

GGDEF结构域在c-di-GMP代谢中的作用 及其结构基础

杨婷婷^{1,2} 袁文肃^{1,2*}

(¹天津大学生命科学学院, 天津 300072; ²天津市生物大分子结构功能与应用重点实验室, 天津 300072)

摘要 环二鸟苷酸(cyclic diguanylate monophosphate, c-di-GMP)是一种重要的第二信使, 可调节细菌的各种生命活动, 包括生物膜形成、细胞分化、菌体运动和毒力因子产生等。在c-di-GMP代谢过程中, GGDEF结构域发挥重要作用。一方面, GGDEF结构域广泛存在于二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclases, DGCs)上, 催化c-di-GMP的合成; 另一方面, GGDEF结构域也可与EAL等结构域串联, 参与c-di-GMP的分解。该文系统介绍了c-di-GMP的代谢过程及其生理作用, 重点论述了GGDEF结构域有效调控c-di-GMP代谢的结构基础和机制, 并讨论了该领域研究的应用价值与未来方向。

关键词 环二鸟苷酸; GGDEF结构域; 二鸟苷酸环化酶

The Role of the GGDEF Domain in C-di-GMP Metabolism and Its Structural Basis

YANG Tingting^{1,2}, YUAN Wensu^{1,2*}

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

²Tianjin Key Laboratory of Function and Application of Biological Macromolecular Structures, Tianjin 300072, China)

Abstract C-di-GMP (cyclic diguanylate monophosphate) is an important second messenger in bacteria which can regulate biological movements, including biofilm formation, cell differentiation, bacterial motility and virulence factor production. The GGDEF domain plays an important role in c-di-GMP metabolism. On the one hand, GGDEF domain widely exists in DGCs (diguanylate cyclases), catalyzing the synthesis of c-di-GMP. On the other hand, GGDEF domain can also be connected with EAL domain and other domains to participate in c-di-GMP degradation. This paper systematically introduces the metabolic process and physiological action of c-di-GMP, focuses on the structural basis and mechanism of GGDEF domain in effectively regulating c-di-GMP metabolism, and discusses the application value and future direction of research in this field.

Keywords c-di-GMP; GGDEF domain; diguanylate cyclase

C-di-GMP是第一种被发现的环二核苷酸(cyclic dinucleotide, CDN)^[1-3], ROSS等^[1,4]证明c-di-GMP是一种可以变构激活木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)膜结合纤维素合酶的调节因子^[5], 参与纤维素合成信号网络。2004年, JENAL^[6]首次提出c-di-GMP是一种第二信使。

第二信使是一类在细胞内产生的可以通过其自身浓度变化来传递和放大胞内信号的非蛋白类小分子^[7]。在c-di-GMP参与的信号网络中, c-di-GMP的浓度受含GGDEF结构域的蛋白质的调控^[8]。在这类蛋白质中, 有些蛋白质可以作为反应调节子参与到双组分信号转导系统(two-component signal transduction system)中, 通过被细胞膜上的组氨酸激酶磷酸化, 激活自身的c-di-GMP合成酶活性, 从而提高c-di-

收稿日期: 2022-01-20 接受日期: 2022-03-08

*通讯作者。Tel: 13920968663, E-mail: yuanwensu0316@163.com

Received: January 20, 2022 Accepted: March 8, 2022

*Corresponding author. Tel: +86-13920968663, E-mail: yuanwensu0316@163.com

GMP在细胞中的浓度^[3,9];有些含GGDEF结构域的蛋白质也具有分解c-di-GMP的活性,这类蛋白质通常包含具有分解c-di-GMP活性的结构域,可以降低c-di-GMP的胞内浓度^[3,10]。简而言之,c-di-GMP的浓度水平受含GGDEF结构域的蛋白质的精准调控,含GGDEF结构域的蛋白质将胞外信息准确转化为c-di-GMP浓度的变化,起到向细胞内传递信号的作用^[11]。

含GGDEF结构域的蛋白质也可作为c-di-GMP的受体,向下游传递来自胞外的信号^[12-13]。C-di-GMP的受体还包括PilZ结构域受体^[14]和非活性EAL结构域受体^[15-16]等。2008年,SUDARSAN等^[17]发现c-di-GMP还可以与特异性的核糖开关结合。这些受体和核糖开关将信号传递给下游其他功能蛋白质或核酸,从而准确调控细胞生命活动^[8]。

到目前为止,c-di-GMP是研究最广泛深入的CDN,对与c-di-GMP代谢相关的蛋白酶的研究,丰富了人们对c-di-GMP信号网络的认识^[11,18]。

1 C-di-GMP

1.1 C-di-GMP的代谢

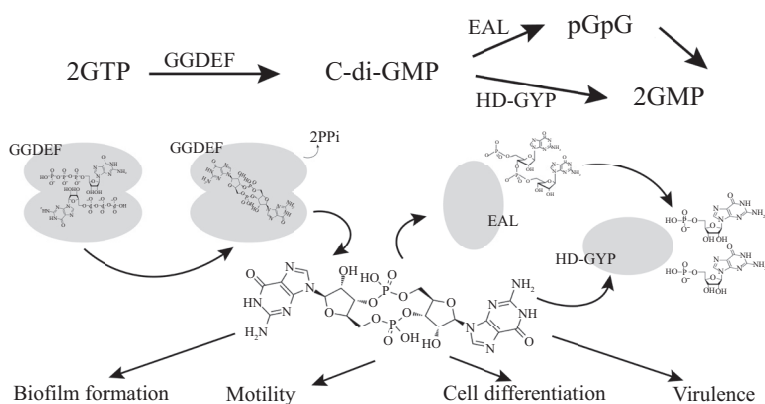
C-di-GMP是一种水溶性的环鸟嘌呤二核苷酸,其结构具有对称性(图1),分子式为 $C_{20}H_{24}N_{10}O_{14}P_2$ ^[3,19]。C-di-GMP主要以单体^[8]、二聚体^[20]或四聚体^[21]等形式存在。

