗脱峰位置，相应的表现分子量由凝胶层析色谱柱标准图谱大致估算。

1.5 噻唑橙荧光染色鉴定 PA0847 蛋白鸟苷酸环化酶活性

噻唑橙荧光染色：于 1.5 mL EP 管中，依次加入 600 μ L 不同浓度的蛋白溶液(buffer 成分为 20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0)、10 mmol/L $MgCl_2$ 、200 μ mol/L GTP，轻柔颠倒混匀后，于 37 °C 摇床 200 r/min 反应 1 h。将上述酶促反应体系进行 95 °C 水浴加热 15 min，室温放置 15 min，室温 12 000 r/min 离心 10 min，

吸取 160 μL 离心后上清至避光 96 孔板中, 设 3 个复孔。在避光 96 孔板中分别加入终浓度为 1 mol/L 的 NaCl、30 $\mu\text{mol/L}$ 的噻唑橙, 终体积为 200 μL , 将 96 孔板放置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜, 设置激发光波长为 508 nm, 发射波长为 533 nm 进行测定。测量前混匀 30 s, 数据间距 1 nm; 扫描速度 50 nm/min; 响应 8 s; 带宽 1 nm。测量最适温度为 10 $^{\circ}\text{C}$ ($n=3$)。将荧光强度数据导入 GraphPad Prism 10.0.2, 使用 Student's t test 检验不同蛋白浓度, 野生型与突变体之间的荧光强度数值是否存在显著性差异, ****表示 $P<0.0001$ 。柱状图中数值为平均值 \pm 标准误差 (standard error, SE)。

1.6 刚果红平板染色法间接检测胞内 c-di-GMP 水平

配制 20 mg/mL 的刚果红考马斯亮蓝贮液备用。配制刚果红固体培养基 121 $^{\circ}\text{C}$ 湿热灭菌使琼脂糖溶解, 待冷却后加入刚果红和考马斯亮蓝(终浓度分别为 40 $\mu\text{g/mL}$ 和 10 $\mu\text{g/mL}$), 倒入培养皿, 待其凝固冷却。吸取 2 μL 1:100 稀释后诱导培养的菌液, 滴在含有刚果红和考马斯亮蓝的固体培养基表面, 于 30 $^{\circ}\text{C}$ 正置培养约 3 d, 并观察照相^[9]。

1.7 质谱检测

采用三重四极杆质谱仪(Allen-Bradley 公司)进行 c-di-GMP 标准品及样品管产物鉴定。质谱条件: 电喷雾离子源, 采用负离子模式检测, 毛细管电压为 -4 500 V, 气帘气为 10 unit, 离子源雾化器为 14 unit, 去簇能量为 -90 eV, 蠕动泵流速为 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ 。用 50% 甲醇-水溶液清洗管路, 去离子水将 c-di-GMP 标准品稀释 10 倍, 样品稀释 100 倍, 混匀后, 分别通过蠕动泵上样。

1.8 计算机辅助分析 PA0847 PAS-GGDEF 结构模型

PA0847 结构域通过 uniprot 平台(<https://www.uniprot.org/>)进行预测。PA0847 PAS-GGDEF 二聚体的结构模型预测: 将 PA0847 PAS-GGDEF 的氨基酸序列输入 github 平台上的 AlphaFold2 (<https://colab.research.google.com/github/sokrypton/ColabFold/blob/main/AlphaFold2.ipynb>)获得 PA0847 PAS-GGDEF 的二聚体结构模型。

PA0847 PAS-GGDEF 与配体复合模型的获得: 根据已报道及前期实验确认的相互作用氨基酸残基^[6]作为模糊约束(ambiguous interaction restraints, AIRs), 小分子和作为约束的氨基酸残基均设置为 fully flexible, 使用 HADDOCK2.2 分别对接出 GTP、c-di-GMP 与 PA0847 PAS-GGDEF 二聚体结合的 1 000 个初始复合模型, 从其中挑选 100 个进一步细化, 最后选择溶剂为水来优化的 10 个收敛结构作为复合模型; 结构模型的可视化通过 Pymol 进行。

PA0847 PAS-GGDEF 与配体复合模型的获得: 根据已报道及前期实验确认的相互作用氨基酸残基^[6]作为模糊约束(ambiguous interaction restraints, AIRs), 小分子和作为约束的氨基酸残基均设置为 fully flexible, 使用 HADDOCK2.2 分别对接出 GTP、c-di-GMP 与 PA0847 PAS-GGDEF 二聚体结合的 1 000 个初始复合模型, 从其中挑选 100 个进一步细化, 最后选择溶剂为水来优化的 10 个收敛结构作为复合模型; 结构模型的可视化通过 Pymol 进行。

2 结果与分析

2.1 PA0847 含 GGDEF 结构域蛋白的二鸟苷酸环化酶活性验证

针对 PA0847 的结构域预测显示, 其胞外域两端分别为一个跨膜螺旋结构, 胞内由一个 PASPAC-GGDEF 结构域紧跟着一个 HAMP 结构域组成^[10-11]。为研究 PA0847 的 c-di-GMP 代谢活性, 本研究构建了 PAS、GGDEF 和 PAS-GGDEF 这 3 种胞内域的重组载体, 如图 1A 所示。鉴于刚果红染色法能够间接检测胞内 c-di-GMP 的水平, 其染色程度与胞内 c-di-GMP 水平呈正相关, 通过刚果红平板染色实验初步确认了 PA0847 GGDEF 和 PA0847 PAS-GGDEF 均具有二鸟苷酸环化酶活性。如图 1B 所示, 与转入空载体的大肠杆菌相比, 高表达 PA0847 GGDEF、PA0847 PAS-GGDEF 结构域的大肠杆菌明显红染更深, 可见胞内 c-di-GMP 明显升高。为进一步确认细胞红染是胞内 c-di-GMP 水平升高引起的表型,

