

c-di-GMP对铜绿假单胞菌生物被膜调控的研究进展

谷维璇*

(天津大学化工学院, 天津 300350)

摘要 铜绿假单胞菌生物被膜是由黏附于介质表面的细胞及其分泌的胞外物质组成的结构复杂的膜状聚集体。感染人体的铜绿假单胞菌在形成生物被膜后将具有更强的耐药性和免疫逃逸能力, 从而增加了治疗难度。生物被膜还可对医疗、食品、工业、农业等领域造成严重的危害, 因而了解生物被膜形成过程中的调控机制对预防生物被膜的形成具有深刻的意义。环二鸟苷酸(cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP)作为广泛存在于细菌中的第二信使, 参与调控了生物被膜的形成。基于此, 该文围绕生物被膜形成过程中细胞的运动行为、胞外多糖的表达以及生物被膜的扩散, 概述了近年来c-di-GMP对生物被膜调控的研究进展, 以为生物被膜的c-di-GMP防治提供理论依据。

关键词 铜绿假单胞菌; 环二鸟苷酸; 生物被膜; 运动性; 胞外多糖

Research Progress on Regulation of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm by c-di-GMP

GU Weixuan*

(School of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300350, China)

Abstract *Pseudomonas aeruginosa* biofilms are complex membrane-like aggregate consisting of surface-attached cells and extracellular substances secreted by them. *Pseudomonas aeruginosa* that infects human has stronger multi-drug resistance and immune escape ability than those planktonic cells after the formation of biofilms, which increase the difficulty of treatment. Meanwhile, biofilms can also cause serious harm to medical, food, industry, agriculture and other fields. Understanding the regulation mechanism during the formation of biofilm is of great significance to the prevention of biofilms. As a second messenger widely found in bacteria, c-di-GMP (cyclic diguanosine monophosphate) plays an important role in regulating the formation of biofilms. Therefore, this paper makes a summary on the research progress of the regulation of c-di-GMP on biofilms in recent years, focusing on bacterial motility, exopolysaccharide expression and biofilms diffusion during biofilm formation. Thereby, the paper provides theoretical basis for the prevention and control of biofilms through c-di-GMP.

Keywords *Pseudomonas aeruginosa*; c-di-GMP; biofilm; motility; extracellular polysaccharide

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, *P.aeruginosa*)是一种可以引发人体严重感染的条件致病菌。近年来铜绿假单胞菌的多重耐药性在急剧增强, 并被世界卫生组织列为对人类健康最严重的威胁之一。其致病性和耐药性的提高主要依赖于生

物被膜(biofilm)的形成。生物被膜是指细菌黏附于表面后, 通过其分泌的胞外物质将细胞包裹在其中从而形成的多细胞聚集膜状物^[1](图1)。自然界中的多数细菌主要以生物被膜的方式存在。生物被膜复杂且致密的结构作为抗生素屏障, 使生物被膜内的

收稿日期: 2020-05-26

接受日期: 2020-08-08

*通讯作者。Tel: 13582334519, E-mail: weixuan@tju.edu.cn

Received: May 26, 2020

Accepted: August 8, 2020

*Corresponding author. Tel: +86-13582334519, E-mail: weixuan@tju.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5419>

细胞对药物不敏感。另外,药物的不当使用甚至会促进生物被膜的形成。WEI等^[2]发现,患有糖尿病的小鼠在胰岛素治疗中,其伤口处铜绿假单胞菌的c-di-GMP含量提高并促进了生物被膜的形成,使伤口愈合变得缓慢。铜绿假单胞菌通过形成生物被膜的方式,逃避宿主的防御、生物杀灭剂以及抗生素的损伤,进而导致包括角膜炎、囊性纤维化和脑膜炎在内的多种疾病发生^[3],因而人们对生物被膜的关注程度逐年升高。

环二鸟苷酸(cyclic diguanosine monophosphate, c-di-GMP)作为调控生物被膜的关键组分,其调控作用涉及生物被膜形成过程的方方面面。基于此,本文综述了生物被膜形成过程中c-di-GMP对细胞的运动行为、胞外多糖的表达以及生物被膜扩散的调控作用,以期从c-di-GMP调控的角度寻找抑制生物被膜的有效途径。同时也对当前研究中存在的问题以及c-di-GMP未来的发展趋势与应用前景进行了讨论。