细菌通过复杂的信号网络精细调控着c-di-

GMP的代谢过程^[3,6]。C-di-GMP的代谢主要是通过两个拮抗酶家族来控制的,其中负责c-di-GMP合成的是二鸟苷酸环化酶(diguanylate cyclases, DGCs),负责c-di-GMP分解的是特异性的磷酸二酯酶(phosphodiesterases, PDEs)(图1)^[8]。DGCs和PDEs广泛存在于细菌中,是细菌界已知的两个超大信号蛋白家族^[3,22-23]。

1.1.1 C-di-GMP的合成 通常,DGCs上包含保守的GGDEF结构域。早在2001年,AUSMEES等^[24]通过分析遗传数据发现含有GGDEF结构域的蛋白质具有DGCs活性。PEI等^[25]利用生物信息学手段发现,GGDEF基序是蛋白酶与底物三磷酸鸟苷(guanosine-5'-triphosphate, GTP)的结合位点。PAUL等^[26]对新月柄杆菌中含有GGDEF结构域的PleD蛋白进行研究,发现在体外条件下磷酸化的PleD可以将两分子GTP合成为一分子c-di-GMP,第一次用生化实验证实GGDEF结构域是DGCs发挥活性的关键结构域。

需要提及的是,DGCs的部分成员对c-di-AMP的代谢同样具有活性^[8,25,27]。C-di-AMP是一种参与调控细菌的细胞壁代谢、渗透应激反应和产孢过程的第二信使分子^[27]。C-di-AMP信号网络失调会导致细菌的异常表型,因此c-di-AMP在多种细菌中是不可或缺的^[28-29]。这里我们比对了典型DGCs和二腺苷酸环化酶的结构,发现它们在关键结构区域



两分子GTP在二聚化的GGDEF结构域催化下生成一分子c-di-GMP,并释放两分子的焦磷酸(PPi)。C-di-GMP在EAL结构域的水解下可分解为线性的pGpG,在HD-GYP结构域的水解下生成两分子的GMP。C-di-GMP参与细胞各类生理生化活动,并调节细菌生物膜的形成、运动性、细胞分化以及细胞毒力等。

Two molecules of GTP are catalyzed by a protein dimer containing the GGDEF domain to form a molecule of c-di-GMP and release two molecules of PPi (pyrophosphate). C-di-GMP can be decomposed into linear pGpG by hydrolysis of EAL domain protein or GMP by HD-GYP domain. C-di-GMP participates in various physiological and biochemical activities, and it can regulate biofilm formation, motility, cell differentiation and virulence .

图1 C-di-GMP的代谢过程和生物学功能示意图

Fig.1 The metabolic processes and biological functions of c-di-GMP

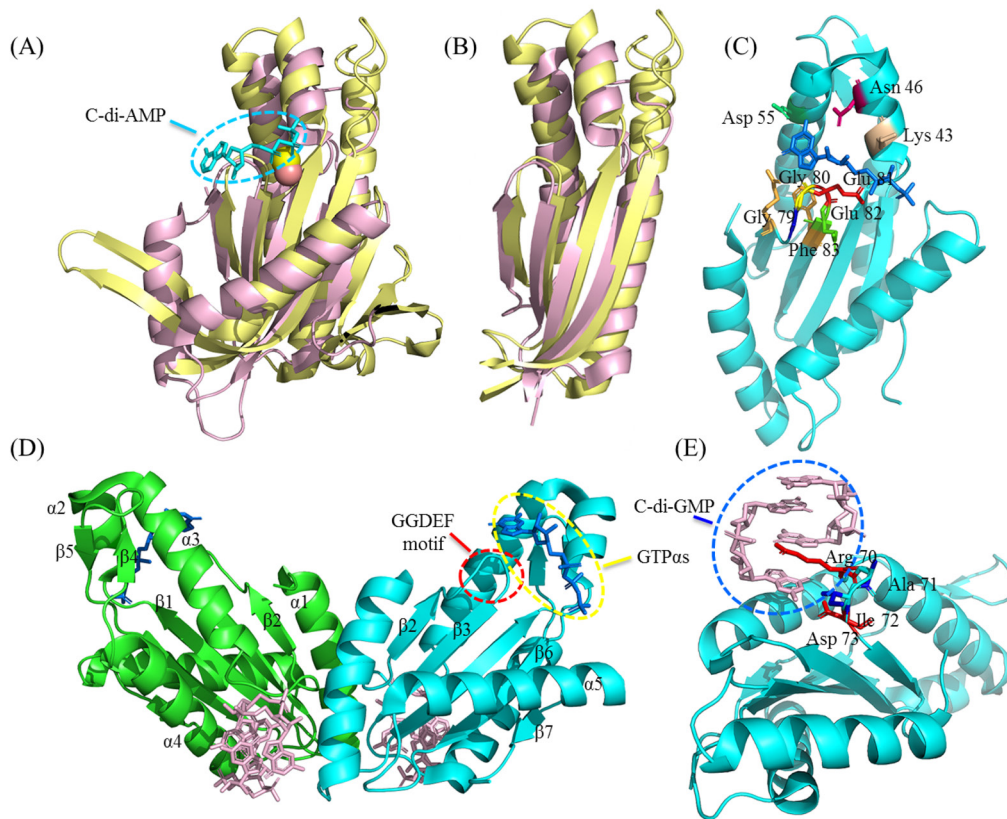
具有高度相似性,这可能是它们具有相似酶活的原因(图2A和图2B)。

1.1.2 C-di-GMP的分解 C-di-GMP特异性的PDEs可以将一分子c-di-GMP分解为两分子pGpG或GMP。在这些PDEs上存在着EAL或HD-GYP结构域^[3]。

EAL结构域多串联在PDEs的C-端,该结构域因含有高度保守的基序Glu-Ala-Leu,故被命名为EAL^[8]。PETER等^[30]从木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)中提纯了EAL结构域,发现该结构域可以将c-di-GMP分解为线性二鸟苷酸[5'-phosphoguanylyl-