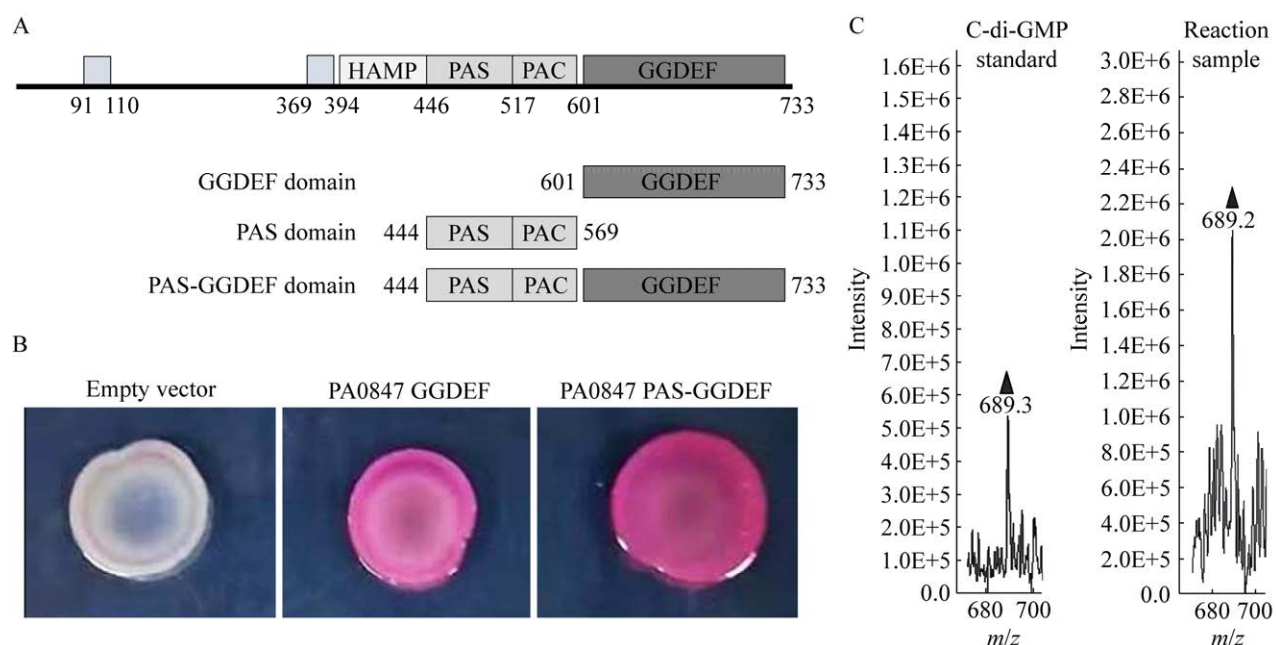


图 1 PA0847 含 GGDEF 的胞内结构域二鸟苷酸环化酶活性验证 A: PA0847 结构域预测. 标示了不同的结构域的氨基酸序号, 浅蓝色处显示预测的跨膜螺旋. B: 通过刚果红平板法检测 2 个在大肠杆菌中过表达的 PA0847 蛋白二鸟苷酸环化酶活性(PA0847 GGDEF 和 PA0847 PAS-GGDEF). C: MS 检测 c-di-GMP 标准品(左)及 PA0847 PAS-GGDEF 蛋白反应产物样品(右)结果

Figure 1 Validation of di-guanosine cyclase activities of two intracellular GGDEF-containing domains. A: Domain prediction of PA0847 (<https://www.uniprot.org/>). The residue numbers of different domains are indicated. Two predicted transmembrane helices are shown in light blue. B: Congo red staining results of two recombinant PA0847 proteins (PA0847 GGDEF and PA0847 PAS-GGDEF) expressed in *Escherichia coli*. The vector pET-32a(+) is used as a negative control. C: Results of c-di-GMP standard (left) and samples after PA0847 PAS-GGDEF protein participation reaction (right) by MS.

对 PA0847 PAS-GGDEF 参与的体外酶促反应产物进行了质谱检测^[12] (图 1C)。该结果进一步证实反应生成物为 c-di-GMP, PA0847 PAS-GGDEF 结构域重组蛋白具有鸟苷酸环化酶活性, 能够在体外催化 GTP 生成 c-di-GMP。

2.2 PA0847 PAS-GGDEF 的二鸟苷酸环化酶活性依赖于二聚体的形成

与各类已报道的二鸟苷酸环化酶研究一致, 本研究发现, 二聚体的形成与催化活性密切相关。利用不同浓度纯化后的蛋白(图 2A、2B)进行体外酶促反应, 再经噻唑橙荧光染色法定

量检测 c-di-GMP 水平的结果见图 2C。底物水平相同时, 随着 PA0847 PAS-GGDEF 蛋白的浓度增加, 以该浓度下反应后检测到 c-di-GMP 水平正相关的荧光值依次显著增强, 同时, 经凝胶过滤层析检测的蛋白聚集状态也显示逐渐有更多的二聚体形成(图 3C、3E)。此外, 高浓度的 GGDEF 结构域蛋白也具有可检测的二鸟苷酸环化酶活性(图 2C), 这一结果进一步验证了二聚体在催化活性中的作用, 推测可能由于蛋白浓度的升高, GGDEF 结构域蛋白分子在溶液中的“碰撞机遇增大”, 导致部分具有活性的二聚体形成。