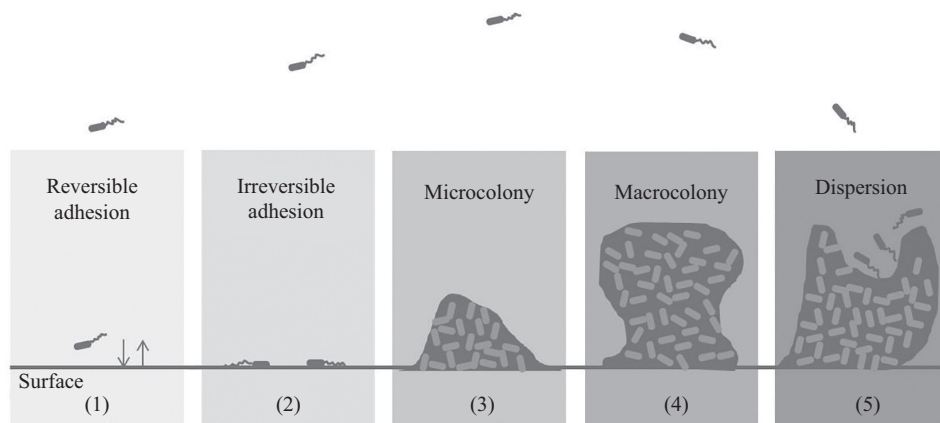
1 生物被膜的形成过程

作为研究生物被膜的模式菌株,铜绿假单胞菌生物被膜的发展主要包括以下五个步骤:(1)单个细胞可逆地黏附于表面;(2)细胞在表面形成不可逆黏附;(3)形成生物被膜的微菌落结构;(4)生物被膜发展成熟;(5)单细胞从生物被膜中脱离并寻找新的黏附位点(图1)。在生物被膜形成过程中,细胞的运动行为以及胞外多糖的表达扮演着举足轻重的角色^[4]。细胞的可逆与不可逆黏附以及从生物被膜中的脱离与运动行为十分相关,在微菌落的形成与成熟中以

多糖的研究较多^[5]。细胞的运动行为和胞外多糖的表达在生物被膜形成过程中是相互联系共同参与的。

2 c-di-GMP的调控与分布特点

c-di-GMP是继cAMP和钙离子之后发现的又一广泛存在于细菌中的第二信使。研究者最初将c-di-GMP描述为木醋杆菌纤维素合成酶的激活物质^[5]。经过30多年的研究证明,c-di-GMP参与调控了细菌的多种功能,包括细胞周期、细胞分化、生物被膜的形成与扩散、鞭毛与菌毛介导的细胞运动行为、细菌的耐药性以及致病菌在宿主体内的持久性^[6-7]等。细胞内c-di-GMP的水平高低由二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclases, DGCs, 该蛋白含有保守的GGDEF域)和磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDEs, 该蛋白含有保守的EAL或HD-GYP域)调控。c-di-GMP由两分子的GTP在二鸟苷酸环化酶的催化下合成,通过与相应的受体结合发挥作用,磷酸二酯酶则可将其分解为不同的产物(图2)。c-di-GMP调控细菌功能的受体有:(1)具有PilZ域的蛋白^[8];(2)含有退化的DDGEF和EAL域的蛋白(尽管不具备DGC或PDE酶活性,但仍保留了与c-di-GMP结合的亲和性);(3)核糖开关;(4)转录因子^[9](图2)。研究发现,在铜绿假单胞菌中有38个蛋白可能参与了c-di-GMP的代谢过程,这表明细胞在响应各种刺激时,与c-di-GMP相关的调控机制是十分复杂多样的^[5-6,10]。此外,BAKER等^[11]在研究中提到铜绿假单胞菌具有8个含有PilZ结构域的蛋白,但与c-di-GMP的结合亲和性

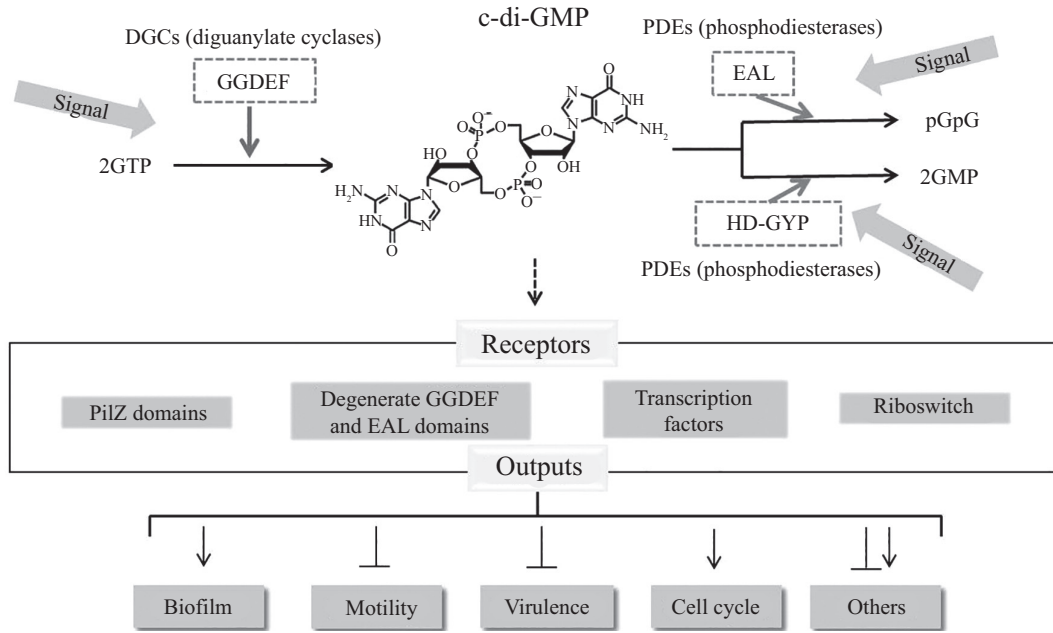


生物被膜发展的五个阶段,其中图(1)的箭头分别表示细胞黏附(↓)和脱附表面(↑)。

Schematic outlining the five stages in biofilm development, the arrows in figure (1) represent adhesion (↓) and detachment (↑) from surfaces, respectively.