(3',5')-guanosine, pGpG]。EAL结构域发挥PDE活性需要Mn²⁺或Mg²⁺等金属离子的参与^[8]。VERMA等^[31]的研究表明,水稻黄单胞菌致病变种(*Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*)中的BphP光色素是一种通过其上保守的EAL结构域,以光依赖的方式调控细胞内c-di-GMP水平的光敏PDE。BphP蛋白可以调节黄单胞菌的毒力等。

除EAL结构域外,HD-GYP结构域也具有分解c-di-GMP的活性。HD-GYP结构域是HD家族下的一个子集,该家族具有对不同底物的分解活性^[32-33]。在



A: 二腺苷酸环化酶CyaC(PDB ID为1WC0,黄色)与二鸟苷酸环化酶SadC(aa: 323—487)(PDB ID为4WXW,粉色)的结构重叠比对结果,图中蓝色分子为c-di-AMP,黄色球体与粉色球体分别为Ca²⁺与Mg²⁺。B: CyaC与SadC蛋白的活性关键区域结构比对结果,体现DACs与DGCs结构的高度相似性。C: 来自新月杆菌的PleD蛋白(PDB ID为2V0N) A-site示意图,图中为GTP类似物GTPas与GGDEF结构域间的相互作用,其中Gly 79-Phe 83构成了GGDEF基序,参与蛋白酶与底物的结合。D: PleD蛋白的GGDEF结构域同源二聚体,蓝色结构和绿色结构分别代表一个GGDEF结构域单体,单体二级结构顺序为 $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ - $\beta 6$ - $\alpha 5$ - $\beta 7$ 。E: PleD蛋白I-site示意图,Arg 70、Ala 71、Ile 72和Asp 73构成了RxxD基序,其中粉色结构为c-di-GMP插层同源二聚体,该结构插入到GGDEF结构域I-site,锁死PleD蛋白构象,起抑制GGDEF结构域活性的作用。

A: the overlap between the DAC CyaC (PDB ID: 1WC0, yellow) and the DGC SadC (aa: 323—487) (PDB ID: 4WXW, pink). The blue molecule in the figure is c-di-AMP. The yellow sphere is Ca²⁺, and the pink sphere is Mg²⁺. B: Structural comparison results of CyaC and SadC protein activity key regions, indicating a high degree of structural similarity between DACs and DGCs. C: PleD protein A-site. The interaction between GTP analogue GTPas and GGDEF domain is shown in the figure, in which Gly 79-Phe 83 forms the GGDEF motif and participates in the binding of protease and substrate. D: homologous dimer of GGDEF domain from PleD protein (PDB ID 2V0N). The blue and green structures represent GGDEF monomer, and the secondary structure sequence is $\alpha 1$ - $\beta 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 3$ - $\beta 2$ - $\beta 3$ - $\alpha 4$ - $\beta 4$ - $\beta 5$ - $\beta 6$ - $\alpha 5$ - $\beta 7$. E: PleD protein I-site. Arg 70, Ala 71, Ile 72 and Asp 73 form the RxxD motif. The pink structure is c-di-GMP interlacing homologous dimer, which is inserted into the GGDEF domain I-site. It can lock protein conformation and inhibit the activity of GGDEF domain.

图2 GGDEF结构域示意图及DGC和DAC结构相似度比对

Fig.2 The structure of GGDEF domain and comparison of structural similarity between DGCs and DACs

未证明HD-GYP结构域的具体作用的情况下,因生物体内GGDEF和HD-GYP结构域频繁串联,这种串联与GGDEF-EAL串联非常相似,科研人员大胆预测HD-GYP可能具有c-di-GMP特异性的PDE活性^[32,34]。

RYAN等^[35]在研究野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*)的蛋白RpfG时,通过实验验证了HD-GYP结构域参与c-di-GMP降解的假设。含有HD-GYP结构域的RpfG具有PDE活性^[35]。值得注意的是,RpfG水解c-di-GMP的主要产物是GMP,而不是含EAL结构域的PDEs的分解产物pGpG。由此推测,含有HD-GYP结构域的PDEs要么不释放pGpG,要么很容易将释放的pGpG重新结合在酶上,使其完全水解为GMP^[36-37]。

1.1.3 独特的GGDEF-EAL串联结构域 研究人员对不同来源的DGCs和PDEs序列进行比较分析,发现GGDEF结构域和EAL结构域常串联在一起,且广泛存在于与c-di-GMP代谢相关的蛋白上^[38]。

既然GGDEF结构域和EAL结构域的功能拮抗,为什么那么多蛋白同时包含GGDEF和EAL?这个问题至少有两种可能的情况。

第一种情况,也是最常见的一种情况是这两个结构域中的GGDEF结构域完全不发挥酶活性或活性不强^[39-40]。GGDEF结构域主要起变构调节作用,控制下游EAL结构域的催化活性^[39,41]。正如LIU等^[10]研究铜绿假单胞菌中含有PAS-GGDEF-EAL结构域的蛋白RbdA时发现,该蛋白的GGDEF结构域在整个蛋白中主要起到与GTP结合,变构调节下游EAL结构域活性的功能,而在整个蛋白中不显示环化酶活性。GTP与GGDEF结构域结合引起EAL结构域发生构象重排,从而影响蛋白活性。通过细菌胞内实验发现,RbdA在胞内呈同源二聚体形式存在,当没有外界信号刺激和GTP存在的情况下,同源二聚体形成一种自抑制的构象。在这种构象下,EAL结构域呈现较低的活性,胞内c-di-GMP水平较高,铜绿假单胞菌向形成生物膜方向发展。反过来,在外界信号刺激和GTP存在下,GTP结合在GGDEF结构域上,引起RbdA构象变化,使得EAL结构域的c-di-GMP结合位点暴露,蛋白具有了将c-di-GMP水解为pGpG的活性,胞内c-di-GMP浓度下降,铜绿假单胞菌的生物膜趋于瓦解^[10](图3)。