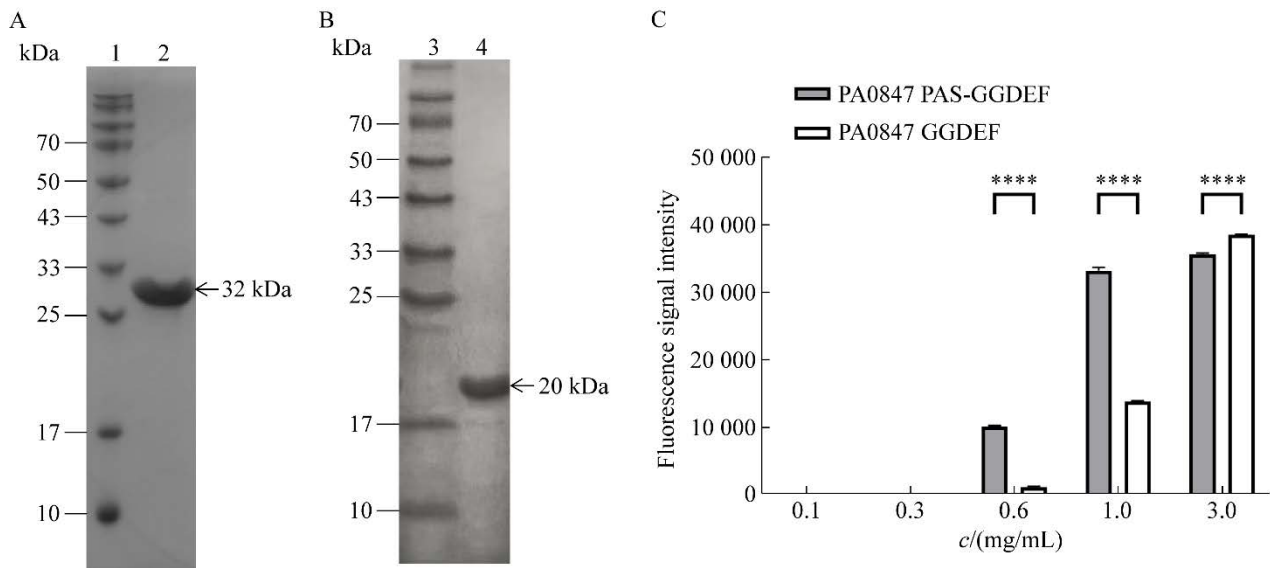


图2 通过噻唑橙荧光测定分析 PA0847 PAS-GGDEF 和 PA0847 GGDEF 的二鸟苷酸环化酶活性 A: 纯化后的 PA0847 PAS-GGDEF 蛋白的 SDS-PAGE 图. 泳道 1: 标准蛋白; 泳道 2: 纯化后的 PA0847 PAS-GGDEF 蛋白. B: 纯化后的 PA0847 GGDEF 蛋白的 SDS-PAGE 图. 泳道 3: 标准蛋白; 泳道 4: 纯化后的 PA0847 GGDEF 蛋白. C: 通过噻唑橙荧光测定分析 PA0847 PAS-GGDEF 和 PA0847 GGDEF 的二鸟苷酸环化酶活性. 误差线代表标准误差(SE), 采用 *t* 检验分析检验是否存在显著差异($n=3$), ****: $P<0.0001$

Figure 2 Di-guanylate cyclase activity of PA0847 PAS-GGDEF and PA0847 GGDEF analyzed by thiazole orange fluorescence assay. A: SDS-PAGE of purified PA0847 PAS-GGDEF protein. Lane 1: Protein marker; Lane 2: Purified PA0847 PAS-GGDEF protein. B: SDS-PAGE of purified PA0847 GGDEF protein. Lane 3: Protein marker; Lane 4: Purified PA0847 GGDEF protein. C: Di-guanylate cyclase activity of PA0847 PAS-GGDEF and PA0847 GGDEF analyzed by thiazole orange fluorescence assay. Error bars represent standard error (SE), and Student's *t* test was used to test for significant differences ($n=3$), ****: $P<0.0001$.

2.3 PAS 结构域促进了 PA0847 胞内蛋白的二聚体形成

我们之前的研究已经发现, 在较低浓度下, PA0847 PAS-GGDEF 在体内外均具有明显的二鸟苷酸环化酶活性, 而单独的 GGDEF 的体外二鸟苷酸环化酶活性并不明显。我们猜测, 邻近的 PAS 结构域可能发挥了特定的辅助功能。为了探讨 PAS 域在 PA0847 PAS-GGDEF 二鸟苷酸环化酶活性中的作用, 我们比较了相同浓度下单独的 PAS 结构域、单独的 GGDEF 结构域以及 PAS-GGDEF 结构域在溶液中的聚集状态

(图 3A–3C)。由凝胶过滤层析结果可见, PAS 结构域表现为具有 3–4 个聚集状态, 洗脱峰位置于 73 mL 的计算得出的表观分子量大概为 22 kDa, 至少是以二聚体存在。然而, 在蛋白纯化过程中发现, 大部分单独的 PAS 域蛋白以包涵体形式表达, 可见其不稳定或具有明显的聚集倾向。而高浓度的 GGDEF 域蛋白最多维持在二聚状态(图 3D), 与之相对的, 高浓度的 PAS-GGDEF 域还有三聚体存在(图 3E)。鉴于 PAS 域的聚集趋势, 认为其可能是 PAS-GGDEF 域蛋白在较低浓度下的活性远大于单独 GGDEF 的原因。