图1 生物被膜的形成过程

Fig.1 The formation of biofilm



c-di-GMP由DGC蛋白催化产生,并被PDE蛋白降解。c-di-GMP能够与PilZ、退化的GGDEF或EAL结构域、转录因子或核糖开关发生作用以调控细胞功能。其中实线箭头表示促进,“T”型箭头表示抑制,虚线箭头表示受体。
 c-di-GMP is produced by DGC proteins and degraded by PDE proteins. c-di-GMP is sensed by receptor proteins or RNAs from either the PilZ, degenerate GGDEF or EAL domain, transcriptional factors or riboswitch families. The solid arrow indicates promotion, the “T” arrow indicates inhibition, and the dashed arrow indicates the receptors.

图2 c-di-GMP的合成、分解以及功能调控(根据参考文献[9]修改)

Fig.2 Synthesis, decomposition and function control of c-di-GMP (modified from reference [9])

却能够相差145倍,暗示了c-di-GMP对具有PilZ结构域的蛋白具有不同程度的调控作用,而这种亲和力调控也许是c-di-GMP的调控机制之一^[12]。铜绿假单胞菌可以通过Pil-Chp复合物、四型菌毛(type IV pilus, TFP)、PilY1蛋白以及Wsp(Wrinkly spreader)系统感应表面环境并调节c-di-GMP的含量,进而通过第二信使的层层级联,启动或抑制其关联基因的表达或信号转导,最终促进或抑制生物被膜在表面的形成^[13-15]。

c-di-GMP的分布特点首先体现在细胞不对称分裂过程中两个子代细胞c-di-GMP水平的差异性上,其次是细胞间c-di-GMP含量的异质性^[14]。黏附于表面的细胞在分裂前,其两端的c-di-GMP水平相似,但当细胞分裂并形成隔膜后,不具有鞭毛的子代细胞c-di-GMP含量升高,而具有鞭毛的子代细胞c-di-GMP含量下降^[16-17]。这就导致了子代细胞具有两种表型:无鞭毛子代更倾向于以固着于表面的形式生存,而继承了鞭毛的子代因为具有更活跃的运动表型而易于脱离表面^[17-18]。黏附于表面的铜绿假单胞菌在Wsp系统的参与下,基因差异表达,使个体间的c-di-GMP含量产生差异,这种异质性也导致了细

胞表型的多样化^[14]。c-di-GMP的分布特点赋予了附着于表面的细胞运动行为的多样性并有利于生物被膜的形成^[19]。这对细菌在不同环境下的存活、感染的扩散以及对组织的损伤至关重要^[18]。

3 c-di-GMP对运动的调节

整体上来讲,c-di-GMP在高水平下限制细胞的运动行为,进而有利于形成生物被膜;相反c-di-GMP在低水平下,有利于鞭毛介导的游泳运动(swimming)、四型菌毛介导的蹭行运动(twitching)以及鞭毛和菌毛共同介导的群集(swarming)运动,不利于生物被膜的形成。黏附于表面的细胞可以在不同附属物介导的运动行为之间进行相互转换^[20]。

3.1 对游泳运动的调节

游泳运动指的是细胞通过鞭毛的旋转作用在液体环境中的运动现象。在铜绿假单胞菌的可逆黏附过程中,细胞依赖鞭毛的旋转进行游泳运动以克服表面斥力,使细胞更易于黏附在表面^[5]。鞭毛介导的表面运动主要有两种形式:由鞭毛旋转产生的细胞近表面的游泳和鞭毛锚定于表面的细胞旋转运动。细胞锚定于表面的旋转,有利于细胞脱离表面^[20]。

FleQ蛋白在鞭毛基因的转录中发挥了重要作用^[21]。该蛋白作为细胞鞭毛基因表达的转录调节因子,可以与*flhA*基因的上游激活序列结合启动鞭毛基因的级联表达^[5]。而c-di-GMP可以与ATP竞争性地结合到FleQ的Walker A模体,抑制FleQ的ATP酶活性,进而抑制组装鞭毛所需基因的转录,使游泳运动受限。特别地,当FleN蛋白存在时,c-di-GMP对FleQ的抑制性显著增强^[22-24]。

最近研究还发现,磷酸二酯酶DipA、NbdA和RbdA可以通过c-di-GMP的衔接蛋白MapZ参与控制鞭毛马达的开关以及游动方向的转变^[25],说明c-di-GMP对游泳运动的调节是十分复杂的。