另一种情况是,GGDEF和EAL结构域均可在特定的环境或信号激活下发挥活性,但在任何给定的

情况下,GGDEF-EAL串联蛋白只表现一种活性^[8]。研究者对此进行了研究,提出了双功能信号转导酶的概念^[42]。来自铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的MorA蛋白是第一个被提出具有双活性的蛋白,其上包括GGDEF-EAL串联结构,其中GGDEF结构域具有合成c-di-GMP的活性,而EAL结构域可以水解c-di-GMP。PHIPPEN等^[43]强调该蛋白需要二聚化才具有相应的蛋白酶活性(图3)。

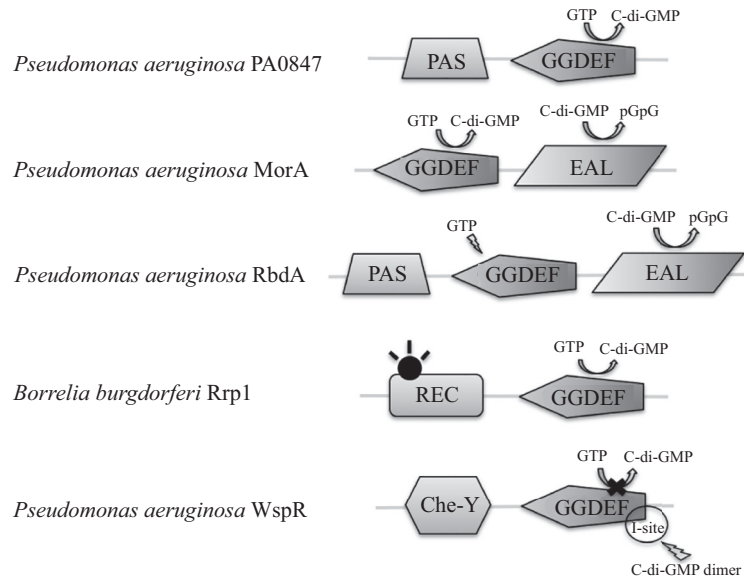
1.2 C-di-GMP的生理作用

1.2.1 生物膜形成 C-di-GMP参与的大部分信号通路都与细菌的生活形态调节有关,影响细菌与非生物表面或与其他生物之间的关系^[44-46]。最典型的就是在某些细菌中,c-di-GMP可以调节细菌从游离的单个细菌状态到生物膜群落的转变^[47-49]。

群体感应(quorum sensing, QS)是细菌广泛使用的一种细胞间通信方式,通过控制胞内基因表达来响应周围环境中的自诱导物质(auto-inducer, AI)浓度的变化^[50]。ZHANG等^[51]发现,高细胞密度(high cell density, HCD)、高水平的AI会引起副溶血性弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中OpaR蛋白的高表达。OpaR蛋白可以通过影响c-di-GMP在副溶血性弧菌细胞内的浓度来调节生物膜形成过程。OpaR可以结合在scrA等基因的上游DNA区域,从而抑制基因的转录。这些基因转录形成的蛋白均包含GGDEF或EAL结构域,可以调控c-di-GMP的合成与分解,改变c-di-GMP在胞内的浓度,进而影响生物膜形成过程^[51]。

细菌生活形态的转变有利于其适应不同的环境,具有高耐药性的致病菌往往可以通过c-di-GMP信号网络调节自身形态。利用该原理,IKEDA等^[52]开发出一种具有抑制细菌生物膜形成作用的c-di-GMP衍生物,该衍生物对革兰氏阳性菌生物膜的形成有抑制作用,可导致细菌失去生物膜的保护作用后耐药性降低,该研究为解决细菌耐药性问题提供了新的方案。

1.2.2 细胞分化 C-di-GMP可以控制链霉菌(*Streptomyces*)的分化^[53]。链霉菌是我们获得抗生素的主要来源,在其复杂的发育周期中,伴随着从营养生长到产孢的转变。GALLAGHER等^[53]证明了c-di-GMP通过介导Anti- σ 因子RsiG与链霉菌特异性 σ 因子 σ WhiG的结合来干预后期链霉菌发育进程,从而控制生殖菌丝向孢子分化。该研究解析了RsiG-(c-di-GMP)₂- σ WhiG复合体的晶体结构,发现c-di-GMP是



来自铜绿假单胞菌的*pa0847*基因编码的GGDEF结构域, 当其上游存在PAS结构域时, 环化酶活性明显提高; 来自铜绿假单胞菌的MorA是一种DGC-PDE双功能信号转导酶, 在不同信号影响下, 其GGDEF结构域或EAL结构域具有酶活性; 来自铜绿假单胞菌的RbdA是一种GGDEF-EAL串联蛋白, 该蛋白只有PDE活性, GGDEF结构域通过结合GTP变构调节PDE活性; 来自伯氏疏螺旋体的Rrp1蛋白通过上游REC结构域磷酸化激活GGDEF结构域的DGC活性; 来自铜绿假单胞菌的WspR是一种具有I-site, 并受I-site调控酶活的DGC, 当c-di-GMP插层二聚体结合到GGDEF结构域I-site时, WspR失去DGC酶活。

In the GGDEF domain encoded by *pa0847* gene of *Pseudomonas aeruginosa*, the cyclase activity was significantly increased when PAS domain existed in the upstream of the GGDEF domain. MorA from *Pseudomonas aeruginosa* is a DGC-PDE bi-functional signal transduction enzyme. Under the influence of different signals, the GGDEF domain or EAL domain has enzyme activity. RbdA from *Pseudomonas aeruginosa* is a GGDEF-EAL tandem protein, which has only PDE activity. The GGDEF domain regulates PDE activity by binding to GTP allosterism. Rrp1 from *Borrelia burgdorferi* activated DGC activity of GGDEF domain by phosphorylation of upstream REC domain. The WspR from *Pseudomonas aeruginosa* is a diguanosine cyclase that has I-site and is regulated by I-site. When c-di-GMP intercalated dimer binds to GGDEF domain I-site, the protein loses DGC activity.