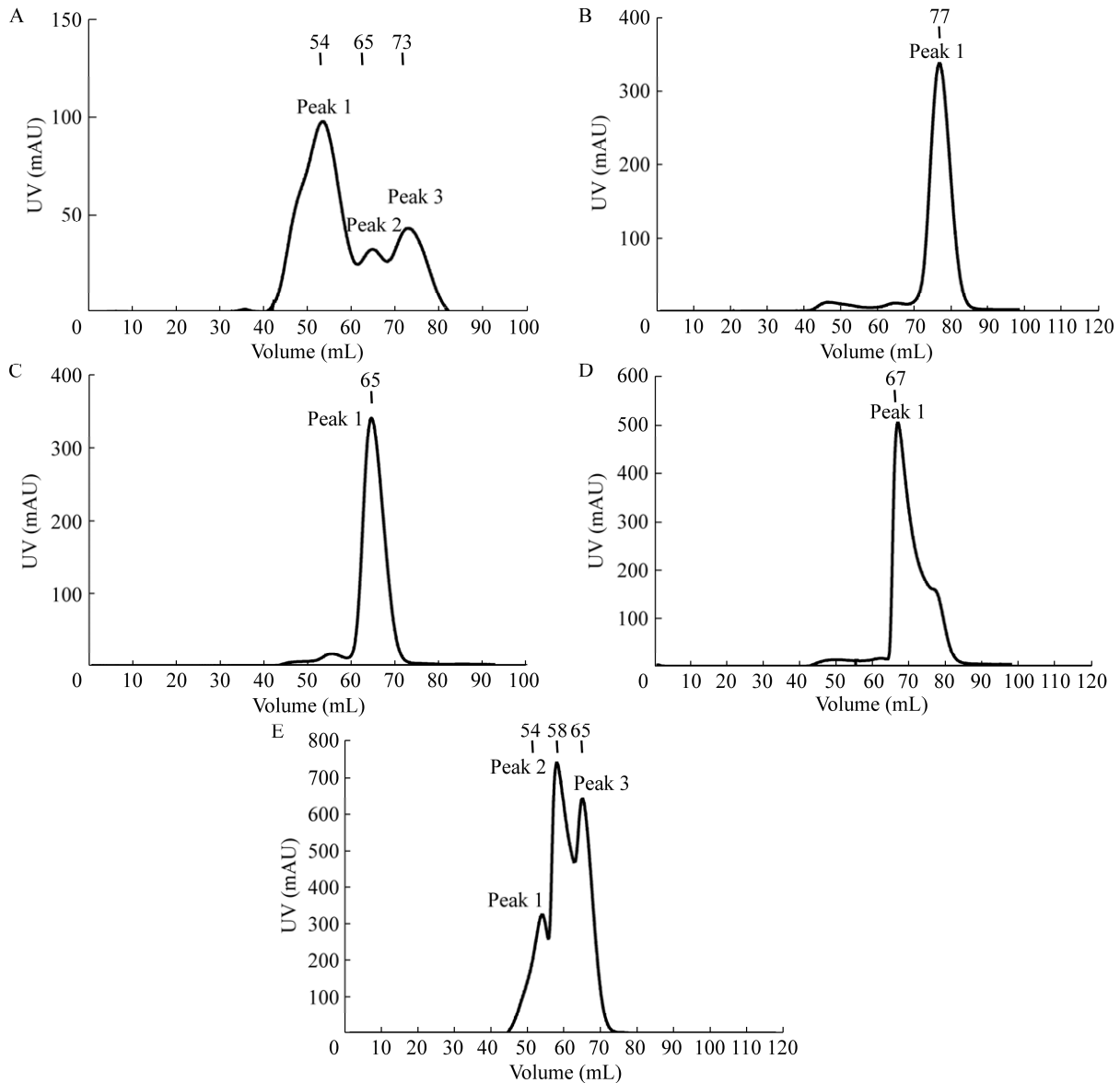


图 3 通过凝胶过滤分析溶液中 PA0847 PAS、PA0847 GGDEF 和 PA0847 PAS-GGDEF 的组装状态
 A: 低浓度 PA0847 PAS 分子筛图. 峰 1、峰 2、峰 3 大致对应表观分子量分别为 99、33、22 kDa. B: 低浓度 PA0847 GGDEF 分子筛凝胶图. 峰 1 大致对应表观分子量为 20 kDa. C: 低浓度 PA0847 PAS-GGDEF 分子筛凝胶图. 峰 1 大致对应表观分子量为 32 kDa. D: 高浓度 PA0847 GGDEF 分子筛凝胶图. 峰 1 大致对应表观分子量为 40 kDa. E: 高浓度 PA0847 PAS-GGDEF 分子筛凝胶图(~ 10 mg/mL). 峰 1、峰 2、峰 3 大致对应表观分子量分别为 96、64、32 kDa

Figure 3 Assembly states of PA0847 PAS, PA0847 GGDEF, and PA0847 PAS-GGDEF in solution analyzed by gel filtration. A: PA0847 PAS in low concentration (~ 3.5 mg/mL). Peak 1, peak 2, and peak 3 correspond to apparent molecular weights of 99, 33, and 22 kDa, respectively. B: PA0847 GGDEF in low concentration (~ 3.5 mg/mL). Peak 1 at ~ 20 kDa. C: PA0847 PAS-GGDEF in low concentration (~ 3.5 mg/mL). Peak 1 at ~ 32 kDa. D: GGDEF in high concentration (~ 10 mg/mL). Peak 1 at ~ 40 kDa. E: PA0847 PAS-GGDEF in high concentration (~ 10 mg/mL). Peak 1, peak 2, and peak 3 correspond to apparent molecular weights of approximately 96, 64, and 32 kDa, respectively.

2.4 Y700A 点突变提高 PA0847 蛋白的二鸟苷酸环化酶活性

为了探讨 PA0847 PAS-GGDEF 结构域催化 c-di-GMP 的合成机制, 将其与已报道的二鸟苷酸环化酶进行了序列比对分析, 结果发现包括活性中心 GGDEF 在内的、涉及 GTP 结合的多个氨基酸位点, 即 D609、L610、R612、K614、N617、H622、D626、L629、D652、R648、K722 具有很强的保守性, 提示其均为环化酶活性所必需。此外, 由 RxxD (R641, D644) 构成的产物抑制位点也具有较强的保守性(图 4)。

为了进一步分析比较 PA0847 的二鸟苷酸环化酶活性, 在 Mg^{2+} 存在条件下^[6]进行体外催化反应。基于噻唑橙的荧光信号进行检测^[18], 结果显示, 活性中心附近的氨基酸位点突变, 会导致

PA0847 PAS-GGDEF 二鸟苷酸环化酶活性的完全丧失, 而产物抑制位点上氨基酸的突变对活性影响则较为有限^[6]。另外, 对可能提高 PA0847 PAS-GGDEF 二鸟苷酸环化酶活性的一些位点进行的突变, 在蛋白浓度 0.3 mg/mL 下(该蛋白浓度下的 PA0847 PAS-GGDEF WT 远未达到发挥酶活所需的二聚浓度), 大多突变体都和野生型蛋白一样未显现出明显的二鸟苷酸环化酶活性, 非活性中心突变体 Y700A 不仅表现出了明显二鸟苷酸环化酶活性, 而且在低浓度下的活性远高于野生型(图 5)。具体来说, 在 0.3 mg/mL 的较低浓度下, Y700A 突变体参与的体外酶促反应获得的 c-di-GMP 水平约是野生型的上百倍, 推测 Y700 可能间接参与了 PA0847 PAS-GGDEF 催化作用。由 Y700A 与野生型蛋白的分子筛图