3.2 对蹭行运动的调节

蹭行运动是指铜绿假单胞菌在四型菌毛的伸展和收缩作用下产生的表面运动行为。依赖于TFP的蹭行方式主要有两种:细胞垂直于表面的直立行走和沿着细胞长轴方向的爬行运动。一旦细胞与表面发生接触,四型菌毛介导的蹭行运动在促进微菌落的形成中将发挥重要作用。在生物被膜形成过程中细胞可以利用直立的行走运动探索表面微环境,并促进细胞从生物被膜中脱离以寻找新的黏附位点^[20,26]。另外,PERSAT等^[27]发现,铜绿假单胞菌的四型菌毛不仅可以介导细胞在表面进行蹭行运动,还可以感应表面环境,促进毒性因子的表达。

尽管表面的蹭行运动有利于细胞在表面的定殖,但要使细胞更加稳定、不可逆地附着于表面,则需要对蹭行运动进行抑制。在此我们主要通过讨论c-di-GMP的合成与分解酶在蹭行运动中的作用,以揭示c-di-GMP对蹭行运动的调节作用。从当前c-di-GMP与蹭行运动的研究现状来看,c-di-GMP主要通过FimX蛋白调控蹭行运动。FimX蛋白是组装四型菌毛所必需的,一般同时含有REC、PAS、GGDEF(无活性)和EAL结构域,因而FimX可以与c-di-GMP相互作用^[28-30]。JAIN等^[30]发现,细胞在低c-di-GMP浓度下菌毛的组装需要FimX的参与,但在高c-di-GMP浓度下则不需要FimX蛋白。在蹭行运动中c-di-GMP和FimX之间属于何种调控机制目前并没有确切地指出。有研究猜测,FimX蛋白可能仅作为一个典型的PDE,可以降低c-di-GMP水平以促进运动行为,又或者该蛋白作为效应系统的一部分,通过结合c-di-GMP以调节蹭行运动^[5]。但可以肯定的是c-di-GMP对蹭行运动的调控与FimX蛋白相关,且高

浓度的c-di-GMP抑制蹭行运动,低浓度的c-di-GMP则促进细胞的蹭行运动并使之更易脱离表面。另外,BURROWS^[31]在文章中提到,PilZ和FimX蛋白可能以依赖c-di-GMP的方式共同参与调控了菌毛蛋白聚合酶PilB的功能,这就说明c-di-GMP对四型菌毛所介导的蹭行运动的调控可能是复杂且多通路的。

3.3 对群集运动的调节

群集运动是以群体细胞为基础,在鞭毛、四型菌毛以及表面活性剂的参与下进行的表面协同运动^[32],在细胞的不可逆黏附中具有重要作用。群集运动中的细胞包括边缘细胞和中心细胞。边缘细胞大约是中心细胞的两倍长,像“侦察兵”一样在表面进行传播,并有利于细胞定殖于营养丰富的环境中;而中心细胞则呈生物被膜样定居于生长部位^[32-33]。生物被膜的形成需要群集运动的发生,通过抑制或阻止群集运动可以影响生物被膜的形成。

当细胞黏附于表面进行群集运动时,c-di-GMP的合成与分解酶发挥了重要作用。KUCHMA等^[34-35]通过研究铜绿假单胞菌的*SadC*和*bifA*基因突变菌株的运动行为,证明具有DGC功能的*SadC*蛋白对群集运动以及生物被膜的形成分别具有抑制和促进的作用。而具有PDE功能的*BifA*蛋白则相反^[35]。*SadC*和*BifA*蛋白通过合成与分解c-di-GMP的方式参与调控铜绿假单胞菌的群集行为。除了c-di-GMP的合成与分解酶对运动行为调控的研究外,BAKER还发现^[11],铜绿假单胞菌极性鞭毛的旋转由MotAB和MotCD定子复合物控制,其中MotAB不支持群集运动,MotCD却可以促进群集运动。他们证明当c-di-GMP升高时,FlgZ蛋白以依赖c-di-GMP的方式与MotC蛋白相互作用,从而抑制群集运动^[11]。而后,他们又发现c-di-GMP与鞭毛马达之间的关系是相互的。鞭毛马达可以被c-di-GMP通过一系列反应进行调控,相反,MotC可以通过与*SadC*的相互作用刺激*SadC*的环化酶活性,进而促进c-di-GMP的生成^[36]。由此说明,c-di-GMP对于群集运动的调控具有复杂性。

4 c-di-GMP对胞外多糖的调控

除了上述细胞运动行为对生物被膜形成的影响外,细胞的不可逆黏附以及生物被膜的形成还需要胞外多糖(exopolysaccharides, EPSs)的参与。胞外多糖连同胞外DNA、蛋白质和其他因子^[37],共同构成了成熟生物被膜的胞外基质。胞外多糖是构成生