图3 串联不同结构域的GGDEF结构域蛋白示意图

Fig.3 GGDEF domain proteins in series with different domains

RsiG抑制 σ WhiG的关键因子。该发现揭示了新的抗复合物形成机制, 并确立了c-di-GMP是链霉菌发育的中心整合因子。除此之外, TSCHOWRI等^[21]发现c-di-GMP可以组装成四聚体, 介导链霉菌的转录因子BldD有效二聚化, 在营养生长过程中抑制产孢基因的表达。该研究揭示了一种独特的蛋白质二聚化机制。综上所述, c-di-GMP可在细菌发育过程中作为调节物质直接影响细菌的细胞周期与发育进程。

除了影响细菌等原核生物的周期与分化外, c-di-GMP同样可以影响真核生物的分化。C-di-GMP可以触发盘基网柄菌(*Dictyostelium*)细胞分化。CHEN等^[54]在盘基网柄菌中首次检测到真核生物DGC DgcA, 发现DgcA能够以GTP依赖的方式产生c-di-GMP, 并在梗细胞分化过程中表达, 从而触发细胞的分化。

1.2.3 运动性 C-di-GMP可以参与调控细菌的各种运动行为^[55], 包括泳动、群集和蹭动运动等^[56-58]。

在铜绿假单胞菌PA14中, c-di-GMP可以调控鞭毛运动相关的定子蛋白, 进而影响细菌表面的群集运动^[59]。YANG等^[18]通过编辑睾丸酮丛毛单胞菌(*Comamonas testosteroni*) DGC YedQ和PDE YhjH的基因来调节胞内c-di-GMP水平, 从而达到定量分析c-di-GMP调控革兰氏阴性菌睾丸酮丛毛单胞菌的表面黏附特性的目的。结果表明, 高浓度c-di-GMP可促进长链疏水的胞外多糖和电中性蛋白质的分泌^[18]。相比之下, 细胞内c-di-GMP浓度的降低导致鞭毛的运动加速, 提高了细菌的迁移水平。

1.2.4 毒力 C-di-GMP可调节细菌的毒力^[31,60-62], 细菌许多与毒力相关的生命活动(例如黏附宿主细胞、抵抗宿主细胞侵袭、调节细胞毒性、分泌毒性因子、调控抗氧化应激和免疫应答)都与c-di-GMP信号转导有关^[63-69]。

从c-di-GMP作用对象的角度分析, c-di-GMP可以调控细菌所有类型的分泌系统^[8], 例如对甘薯茎

腐病菌(*Dickeya dadantii*)的II型分泌系统底物果胶酸裂解酶(*Pectate lyase*)分泌的调控。C-di-GMP还可直接或间接抑制分泌蛋白的基因转录, TISCHLER等^[70]首次在霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)中发现c-di-GMP与其毒力有关, 低水平的c-di-GMP可促进霍乱毒素水平升高, 而高水平的c-di-GMP可减轻感染霍乱的实验小鼠的病症。霍乱弧菌中的VieA蛋白, 具有PDE活性, 可以降解c-di-GMP。VieA蛋白可通过调节c-di-GMP浓度来影响霍乱毒素的合成。植物病原细菌的c-di-GMP水平也与毒力基因转录相关。水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)中的Clp蛋白可作为转录激活因子, 调控许多细胞外蛋白酶和多糖的产生, c-di-GMP可与Clp蛋白结合以阻止编码内切葡聚糖酶的基因*engA*的转录^[71-74]。

1.3 C-di-GMP的研究意义

C-di-GMP可直接或间接影响细菌的生理活动。在临床上, 形成生物膜的致病菌在慢性感染中对宿主免疫系统和抗生素的耐受性增强^[44]。调控细菌中c-di-GMP相关信号通路可以为临床控制细菌生物膜的形成和扩散, 解决细菌耐药性和院内感染问题提供新的思路^[3]。致病菌的运动性与毒力, 均与其致病能力相关^[61]。研究清楚c-di-GMP在相关机制中的独特作用, 可为解决细菌致病问题提供新思路。除此之外, c-di-GMP作为一种独特的细菌分子也可被哺乳动物免疫系统识别, 因此被认为是一种很有前途的疫苗佐剂^[75]。

2 GGDEF结构域

2.1 GGDEF结构域的结构基础

GGDEF结构域这一名称最早是由WAN等^[76]在研究新月柄杆菌PleD蛋白时提出的。因为PleD蛋白上有高度保守的Gly-Gly-Asp-Glu-Phe基序, 故将含有该基序的结构域命名为GGDEF结构域。基序的前两位残基(Gly)参与蛋白与底物分子GTP的结合, 第四位残基(Glu)与金属离子配位有关。该特征基序的第三位的氨基酸主要在金属配位中发挥作用, 既可能是天冬氨酸(Asp)也可能是谷氨酸(Glu), 在GGDEF结构域的催化作用中不可缺少^[77]。已知GGDEF结构域的二级结构一般主要由五个 α 螺旋和七个 β 折叠组成, 其序列可表示为 $\alpha 1-\beta 1-\alpha 2-\alpha 3-\beta 2-\beta 3-\alpha 4-\beta 4-\beta 5-\beta 6-\alpha 5-\beta 7$, GGDEF基序位于 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 之间的 β 发卡(β -hairpin)上, 是酶的主要活性部位, GGDEF基

序的任何突变都会破坏DGC的活性^[8,77-79](图2C和图2D)。

WASSMANN等^[80]解析了新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*) PleD蛋白的晶体结构, 这是首个DGC蛋白晶体结构。PleD上游由两个调节响应接收域REC组成, 下游为一个GGDEF结构域, 整体即REC-REC-GGDEF。研究表明, 只有当两个PleD的GGDEF结构域形成一个反向平行的同源二聚体时, PleD才可以发挥DGCs活性^[80]。

GGDEF基序是DGCs的活性位点(active site, A-site), 且该位点参与底物结合过程(图2C)。该过程需要金属离子 Mg^{2+} 或者 Mn^{2+} 的参与^[25]。由于一分子的GTP与一分子的GGDEF结构域酶活位点结合, 因此两分子GTP环化生成一分子c-di-GMP发生的前提是GGDEF结构域形成有活性的二聚体^[3,20]。

大多数细菌基因组上含有多种可以编码GGDEF结构域的基因, 且含有GGDEF结构域的蛋白因其上下游所串联的结构域不同而具有不同的功能。常见的串联序列有PAS结构域^[81-82]、REC结构域和HD-GYP结构域^[26,55,83]。