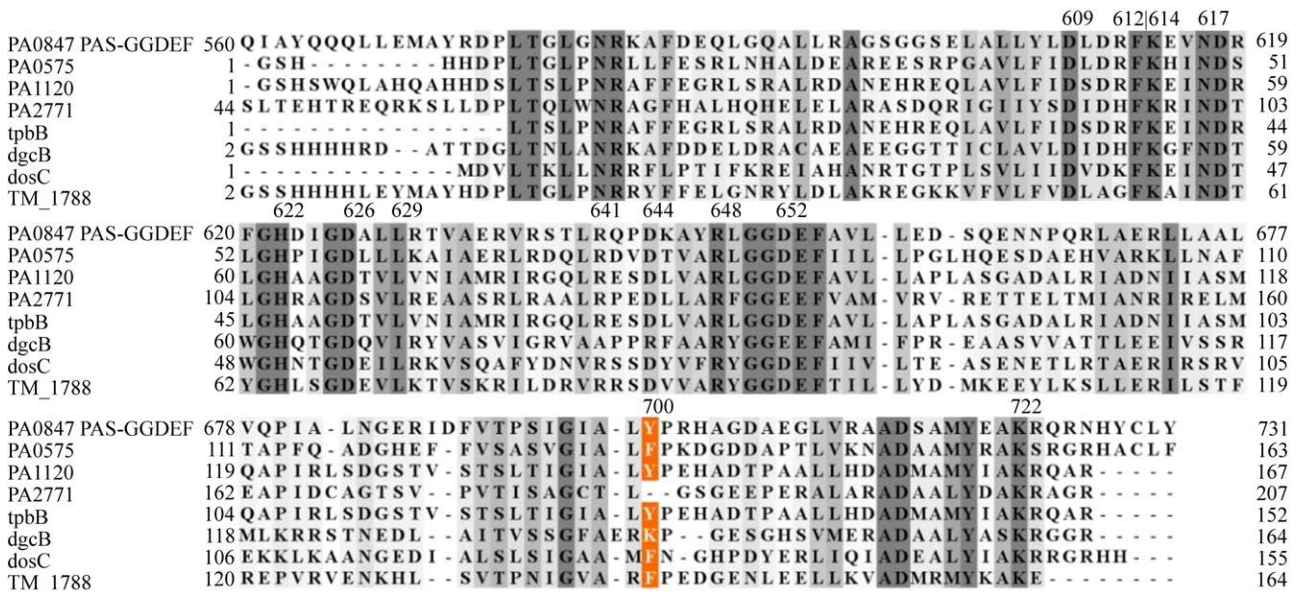


图 4 PA0847 PAS-GGDEF 与已知结构的二鸟苷酸环化酶序列比对

Figure 4 Sequences comparison between PA0847 PAS-GGDEF with di-guanosine cyclase with known structures. PA0575 (PDB ID: 5M3C^[13]) from *Pseudomonas aeruginosa*, PA1120 (PD ID: 7A7E^[14]) from *Pseudomonas aeruginosa*, PA2771 (PDB ID: 4ZMM) from *Pseudomonas aeruginosa*, tpbB (PDB ID: 4IOB^[15]) from *Pseudomonas aeruginosa*; dgcB (PBD ID: 6TTS) from *Caulobacter vibrioides*, dosC (PDB ID: 4ZVH^[16]) from *Escherichia coli*, and TM_1788 (PD ID: 4URS^[17]) from *Thermotoga maritima*. Conserved residues are highlighted in grey and Y700 in orange. Key residues involved in cyclase activity are labeled above the sequences.

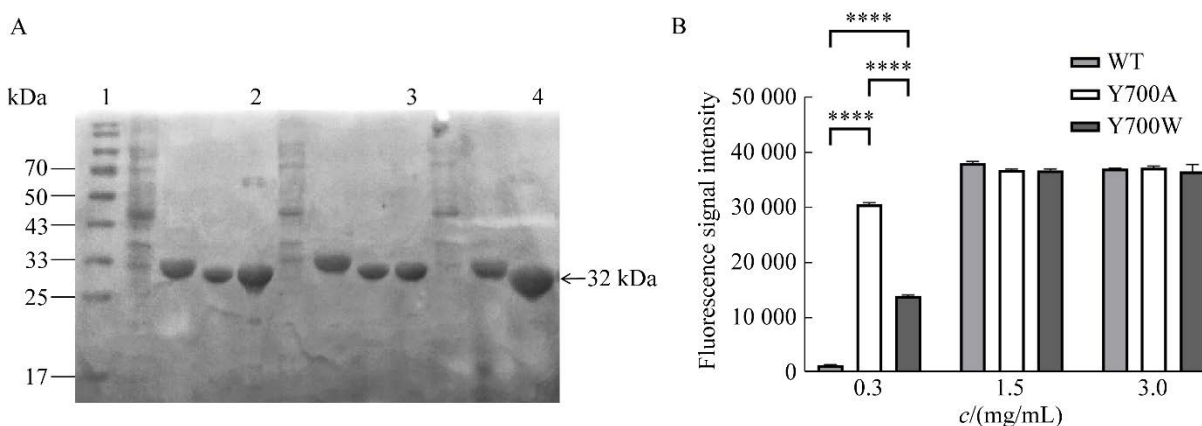


图 5 通过噻唑橙荧光测定分析 PA0847 PAS-GGDEF WT 和突变体(Y700A 和 Y700W)的二鸟苷酸环化酶活性 A: 纯化蛋白的 SDS-PAGE 图. 泳道 1: 标准蛋白; 泳道 2: PA0847 PAS-GGDEF WT 蛋白; 泳道 3: Y700A 蛋白; 泳道 4: Y700W 蛋白. B: 使用噻唑橙荧光测定法分析 PA0847 PAS-GGDEF WT 和突变体的二鸟苷酸环化酶活性. 误差线代表标准误差(SE), 采用 *t* 检验分析检验是否存在显著差异($n=3$), ****: $P<0.0001$

Figure 5 Di-Guanylate cyclase activity of PA0847 PAS-GGDEF WT and mutants (Y700A and Y700W) analyzed by thiazole orange fluorescence assay. A: SDS-PAGE of purified proteins. Lane 1: Protein marker; Lane 2: PA0847 PAS-GGDEF WT protein; Lane 3: Y700A protein; Lane 4: Y700W protein. B: Analysis of di-guanylate cyclase activity of PA0847 PAS-GGDEF WT and mutants using thiazole orange fluorescence assay. Error bars represent standard error (SE) and Student's *t* test was used to test for significant differences ($n=3$), ****: $P<0.0001$.

谱可见(图 6), Y700A 在低浓度下的洗脱峰位置较野生型靠前, 表明其更易于形成二聚体, 这可能是 Y700A 活性更高的原因。

2.5 PA0847 PAS-GGDEF 及其配体的结构模型分析

想要深入研究 PA0847 PAS-GGDEF 的催化机制, 仍然需要原子水平的结构分析, 由于并未获得蛋白晶体, 本研究采用 AlphaFold 预测了其结构模型^[19] (图 7A), 试图从结构上解释 Y700A 突变显著提高 PA0847 PAS-GGDEF 酶活性的原因。在其同源序列中, PA3702 (WspR) 具有二鸟苷酸环化酶活性^[20], 与 PA0847 PAS-GGDEF 序列相似性为 41.07%, 已报道的结合了 c-di-GMP 的 WspR 为二聚体, 本研究预测的 PA0847 PAS-GGDEF 二聚体结构模型具有与 WspR 类

似的二聚体界面。

根据突变体活性分析, 获得了 PA0847 PAS-GGDEF 分别结合底物 GTP 及产物 c-di-GMP 的复合结构模型。由 GTP 结合的模型可见(图 7B), K722 的侧链向 GTP 分子的磷酸基团延伸, D609 及 D656 均参与了稳定 Mg^{2+} 的作用, 在 GTP 结合口袋的形成上发挥了重要的作用(这几个位点的作用均经过了实验验证)。在比较的一系列 PA0847 PAS-GGDEF 突变体蛋白中, 筛选到了 Y700A 的突变具有较高的活性(图 5)。根据复合物模型分析, 发现 Y700 并不直接参与 GTP 或 c-di-GMP 与蛋白的相互作用, 如图 7C、7D 所示, 2 个配体结合位置并未重叠, 并且无 Y700 直接参与。然而, 从 GTP 与 PA0847PAS-GGDEF 的结合模型上可见(图 7E),