物被膜骨架的重要成分, 因此我们重点阐述了c-di-GMP对胞外多糖的调控途径。

铜绿假单胞菌至少可以产生三种与生物被膜相关的胞外多糖: Psl、Pel和褐藻酸盐。其中Pel通过离子间相互作用与胞外DNA发生交联, 以维持生物被膜中细胞间的相互作用^[38]。Psl通过与胞外DNA结合形成纤维网, 为细菌提供骨架结构^[39]; Psl还可以与细胞表面的黏附素蛋白CdrA直接结合以强化细胞对表面的黏附, 促进生物被膜的形成^[40]; 另外, ZHAO等^[41]发现, 当细胞在表面进行蹭行运动时, 细胞的Psl多糖会分泌于表面形成Psl轨迹, Psl越多的区域会吸引更多的细胞到访, 进而有利于细胞的聚集以及生物被膜的形成。而褐藻酸盐与生物被膜的关系主要体现在生物被膜的结构化与耐药性上。过表达褐藻酸盐的菌株所形成的生物被膜具有高度的结构性, 并对妥布霉素具有更高的抗性^[42-43]。

从当前的研究现状来看, c-di-GMP对于Psl多糖的调控过程尚未明确, 与c-di-GMP调控相关的具有PilZ结构域的蛋白也并不是Psl合成所必需的^[5]。当铜绿假单胞菌分别过表达Psl、Pel和CdrAB后均产生了细胞的聚集, 但仅有Psl过表达的菌株细胞内c-di-GMP水平升高^[44], 证明Psl水平与c-di-GMP之间具有正向关联。对于Pel多糖的c-di-GMP调控则较为明确, 研究发现, FleQ蛋白可以和*pelA*启动子结合, 进而抑制*pel*基因的表达, 但当c-di-GMP处于高水平时可以解除这种抑制作用, 将FleQ由抑制因子转化为激活因子, 促进Pel多糖产生^[22,45-46]。另外LEE等^[47]研究发现, PelD蛋白与c-di-GMP的结合是Pel多糖合成所必需的。

囊性纤维化患者肺部的铜绿假单胞菌由于褐藻酸盐的过表达, 呈难以清除的黏液状存活。而具有PilZ结构域的膜相关蛋白Alg44与c-di-GMP的结合是褐藻酸盐合成所必需的^[48-49]。MERIGHI等^[49]指出, Alg44蛋白参与了褐藻酸盐的合成与运输, 其PilZ结构域与c-di-GMP的结合调控了褐藻酸盐的合成。当c-di-GMP过表达或含量降低时褐藻酸盐的产量也相应地增加或减少。

ZHANG课题组^[50]分析发现, ProE蛋白是分解c-di-GMP的磷酸二酯酶, 同时对胞外多糖具有负调控作用。另外具有相同效果的蛋白还有RbdA、BifA和DipA, 说明c-di-GMP与胞外多糖之间的联系是复杂的, 并且仍处于探索阶段。

5 c-di-GMP对生物被膜的扩散调控

在外界环境信号如营养条件、重金属以及一氧化氮的诱导下, 细胞会离开生物被膜以寻找新的固着点^[51]。而c-di-GMP可以抑制高度组织性的生物被膜在多种环境因素下向运动状态的过渡。MORGAN等^[52]发现, 当编码趋化蛋白的*bdIA*基因突变后, 细胞无法感应环境信号, 并且细胞内c-di-GMP水平提高, 细胞对表面的黏附性增强, 使生物被膜难以分散。而趋化蛋白BdIA不具备DGC或PDE的功能, 他们猜测BdIA也许起着对环境信号的感知、c-di-GMP水平调控以及细胞从生物被膜中脱离的连接作用^[52]。继而PETROVA等^[53]证明, BdIA对生物被膜的扩散作用是由具有DGC功能的GcbA蛋白促进的。在生物被膜生长过程中, GcbA可以促进BdIA的裂解使之呈激活状态, 进而使细胞易于扩散^[54-55]。而该调节作用主要依赖于c-di-GMP水平和细胞的生长模式。因此, 铜绿假单胞菌生物被膜对各种分散诱导条件的响应都需要降低细胞c-di-GMP水平^[53]。

每1 mg的铜绿假单胞菌生物被膜可以提取出75~110 pmol的c-di-GMP, 但液体环境中的细胞仅能提取到30 pmol/mg^[6,56], 这从侧面也反映了c-di-GMP与生物被膜的正相关性。综合与生物被膜形成相关的酶发现, 至少有5个DGCs(WspR、SadC、RoeA、SiaD和YfiN/TpbB)参与了*Pseudomonas aeruginosa*从浮游的单细胞状态向固着的生物被膜状态的转变^[6,57-61]。另外, 具有DGC功能的蛋白如GcbA和NicD参与抑制了单细胞从生物被膜中的扩散。具有PDE功能的蛋白如DipA、NbdA、RbdA和MucR(同时具有DDGEF和EAL结构域, 在扩散中主要表现出PDE活性)则促进了单细胞从生物被膜中的扩散^[10,51,56,62-65]。因此, 细胞利用c-di-GMP调控生物被膜的形成是复杂且多途径的。

6 前景与展望

综上所述, c-di-GMP通过独立或级联的方式参与调控鞭毛的旋转、TFP的伸缩、胞外多糖的产生、表面黏附素的表达以及生物被膜的分散^[66-67]等。当细胞内c-di-GMP升高时, 有利于生物被膜的建立从而促进慢性感染的发生。尽管c-di-GMP的调控功能十分强大, 但当前对于c-di-GMP信号转导的机制, 包括对c-di-GMP的识别和随后的表型调控, 仍有很大大程度的不明确性, 已知的c-di-GMP靶点数量也相对