2.2 影响GGDEF结构域催化活性的机制

目前研究主要发现两种可以调节GGDEF结构域催化活性的机制^[1-3], 一种是负反馈调节机制, 另一种是依赖上游信号激活的机制。

负反馈调节机制的原理是c-di-GMP同源二聚体插入到GGDEF结构域中, 引起蛋白构象变化, 使其难以形成具有催化活性的二聚体, 进而不能发挥DGC活性^[3]。C-di-GMP通过结合在位于GGDEF结构域上的变构抑制位点(inhibitor site, I-site)来负反馈抑制DGCs的活性, 使DGC活性受到非竞争性产物抑制(noncompetitive product inhibition)^[22,84](图2E)。组成I-site的RxxD基序(其中x是任何氨基酸)位于GGDEF基序上游五个氨基酸处^[16,85-86]。在蛋白PleD或WspR中, 插入到蛋白酶I-site上的c-di-GMP同源二聚体均会使GGDEF结构域处于非活性状态^[80,87](图3)。这种机制的存在可以有效控制c-di-GMP在细胞内可达到的最大浓度并防止GTP耗尽^[62]。CHEN等^[88]在研究铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)中的DGC Dcsbis(PA2771)的晶体结构时发现Dcsbis N-端GAF结构域延伸出来一个肽环, 占据了C-端GGDEF结构域上保守的I-site, 因此大大缓解了负反馈调节对蛋白酶活的抑制作用。这从另一个角度证明了I-site在

GGDEF结构域上的作用。科研人员在大约一半的含有GGDEF结构域的DGCs中发现了I-site^[89]。同时发现,有些DGCs中即使没有I-site存在,也有负反馈抑制现象的发生。YANG等^[90]通过对植物病原菌油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris*) XCC4471蛋白的GGDEF结构域的研究,解答了在没有I-site的情况下,DGCs依旧可以被产物抑制的问题。C-di-GMP同源二聚体结合在XCC4471的A-site上,而非I-site上,最终导致XCC4471蛋白丧失活性构象^[90],这一发现丰富了负反馈调节机制的内容。

DGCs的产物抑制可以精确控制c-di-GMP细胞阈值浓度,将c-di-GMP水平维持在相对确定的浓度水平。这种机制有助于减少细胞内信号的随机扰动和提高相关信号网络的稳定性^[78]。虽然I-site和产物抑制之间的功能联系已经明确,但是c-di-GMP与某些GGDEF结构域结合也可能有其他功能^[39],如蛋白-蛋白相互作用^[90]或蛋白质-RNA的相互作用^[89]。关于这方面的问题,还需科研人员继续探索。

另一种依赖上游信号激活的酶活调节机制是科研人员利用生物化学和结构生物学方法发现的,即DGCs激活是由主要信号衍生的次级机制引起的。磷酸化是GGDEF结构域激活的一种常见机制。例如,伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*)中的DGC Rrp1,其上有REC-GGDEF串联结构域,只有当REC结构域被磷酸化后,Rrp1才具有DGC活性^[91](图3)。除此之外,来自于铜绿假单胞菌的蛋白WspR也是一个由N-端受体结构域调节酶活的具体例子^[87,92-93]。科研人员对来源于大肠杆菌的DgcZ进行研究,提出了一种全新的激活机制。DgcZ的GGDEF结构域N-端存在一个可以结合锌离子的CZB结构域。DgcZ的活性由CZB结构域变构调控^[94]。当CZB结构域存在时,DgcZ的GGDEF结构域失去酶活,无法合成c-di-GMP。在缺乏该结构域的情况下,DgcZ处于可以发挥DGC活性的构象具有DGC活性。尽管GGDEF结构域具有进化上的保守性和结构上的稳定性,但其功能严格依赖于相邻的结构域,这些结构域大多与DGCs二聚化有关,并协助GGDEF结构域发挥催化活性。GGDEF结构域能否发挥DGC活性的关键在于是否可以形成同源二聚体,而二聚化通常需要外部信号的刺激。当携带合成信息的外部信号传递到DGCs的N-端时,其构象发生变化,形成同源二聚体^[8]。这样在环化酶底物结合位点上的两个GTP分子便可达到能够发生反应的空间距离^[95]。

3 讨论及展望

半个多世纪以来,第二信使[主要包括环腺苷酸(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)^[97]和环鸟苷酸(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)^[98]等]作为开启细胞内信号转导的主要成员^[96],受到科研人员广泛关注,然而对CDNs的研究却相对滞后^[99]。自1987年研究人员首次发现c-di-GMP之后,不断有新的CDNs被发现。2008年,WITTE等^[100]在DNA修复研究中发现环二腺苷酸(cyclic diadenylate, c-di-AMP),同时发现合成环二腺苷酸的环化酶活性受DNA重组中间体的调节。DAVIES等^[101]在2012年发现环状GMP-AMP(cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate, cGAMP)可以调节霍乱弧菌(*Vibrio cholera*)的趋化性。后来HORNUNG等^[102]在哺乳动物细胞中发现cGAMP,并证明其在细菌毒性和先天免疫反应中发挥重要作用。30多年来对CDNs的研究证明,这类信号分子在原核生物和真核生物中广泛存在,并参与控制生物体的各项重要生命过程^[2]。CDNs的发现为研究细菌的生物过程和细胞行为提供了新的角度^[22-23,100]。随着本领域相关研究的开展,一定会有更多的CDNs被发现。CDNs在控制细菌重要生理过程中的普遍性与重要性,远超我们想象^[2]。与其他基于蛋白质相互作用的信息传递方式相比,基于第二信使的信号网络有其独特的优势,因为CDNs这类第二信使结构简单,可不断进化从而适应环境的变化。除此之外,CDNs在细胞内的扩散速度与浓度变化都可以被精准调控且效率极高、速度极快。此外,CDNs可以在不同水平(包括基因表达调控和蛋白变构控制)上控制同一生物过程。这种多层次信号传递体系充分体现了CDNs在细胞内作用的广泛性和重要性。