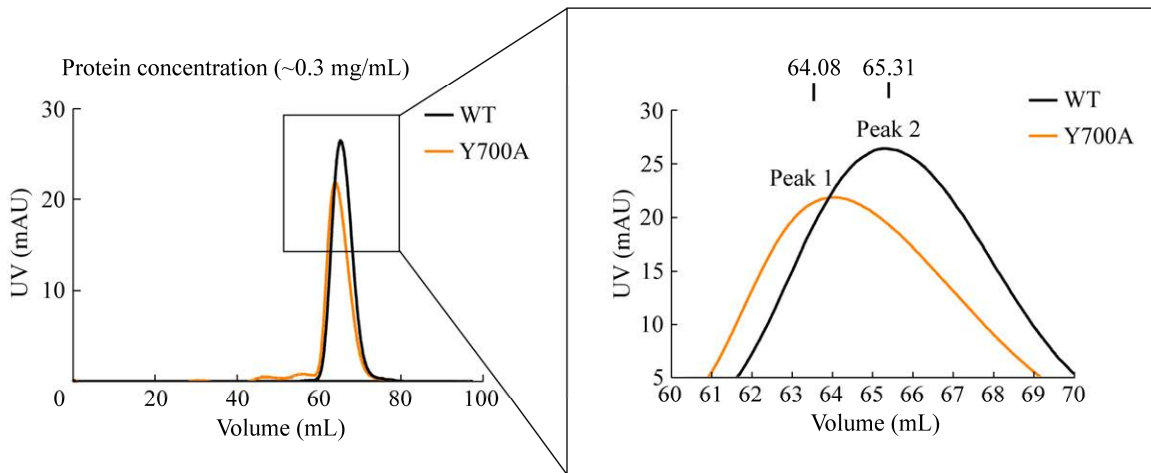


图 6 分子筛分析突变体 Y700A 对 PA0847 PAS-GGDEF 聚集的影响

Figure 6 Molecular sieve analysis of the effect of Y700A mutation on PA0847 PAS-GGDEF assembly. The expanded view highlights the differences in peak positions.

Y700 芳香环大侧链向邻近的 α 螺旋延伸与 L710 甲基侧链之间有疏水作用。当 Y700 突变为丙氨酸后, 可能改变 L710 和 K722 所在 α 螺旋的空间构象, 进而有利于 K722 与 GTP 的结合以及促进 GGDEF 二聚体的形成。同时, 分析 Y700 的序列保守性发现, 该位点大多是含大侧链且疏水的氨基酸(图 4)。结合现有结果, 推测这一位点的突变或有利于人工生物合成更多的 c-di-GMP, 而在细菌或植物体内, 该位点可能是二鸟苷酸环化酶调节 c-di-GMP 水平、维持细胞内稳态的关键氨基酸残基。

3 讨论与结论

铜绿假单胞菌作为一类条件致病菌, 因其受信号转导调控的生物膜形成而具有一定耐药性, 这个过程是由铜绿假单胞菌基因组中多个二鸟苷酸环化酶调节胞内 c-di-GMP 水平完成的^[2]。了解这个信号转导系统可能为铜绿假单胞菌的临床感染提供解决方案。此外, c-di-GMP 具有潜在且可观的医用价值, 对其进行高效的制备具有经济效益^[22]。本研究通过构建原核表

达载体的方法获得 PA0847 野生型及突变体蛋白, 并对其鸟苷酸环化酶活性进行了鉴定, 经凝胶分子筛层析分析了蛋白在溶液中的聚集状态, 从而确定了 PA0847 GGDEF 发挥二鸟苷酸环化酶所需聚集状态, 筛选出了 PA0847 GGDEF 结构域上参与催化 GTP 生成 c-di-GMP 的关键氨基酸 Y700, 并通过聚集状态及结构模型上分析突变体 Y700A 在较低浓度下具有的较高二鸟苷酸环化酶活性的可能原因, 对进一步研究含 GGDEF 结构域的 PA0847 参与 c-di-GMP 相关复杂信号通路机制奠定了基础。

本课题组之前的研究已验证了 PA0847 PAS-GGDEF 与 c-di-GMP 的体外相互作用^[6]。然而 PA0847 PAS-GGDEF 的产物抑制作用并不明显, 在本研究中, 随着蛋白浓度的增加, 产物水平增加, 说明二鸟苷酸环化酶活性逐步增强, 也得到了证实。在 c-di-GMP 结合模型中可以看到, c-di-GMP 位于 RXXD 基序附近, 其中, R641 可能参与了与 c-di-GMP 结合的主要作用, 从空间距离上看, D644 并未直接与 c-di-GMP 作用(图 7C), R672 和 R595 也可能参与了 c-di-GMP