较少; 并且环境信号的识别和作用, 以及它们与传感模块(与DGCs, PDEs以及c-di-GMP受体相关)的相互作用, 也还处于婴儿期。因此, c-di-GMP对生物被膜的调控机制仍然需要继续发现与完善。

基于当前传统的抗菌药物难以将生物被膜根除的现状, 以及c-di-GMP在细胞内重要的调控作用, c-di-GMP有潜力成为防治生物被膜的重要组成部分。目前通过抑制c-di-GMP以预防生物被膜形成的研究已有报道^[68]。HENRIK等^[69]发现, 高水平的cAMP可以通过降低c-di-GMP含量达到抑制生物被膜形成的效果。此外, c-di-GMP还是一种有效的免疫佐剂, LI等^[70]发现, 2'-氟-c-di-GMP作为口服疫苗佐剂, 能够有效提高机体免疫。因此, 进一步开发c-di-GMP的药用价值也将具有广阔的前景。

参考文献 (References)

- [1] VALENTINI M, GONZALEZ D, AL MAVRIDO D, et al. Lifestyle transitions and adaptive pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2018, doi:10.1016/j.mib.2017.11.006.
- [2] WEI Q, ZHANG Z, LUO J, et al. Insulin treatment enhances *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by increasing intracellular cyclic di-GMP levels, leading to chronic wound infection and delayed wound healing [J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(6): 3261-79.
- [3] AL-JASIMEE A S, HEZAM A M, MOHAMMED W J, et al. A general overview on *Pseudomonas aeruginosa* bacteria and its pathogenicity [J]. *Int J Res Pharm Sci*, 2020, 11(1): 702-7.
- [4] ZHAI C, ZHANG W, ZHANG J, et al. Overshadow effect of Psl on bacterial response to physiochemically distinct surfaces through motility-based characterization [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 383.
- [5] HA D G, O'TOOLE G A. c-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review [J]. *Microbiol Spectr*, 2015, doi:10.1128/microbiolspec.MB-0003-2014.
- [6] VALENTINI M, FILLOUX A. Biofilms and cyclic di-GMP(c-di-GMP) signaling: lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(24): 12547-55.
- [7] VALENTINI M, FILLOUX A. Multiple roles of c-di-GMP signaling in bacterial pathogenesis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2019, 73(1): 387-406.
- [8] CHEANG Q W, XIN L, CHEA R Y F, et al. Emerging paradigms for PilZ domain-mediated c-di-GMP signaling [J]. *Biochem Soc Trans*, 2019, 47: 381-8.
- [9] SONDERMANN H, SHIKUMA N J, YILDIZ F H. You've come a long way: c-di-GMP signaling [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2012, 15(2): 140-6.
- [10] CHOU S H, GUILIANI N, LEE V T, et al. Microbial cyclic dinucleotide signaling [M]. Switzerland: Springer, 2020, doi: 10.1007/978-3-030-33308-9.
- [11] BAKER A E, DIEPOLD A, KUCHMA S L, et al. PilZ domain protein FlgZ mediates cyclic di-GMP-dependent swarming motility control in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 2016, 198(13): 1837-46.
- [12] PULTZ I S, CHRISTEN M, KULASEKARA H D, et al. The response threshold of Salmonella PilZ domain proteins is determined by their binding affinities for c-di-GMP [J]. *Mol Microbiol*, 2012, 86(6): 1424-40.
- [13] O'CONNOR J R, KUWADA N J, HUANGYUTITHAM V, et al. Surface sensing and lateral subcellular localization of WspA, the receptor in a chemosensory-like system leading to c-di-GMP production [J]. *Mol Microbiol*, 2012, 86(3): 720-9.
- [14] ARMBRUSTER C R, LEE C K, PARKER-GILHAM J, et al. Heterogeneity in surface sensing suggests a division of labor in *Pseudomonas aeruginosa* populations [J]. *Elife*, 2019, doi:10.7554/eLife.45084.
- [15] LUO Y, ZHAO K, BAKER A E, et al. A hierarchical cascade of second messengers regulates *Pseudomonas aeruginosa* surface behaviors [J]. *mBio*, 2015, 6(1): e02456-14.
- [16] CHRISTEN M, KULASEKARA H D, CHRISTEN B, et al. Asymmetrical distribution of the second messenger c-di-GMP upon bacterial cell division [J]. *Science*, 2010, 328(5983): 1295-7.
- [17] KULASEKARA B R, KAMISCHKE C, KULASEKARA H D, et al. c-di-GMP heterogeneity is generated by the chemotaxis machinery to regulate flagellar motility [J]. *Elife*, 2013, doi:10.7554/eLife.01402.
- [18] LAVENTIE B J, SANGERMANI M, ESTERMANN F, et al. A surface-induced asymmetric program promotes tissue colonization by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Cell Host Microbe*, 2019, 25(1): 1-13.
- [19] NAIR H A S, PERIASAMY S, YANG L, et al. Real time, spatial, and temporal mapping of the distribution of c-di-GMP during biofilm development [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(2): 477-87.
- [20] CONRAD J C, GIBIANSKY M L, JIN F, et al. Flagella and pili-mediated near-surface single-cell motility mechanisms in *P. aeruginosa* [J]. *Biophys J*, 2011, 100(7): 1608-16.
- [21] BARAQUET C, HARWOOD C S. FleQ DNA binding consensus sequence revealed by studies of FleQ-dependent regulation of biofilm gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 2015, 198(1): 178-86.
- [22] MATSUYAMA B Y, KRASTEVA P V, BARAQUET C, et al. Mechanistic insights into c-di-GMP-dependent control of the biofilm regulator FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 113(2): 209-18.
- [23] SU T, LIU S, WANG K, et al. The REC domain mediated dimerization is critical for FleQ, from *Pseudomonas aeruginosa* to function as a c-di-GMP receptor and flagella gene regulator [J]. *J Struct Biol*, 2015, 192(1): 1-13.
- [24] BARAQUET C, HARWOOD C S. Cyclic diguanosine monophosphate represses bacterial flagella synthesis by interacting with the Walker A motif of the enhancer-binding protein FleQ [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(46): 18478-83.
- [25] XIN L, ZENG Y, SHENG S, et al. Regulation of flagellar motor switching by c-di-GMP phosphodiesterases in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(37): 13789-99.
- [26] GIBIANSKY M L, CONRAD J C, JIN F, et al. Bacteria use type