随着c-di-GMP逐渐在各物种中被发现,c-di-GMP在细菌中存在的普遍性以及它作为第二信使参与调控信号网络的复杂性被更多人认可。

在这篇综述中,我们讨论了关于c-di-GMP的最新研究进展,重点介绍了具有调节c-di-GMP代谢功能的GGDEF结构域蛋白。该结构域在细菌界广泛存在,且功能复杂多变。GGDEF结构域是研究c-di-GMP代谢网络的重要角度。

尽管相关领域的研究取得了一定进展,但未来仍有一些重要的问题需要解决。例如,在以c-di-GMP作为核心调节因子的这个新兴的信号传输模

式中是否包含了更多的CDNs? 该网络还可以控制哪些细胞活动? C-di-GMP在多大程度上控制细菌的基本细胞过程? 控制c-di-GMP调节系统的重要环境输入信号有什么? C-di-GMP信号调节网络的详细架构是什么? 该网络如何与其他信号网络整合? GGDEF结构域除参与调节c-di-GMP代谢外, 是否还参与其他第二信使的代谢?

目前可以肯定的是, 该领域的研究将继续为细菌信号转导、细菌生长和行为等生物学问题提供令人兴奋的新见解。

参考文献 (References)

- [1] ROSS P, WEINHOUSE H, ALONI Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid [J]. *Nature*, 1987, 325(6101): 279-81.
- [2] ALINE DIAS DA P, NATHALIA MARINS DE A, GABRIEL GUARANY DE A, et al. The world of cyclic dinucleotides in bacterial behavior [J]. *Molecules*, 2020, 25(10): 2462.
- [3] JENAL U, REINDERS A, LORI C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2017, 15(5): 271-84.
- [4] ROSS P, MAYER R, BENZIMAN M. Cellulose biosynthesis and function in bacteria [J]. *Microbiol Rev*, 1991, 55(1): 35-58.
- [5] TAL R, WONG H C, CALHOON R, et al. Three *cdg* operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinum*: genetic organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes [J]. *J Bacteriol*, 1998, 180(17): 4416-25.
- [6] JENAL U. Cyclic di-guanosine-monophosphate comes of age: a novel secondary messenger involved in modulating cell surface structures in bacteria [J]? *Curr Opin Microbiol*, 2004, 7(2): 185-91.
- [7] MCKNIGHT G S. Cyclic AMP second messenger systems [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1991, 3(2): 213-7.
- [8] 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.
- [9] PAUL R, JAEGER T, ABEL S, et al. Allosteric regulation of histidine kinases by their cognate response regulator determines cell fate [J]. *Cell*, 2008, 133(3): 452-61.
- [10] 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): e00515-17.
- [11] HENGGE R. High-specificity local and global c-di-GMP signaling [J]. *Trends Microbiol*, 2021, 29(11): 993-1003.
- [12] DUERIG A, ABEL S, FOLCHER M, et al. Second messenger-mediated spatiotemporal control of protein degradation regulates bacterial cell cycle progression [J]. *Genes Dev*, 2009, 23(1): 93-104.
- [13] CHOU S H, GALPERIN M Y. Diversity of cyclic di-GMP-binding proteins and mechanisms [J]. *J Bacteriol*, 2016, 198(1): 32-46.
- [14] AMIKAM D, GALPERIN M Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein [J]. *Bioinformatics*, 2006, 22(1): 3-6.
- [15] GALPERIN M Y. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations [J]. *J Bacteriol*, 2006, 188(12): 4169-82.
- [16] NAVARRO M V, DE N, BAE N, et al. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX [J]. *Structure*, 2009, 17(8): 1104-16.
- [17] SUDARSAN N, LEE E R, WEINBERG Z, et al. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP [J]. *Science*, 2008, 321(5887): 411-3.
- [18] YANG S, WU Y, QU C, et al. Quantitative analysis of the surficial and adhesion properties of the Gram-negative bacterial species *Comamonas testosteroni* modulated by c-di-GMP [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2021, 198: 111497.
- [19] PETCHIAPPAN A, NAIK S Y, CHATTERJI D. Tracking the homeostasis of second messenger cyclic-di-GMP in bacteria [J]. *Biophys Rev*, 2020, 12(3): 719-30.
- [20] SCHIRMER T. C-di-GMP synthesis: structural aspects of evolution, catalysis and regulation [J]. *J Mol Biol*, 2016, 428(19): 3683-701.
- [21] TSCHOWRI N, SCHUMACHER M A, SCHLIMPERT S, et al. Tetrameric c-di-GMP mediates effective transcription factor dimerization to control *Streptomyces* development [J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1136-47.
- [22] CHAN C, PAUL R, SAMORAY D, et al. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(49): 17084-9.
- [23] KRANZUSCH P J, LEE A S Y, WILSON S C, et al. Structure-guided reprogramming of human cGAS dinucleotide linkage specificity [J]. *Cell*, 2014, 158(5): 1011-21.
- [24] AUSMEES N, MAYER R, WEINHOUSE H, et al. Genetic data indicate that proteins containing the GGDEF domain possess diguanylate cyclase activity [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 204(1): 163-7.
- [25] PEI J, GRISHIN N V. GGDEF domain is homologous to adenylyl cyclase [J]. *Proteins*, 2001, 42(2): 210-6.
- [26] PAUL R, WEISER S, AMIOT N C, et al. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain [J]. *Genes Dev*, 2004, 18(6): 715-27.
- [27] BAKER D A, KELLY J M. Structure, function and evolution of microbial adenylyl and guanylyl cyclases [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 52(5): 1229-42.
- [28] HE Q, WANG F, LIU S, et al. Structural and biochemical insight into the mechanism of Rv2837c from *Mycobacterium tuberculosis* as a c-di-NMP phosphodiesterase [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(27): 14386-7.
- [29] HUYNH T N, LUO S, PENSINGER D, et al. An HD-domain phosphodiesterase mediates cooperative hydrolysis of c-di-AMP to affect bacterial growth and virulence [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(7): E747-56.
- [30] ROSS P, ALONI Y, WEINHOUSE H, et al. Control of cellulose synthesis *Acetobacter xylinum*. A unique guanyl oligonucleotide is the immediate activator of the cellulose synthase [J]. *Carbohydr Res*, 1986, 149(1): 101-17.
- [31] VERMA R K, BISWAS A, KAKKAR A, et al. A bacteriophyto-