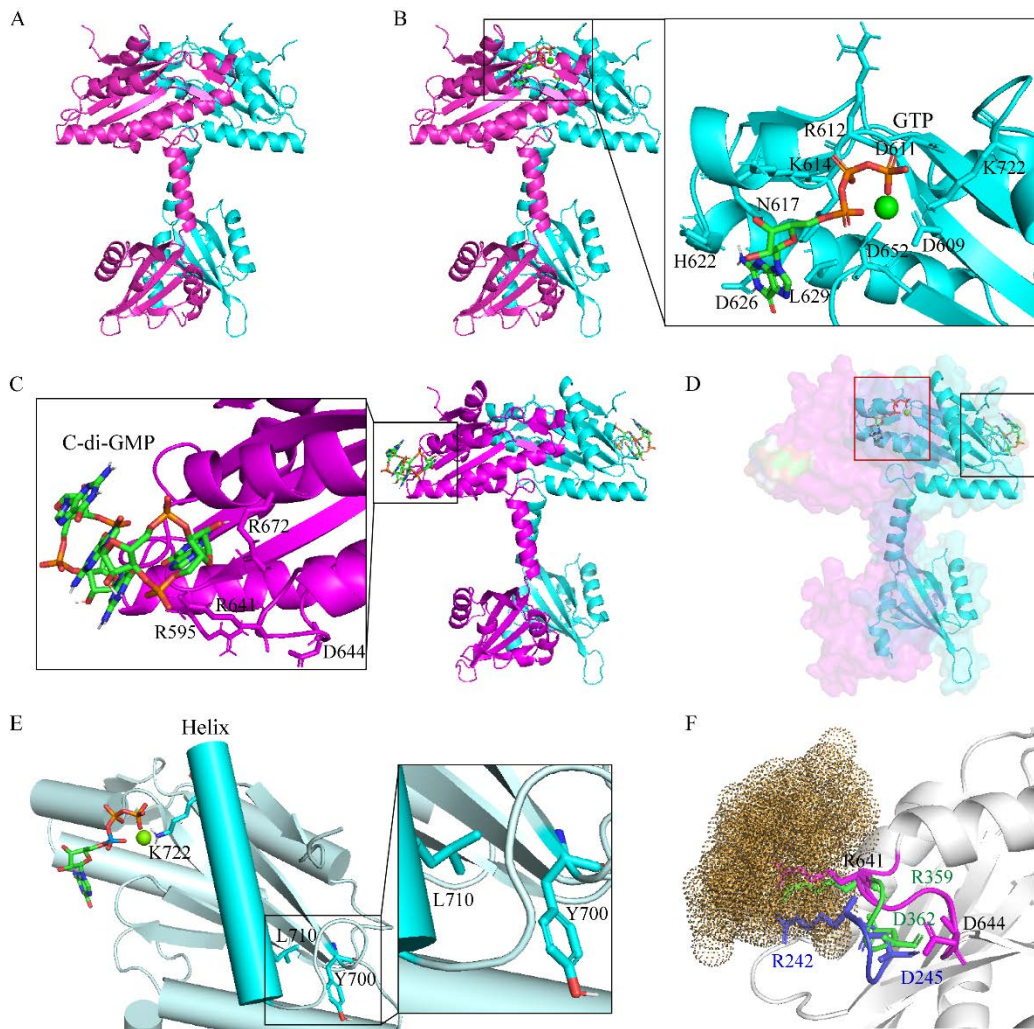


图 7 PA0847 PAS-GGDEF 的结构模型分析 A: 通过 AlphaFold^[19]预测获得的 PA0847 PAS-GGDEF 二聚体结构模型. B: 通过 HADDOCK2.2^[21]获得的 PA0847 PAS-GGDEF 二聚体结合 GTP 的复合物模型. C: 通过 HADDOCK2.2^[21]获得的 PA0847 PAS-GGDEF 二聚体结合 c-di-GMP 的复合物模型. D: PA0847 复合物模型中的 GTP 结合位点和 c-di-GMP 结合位点的比较, 其中 GTP 结合位点以红色虚线框表示, c-di-GMP 结合位点以黑色虚线框表示. E: Y700 和 L710 之间的疏水相互作用. GTP 结合的氨基酸残基 K722 与 L710 位于同一螺旋中. F: c-di-GMP 在不同 I 位点上的分析. c-di-GMP 用棕褐色圆点表示; PA0847 PAS-GGDEF 用玫红色表示, 其氨基酸序号用黑色表示; PleD 及其氨基酸编号用绿色表示; WspR 及其氨基酸编号用蓝色表示

Figure 7 Structural modeling analysis of PA0847 PAS-GGDEF. A: Structure model of PA0847 PAS-GGDEF dimer predicted by AlphaFold^[19]. B: Complex model of GTP-bound PAS-GGDEF dimer obtained by HADDOCK2.2 calculation^[21]. C: Complex model of c-di-GMP-bound PAS-GGDEF dimer obtained by HADDOCK2.2 calculation^[21]. D: The GTP-binding and c-di-GMP-binding sites of PA0847 PAS-GGDEF. GTP-binding site are shown in red dashed boxes and the c-di-GMP-binding in black dashed boxes. E: Hydrophobic interaction between Y700 and L710. GTP-binding residue K722 is located in the same helix as residue L710. F: Analysis of c-di-GMP on different I-sites. For clarity, all c-di-GMP molecules are shown in tan dots. The I-sites of PA0847 PAS-GGDEF, PleD, and WspR are colored in pink, green, and blue, respectively.

的结合(之前的结果显示该2个氨基酸突变后催化活性并未降低)。我们将 PA0847 PAS-GGDEF 与 PleD (PDB ID: 2V0N)、WspR (PDB ID: 3BRE) 的复合物结构进行了对比^[23]。由图 7F 可见, 在 c-di-GMP 结合的 RXXD 无序环上, 各氨基酸的位置基本一致, 三者的 R 都参与了 c-di-GMP 末端磷酸基团的结合, PleD 和 WspR 的 D 也向 c-di-GMP 延伸, 参与了稳定 c-di-GMP 的作用, 其后紧跟着一个 β 折叠结构, 而 PA0847 PAS-GGDEF 的 D644 却比较“游离”, 并未向 c-di-GMP 延伸, 其后仍有较长的一段无规卷曲, 这一差异可能解释了 PA0847 PAS-GGDEF 蛋白的产物抑制现象并不明显的原因。

对于 PA0847 蛋白的研究, 在了解其生物学作用的情况下, 研究其作用机制是很有必要的。由于 c-di-GMP 在细菌体内发挥着调节各类表型的作用, 又具有临床作为免疫调节剂的潜在作用^[22,24], 因此, 有很多学者开始致力于对它进行体外合成。我们先前的研究发现 PA0847 能够催化合成 c-di-GMP, 其二鸟苷酸环化酶活性并未受产物反馈抑制的明显影响。与具有产物反馈抑制的 GGDEF 结构域比较, Y700 的出现可改变抑制位点的构象, 进而减弱产物的结合力。在本研究中进一步将 Y700 做其他突变, 发现 Y700A 可能间接改变活性位点的构象, 进而促进 K722 与 GTP 的结合以及 GGDEF 二聚体的形成。对于筛选出的高二鸟苷酸环化酶活性突变体 Y700A, 蛋白浓度 0.3 mg/mL 时在一定时间内产生的 c-di-GMP 是野生型的上百倍。现如今 c-di-GMP 的体外合成主要分为化学合成以及酶法制备, 然而, 化学合成具有环境污染、终产物纯度低、设备要求高、生产成本低、合成过程可控性差等问题^[25]。在酶法合成中, 相较于其他二鸟苷酸环化酶, 本研究中的

PA0847 PAS-GGDEF Y700A 表现出较高的催化活性以及低的底物抑制性^[26]。若进一步深入研究其作用方式, 将有助于进一步优化 c-di-GMP 体外合成工艺, 获得高产、高纯度的 c-di-GMP, 应用于疾病治疗和基础研究。

近年来, 越来越多的文献报道, 不同蛋白能够感应不同的信号, 参与到细菌信号转导过程中, 并引起细胞表型的变化或参与感染进程^[27-28]。本课题组之前的研究已发现, 在 SDS、CaCl₂、蔗糖作用下, 野生型 PAO1 与突变型 PA0847 菌株生物膜合成差异具有统计学意义^[6], 这一现象提示 PA0847 蛋白参与到细菌胞外到胞内的信号转导过程, 它是如何感应并介导下游信号通路的变化还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] MATILLA MA, MARTÍN-MORA D, GAVIRA JA, KRELL T. *Pseudomonas aeruginosa* as a model to study chemosensory pathway signaling[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2021, 85(1): e00151-20.
- [2] KLOCKGETHER J, TÜMMLER B. Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen[J]. *F1000Research*, 2017, 6: 1261.
- [3] RÖMLING U, GALPERIN MY, GOMELSKY M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 2013, 77(1): 1-52.
- [4] WHITELEY CG, LEE DJ. Bacterial diguanylate cyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development[J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(1): 124-141.
- [5] THORMANN KM, DUTTLER S, SAVILLE RM, HYODO M, SHUKLA S, HAYAKAWA Y, SPORMANN AM. Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(7): 2681-2691.