- IV Pili to walk upright and detach from surfaces [J]. *Science*, 2010, 330(6001): 197.
- [27] PERSAT A, INCLAN Y F, ENGEL J N, et al. Type IV pili mechanochemically regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(24): 7563-8.
- [28] QI Y, CHUAH M L C, DONG X, et al. Binding of cyclic diguanylate in the non-catalytic EAL domain of FimX induces a long-range conformational change [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(4): 2910-7.
- [29] JAIN R, SLIUSARENKO O, KAZMIERCZAK B I. Interaction of the cyclic-di-GMP binding protein FimX and the type 4 pilus assembly ATPase promotes pilus assembly [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13(8): e1006594.
- [30] JAIN R, BEHRENS A J, KAEVER V, et al. Type IV pilus assembly in *Pseudomonas aeruginosa* over a broad range of cyclic di-GMP concentrations [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(16): 4285-94.
- [31] BURROWS L L. *Pseudomonas aeruginosa* twitching motility: type IV pili in action [M]. *Annu Rev Microbiol*, 2012, 66: 493-520.
- [32] MADUKOMA C S, LIANG P, DIMKOVIKJ A, et al. Single cells exhibit differing behavioral phases during early stages of *Pseudomonas aeruginosa* swarming [J]. *J Bacteriol*, 2019, 201(19): e00184-19.
- [33] KOHLER T, CURTY L K, BARJA F, et al. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(21): 5990-6.
- [34] MERRITT J H, BROTHERS K M, KUCHMA S L, et al. SadC reciprocally influences biofilm formation and swarming motility via modulation of exopolysaccharide production and flagellar function [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(22): 8154-64.
- [35] KUCHMA S L, BROTHERS K M, MERRITT J H, et al. BifA, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase, inversely regulates biofilm formation and swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 [J]. *J Bacteriol*, 2007, 189(22): 8165-78.
- [36] BAKER A E, WEBSTER S S, DIEPOLD A, et al. Flagellar stators stimulate c-di-GMP production by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 2019, 201(18): e00741-18.
- [37] FLEMMING H C, WINGENDER J. The biofilm matrix [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2010, 8(9): 623-33.
- [38] JENNINGS L K, STOREK K M, LEDVINA H E, et al. Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(36): 11353-8.
- [39] WANG S, LIU X, LIU H, et al. The exopolysaccharide Psl-eDNA interaction enables the formation of a biofilm skeleton in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Environ Microbiol Rep*, 2015, 7(2): 330-40.
- [40] BORLEE B R, GOLDMAN A D, MURAKAMI K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix [J]. *Mol Microbiol*, 2010, 75(4): 827-42.
- [41] ZHAO K, TSENG B S, BECKERMAN B, et al. Psl trails guide exploration and microcolony formation in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. *Nature*, 2013, 497(7449): 388-91.
- [42] HENTZER M, TEITZEL G M, BALZER G J, et al. Alginate overproduction affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm structure and function [J]. *J Bacteriol*, 2001, 183(18): 5395-401.
- [43] WAN B, ZHU Y, TAO J, et al. Alginate lyase guided silver nanocomposites for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* from lungs [J]. *ACS Appl Mater Interfaces*, 2020, 12(8): 9050-61.
- [44] IRIE Y, BORLEE B R, O'CONNOR J R, et al. Self-produced exopolysaccharide is a signal that stimulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(50): 20632-6.
- [45] BARAQUET C, MURAKAMI K, PARSEK M R, et al. The FleQ protein from *Pseudomonas aeruginosa* functions as both a repressor and an activator to control gene expression from the pel operon promoter in response to c-di-GMP [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(15): 7207-18.
- [46] HICKMAN J W, HARWOOD C S. Identification of FleQ from *Pseudomonas aeruginosa* as a c-di-GMP-responsive transcription factor [J]. *Mol Microbiol*, 2008, 69(2): 376-89.
- [47] LEE V T, MATEWISH J M, KESSLER J L, et al. A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 65(6): 1474-84.
- [48] OGLESBY L L, SUMITA JAIN, OHMAN D E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization [J]. *Microbiology (Reading)*, 2008, 154(6): 1605-15.
- [49] MERIGHI M, LEE V T, HYODO M, et al. The second messenger bis-(3'-5')-cyclic-GMP and its PilZ domain-containing receptor Alg44 are required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 65(4): 876-95.
- [50] FENG Q, AHATOR S D, ZHOU T. Regulation of exopolysaccharide production by ProE, a cyclic-di-GMP phosphodiesterase in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1226.
- [51] LI Y, HEINE S, ENTIAN M, et al. NO-induced biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by an MHYT domain-coupled phosphodiesterase [J]. *J Bacteriol*, 2013, 195(16): 3531-42.
- [52] MORGAN R, KOHN S, HWANG S H, et al. BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(21): 7335-43.
- [53] PETROVA O E, CHERNY K E, SAUER K. The diguanylate cyclase GcbA facilitates *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion by activating BdlA [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(1): 174-87.
- [54] PETROVA O E, SAUER K. Dispersion by *Pseudomonas aeruginosa* requires an unusual posttranslational modification of BdlA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(41): 16690-5.
- [55] PETROVA O E, SAUER K. PAS domain residues and prosthetic group involved in BdlA-dependent dispersion response by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms [J]. *J Bacteriol*, 2012, 194(21): 5817-28.
- [56] ROY A B, SAUER K. Diguanylate cyclase NicD-based signaling mechanism of nutrient-induced dispersion by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Mol Microbiol*, 2014, 94(4): 771-93.
- [57] MERRITT J H, HA D G, COWLES K N, et al. Specific control of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated behaviors by two c-di-GMP diguanylate cyclases [J]. *mBio*, 2010, 1(4): e00183-10.
- [58] MALONE J G, JAEGER T, SPANGLER C, et al. YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6(3): e1000804.

- [59] UEDA A, WOOD T K. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA(PA3885) [J]. PLoS Pathog, 2009, 5(6): e1000483.
- [60] KLEBENSBERGER J, BIRKENMAIER A, GEFFERS R, et al. SiaA and SiaD are essential for inducing autoaggregation as a specific response to detergent stress in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Environ Microbiol, 2009, 11(12): 3073-86.
- [61] HICKMAN J W, TIFREA D F, HARWOOD C S. A chemosensory system that regulates biofilm formation through modulation of cyclic diguanylate levels [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(40): 14422-7.
- [62] PETROVA O E, CHERNY K E, SAUER K. The *Pseudomonas aeruginosa* diguanylate cyclase GcbA, a homolog of *P. fluorescens* GcbA, promotes initial attachment to surfaces, but not biofilm formation, via regulation of motility [J]. J Bacteriol, 2014, 196(15): 2827-41.
- [63] ROY A B, PETROVA O E, SAUER K. The phosphodiesterase DipA(PA5017) is essential for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersion [J]. J Bacteriol, 2012, 194(11): 2904-15.
- [64] LIU C, LIEW C W, WONG Y H, et al. Insights into biofilm dispersal regulation from the crystal structure of the PAS-GGDEF-EAL region of RbdA from *Pseudomonas aeruginosa* [J]. J Bacteriol, 2018, 200(3): e00515-7.
- [65] BERNIER S P, HA D G, KHAN W, et al. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* surface-associated group behaviors by individual amino acids through c-di-GMP signaling [J]. Res Microbiol, 2011, 162(7): 680-8.
- [66] ROMLING U, GALPERIN M Y, GOMELSKY M. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2013, 77(1): 1-52.
- [67] BOUFFARTIGUES E, MOSCOSO J A, DUCHESNE R, et al. The absence of the *Pseudomonas aeruginosa* OprF protein leads to increased biofilm formation through variation in c-di-GMP level [J]. Front Microbiol, 2015, 6: 630.
- [68] CHRISTENSEN L D, VAN GENNIP M, RYBTKE M T, et al. Clearance of *Pseudomonas aeruginosa* foreign-body biofilm infections through reduction of the cyclic di-GMP level in the bacteria [J]. Infect Immun, 2013, 81(8): 2705-13.
- [69] HENRIK A, MORTEN R, SAGHAR H, et al. High levels of cAMP inhibit *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation through reduction of the c-di-GMP content [J]. Microbiology (Reading), 2019, 165(3): 324-33.
- [70] LI J, LEE R K, CHEN W, et al. 2'-Fluoro-c-di-GMP as an oral vaccine adjuvant [J]. RSC Adv, 2019, 9(71): 41481-9.