- [6] ZHANG Y, GUO JY, ZHANG N, YUAN WS, LIN Z, HUANG WD. Characterization and analysis of a novel diguanylate cyclase PA0847 from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 655-665.
- [7] KARAOLIS DKR, NEWSTEAD MW, ZENG XY, HYODO M, HAYAKAWA Y, BHAN U, LIANG H, STANDIFORD TJ. Cyclic di-GMP stimulates protective innate immunity in bacterial pneumonia[J]. *Infection and Immunity*, 2007, 75(10): 4942-4950.
- [8] KARAOLIS DKR, MEANS TK, YANG D, TAKAHASHI M, YOSHIMURA T, MURAILLE E, PHILPOTT D, SCHROEDER JT, HYODO M, HAYAKAWA Y, TALBOT BG, BROUILLETTE E, MALOUIN F. Bacterial c-di-GMP is an immunostimulatory molecule[J]. *The Journal of Immunology*, 2007, 178(4): 2171-2181.
- [9] KAISER TDL, PEREIRA EM, dos SANTOS KRN, MACIEL ELN, SCHUENCK RP, NUNES APF. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2013, 75(3): 235-239.
- [10] KAY SA. PAS, present, and future: clues to the origins of circadian clocks[J]. *Science*, 1997, 276(5313): 753-754.
- [11] ANAYA S, ORILLARD E, GREER-PHILLIPS SE, WATTS KJ. New roles for HAMP domains: the tri-HAMP region of *Pseudomonas aeruginosa* Aer2 controls receptor signaling and cellular localization[J]. *Journal of Bacteriology*, 2022, 204(9): e0022522.
- [12] KAMEDA M, KANALY RA, HARADA M, AOKI S, TUKADA H, KUTSUNA S. Quantification of cyanobacterial cyclic di-guanosine monophosphate (c-di-GMP) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2022, 196: 106468.
- [13] MANTONI F, PAIARDINI A, BRUNOTTI P, D'ANGELO C, CERVONI L, PAONE A, CAPPELLACCI L, PETRELLI R, RICCIUTELLI M, LEONI L, RAMPIONI G, ARCOVITO A, RINALDO S, CUTRUZZOLÀ F, GIARDINA G. Insights into the GTP-dependent allosteric control of c-di-GMP hydrolysis from the crystal structure of PA0575 protein from *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *The FEBS Journal*, 2018, 285(20): 3815-3834.
- [14] MANTONI F, SCRIBANI ROSSI C, PAIARDINI A, di MATTEO A, CAPPELLACCI L, PETRELLI R, RICCIUTELLI M, PAONE A, CUTRUZZOLÀ F, GIARDINA G. Studying GGDEF domain in the act: minimize conformational frustration to prevent artefacts[J]. *Life*, 2021, 11(1): 31.
- [15] GIARDINA G, PAIARDINI A, FERNICOLA S, FRANCESCHINI S, RINALDO S, STELITANO V, CUTRUZZOLÀ F. Investigating the allosteric regulation of YfiN from *Pseudomonas aeruginosa*: clues from the structure of the catalytic domain[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e81324.
- [16] TARNAWSKI M, BARENDTS TRM, SCHLICHTING I. Structural analysis of an oxygen-regulated diguanylate cyclase[J]. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, 2015, 71(Pt 11): 2158-2177.
- [17] DEEPTHI A, LIEW CW, LIANG ZX, SWAMINATHAN K, LESCAR J. Structure of a diguanylate cyclase from *Thermotoga maritima*: insights into activation, feedback inhibition and thermostability[J]. *PLoS One*, 2014, 9(10): e110912.
- [18] NAKAYAMA S, KELSEY I, WANG JX, ROELOFS K, STEFANE B, LUO YL, LEE VT, SINTIM HO. Thiazole orange-induced c-di-GMP quadruplex formation facilitates a simple fluorescent detection of this ubiquitous biofilm regulating molecule[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(13): 4856-4864.
- [19] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596: 583-589.
- [20] DE N, PIRRUCCELLO M, KRASTEVA PV, BAE N, RAGHAVAN RV, SONDERMANN H. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase Wspr[J]. *PLoS Biology*, 2008, 6(3): e67.
- [21] van ZUNDERT GCP, RODRIGUES JPGLM, TRELLET M, SCHMITZ C, KASTRITIS PL, KARACA E, MELQUIOND ASJ, van DIJK M, de VRIES SJ, BONVIN AMJJ. The HADDOCK2.2 web server: user-friendly integrative modeling of biomolecular complexes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2016, 428(4): 720-725.
- [22] ISHIHARA Y, HYODO M, HAYAKAWA Y,

- KAMEGAYA T, YAMADA K, OKAMOTO A, HASEGAWA T, OHTA M. Effect of cyclic bis(3'-5')diguanylic acid and its analogs on bacterial biofilm formation[J]. FEMS Microbiology Letters, 2009, 301(2): 193-200.
- [23] WASSMANN P, CHAN C, PAUL R, BECK A, HEERKLOTZ H, JENAL U, SCHIRMER T. Structure of BeF3-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition[J]. Structure, 2007, 15(8): 915-927.
- [24] OGUNNIYI AD, PATON JC, KIRBY AC, McCULLERS JA, COOK J, HYODO M, HAYAKAWA Y, KARAOLIS DKR. C-di-GMP is an effective immunomodulator and vaccine adjuvant against pneumococcal infection[J]. Vaccine, 2008, 26(36): 4676-4685.
- [25] GRAJKOWSKI A, CIEŚLAK J, GAPEEV A, SCHINDLER C, BEAUCAGE SL. Convenient synthesis of a propargylated cyclic (3'-5') diguanylic acid and its "click" conjugation to a biotinylated azide[J]. Bioconjugate Chemistry, 2010, 21(11): 2147-2152.
- [26] RYAN RP, McCARTHY Y, ANDRADE M, FARAH CS, ARMITAGE JP, DOW JM. Cell-cell signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2010, 107(13): 5989-5994.
- [27] TAGUA VG, MOLINA-HENARES MA, TRAVIESO ML, NISA-MARTÍNEZ R, QUESADA JM, ESPINOSA-URGEL M, RAMOS-GONZÁLEZ MI. C-di-GMP and biofilm are regulated in *Pseudomonas putida* by the CfcA/CfcR two-component system in response to salts[J]. Environmental Microbiology, 2022, 24(1): 158-178.
- [28] HUTCHIN A, CORDERY C, WALSH MA, WEBB JS, TEWS I. Phylogenetic analysis with prediction of cofactor or ligand binding for *Pseudomonas aeruginosa* PAS and cache domains[J]. Microbiology Spectrum, 2021, 9(3): e0102621.