- chrome mediates interplay between light sensing and the second messenger cyclic di-GMP to control social behavior and virulence [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(13): 108202.
- [32] GALPERIN M Y, KOONIN E V. Divergence and convergence in enzyme evolution [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(1): 21-8.
- [33] GALPERIN M Y, NATALE D A, ARAVIND L, et al. A specialized version of the HD hydrolase domain implicated in signal transduction [J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 1999, 1(2): 303-5.
- [34] GALPERIN M Y, NIKOLSKAYA A N, KOONIN E V. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 203(1): 11-21.
- [35] RYAN R P, FOUHY Y, LUCEY J F, et al. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(17): 6712-7.
- [36] RYAN R P, LUCEY J, O'DONOVAN K, et al. HD-GYP domain proteins regulate biofilm formation and virulence in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Environ Microbiol*, 2009, 11(5): 1126-36.
- [37] SULTAN S Z, PITZER J E, BOQUOI T, et al. Analysis of the HD-GYP domain cyclic dimeric GMP phosphodiesterase reveals a role in motility and the zoootic life cycle of *Borrelia burgdorferi* [J]. *Infect Immun*, 2011, 79(8): 3273-83.
- [38] 满耕孝, 陈一帆, 张燕, 等. 铜绿假单胞菌 PAO1 中 4 个具有 GGDEF-EAL 结构域基因的研究 [J]. *中国病原生物学杂志* (MAN G X, CHEN Y F, ZHANG Y, et al. Studies of four GGDEF-EAL domain-containing genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. *Jornal of Pathogen Biology*), 2016, 11(3): 215-24.
- [39] CHRISTEN M, CHRISTEN B, FOLCHER M, et al. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(35): 30829-37.
- [40] SCHMIDT A J, RYJENKOV D A, GOMELSKY M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains [J]. *J Bacteriol*, 2005, 187(14): 4774-81.
- [41] AN S, WU J, ZHANG L H. Modulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm dispersal by a cyclic-di-GMP phosphodiesterase with a putative hypoxia-sensing domain [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(24): 8160-73.
- [42] PEREGO M, HOCH J A. Protein aspartate phosphatases control the output of two-component signal transduction systems [J]. *Trends Genet*, 1996, 12(3): 97-101.
- [43] PHIPPEN C W, MIKOLAJEK H, SCHLAEFLI H G, et al. Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(24): 4631-6.
- [44] 谷维璇. c-di-GMP 对铜绿假单胞菌生物被膜调控的研究进展 [J]. *中国细胞生物学学报* (GU W X. Research progress on regulation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm by c-di-GMP [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(12): 2289-96.
- [45] ABEL S, BUCHER T, NICOLLIER M, et al. Bi-modal distribution of the second messenger c-di-GMP controls cell fate and asymmetry during the caulobacter cell cycle [J]. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003744.
- [46] COTTER P A, STIBITZ S. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10(1): 17-23.
- [47] BANERJEE P, SAHOO P K, SHEENU, et al. Molecular and structural facets of c-di-GMP signalling associated with biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *Mol Aspects Med*, 2021, 81: 101001.
- [48] PARSEK M R. Controlling the connections of cells to the biofilm matrix [J]. *J Bacteriol*, 2016, 198(1): 12-4.
- [49] SAMBANTHAMOORTHY K, SLOUP R E, PARASHAR V, et al. Identification of small molecules that antagonize diguanylate cyclase enzymes to inhibit biofilm formation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(10): 5202-11.
- [50] NG W L, BASSLER B L. Bacterial quorum-sensing network architectures [J]. *Annu Rev Genet*, 2009, 43: 197-222.
- [51] ZHANG Y, QIU Y, GAO H, et al. OpaR controls the metabolism of c-di-GMP in *Vibrio parahaemolyticus* [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 676436.
- [52] IKEDA K, YANASE Y, HAYASHI K, et al. Amine skeleton-based c-di-GMP derivatives as biofilm formation inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 32: 127713.
- [53] GALLAGHER K A, SCHUMACHER M A, BUSH M J, et al. c-di-GMP arms an anti-sigma to control progression of multicellular differentiation in *Streptomyces* [J]. *Mol Cell*, 2020, 77(3): 586-99.e6.
- [54] CHEN Z H, SCHAAP P. The prokaryote messenger c-di-GMP triggers stalk cell differentiation in *Dictyostelium* [J]. *Nature*, 2012, 488(7413): 680-3.
- [55] SIMM R, MORR M, KADER A, et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility [J]. *Mol Microbiol*, 2004, 53(4): 1123-34.
- [56] SAVAKIS P, DE CAUSMAECKER S, ANGERER V, et al. Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803 [J]. *Mol Microbiol*, 2012, 85(2): 239-51.
- [57] 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.
- [58] MCCARTER L L, GOMELSKY M. Fifty ways to inhibit motility via cyclic di-GMP: the emerging *Pseudomonas aeruginosa* swarming story [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(3): 406-9.
- [59] KUCHMA S L, DELALEZ N J, FILKINS L M, et al. Cyclic di-GMP-mediated repression of swarming motility by *Pseudomonas aeruginosa* PA14 requires the MotAB stator [J]. *J Bacteriol*, 2015, 197(3): 420-30.
- [60] DOW J M, FOUHY Y, LUCEY J F, et al. The HD-GYP domain, cyclic di-GMP signaling, and bacterial virulence to plants [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19(12): 1378-84.
- [61] RYAN R P, FOUHY Y, LUCEY J F, et al. Cyclic di-GMP signalling in the virulence and environmental adaptation of *Xanthomonas campestris* [J]. *Mol Microbiol*, 2007, 63(2): 429-42.
- [62] TAMAYO R, PRATT J T, CAMILLI A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2007, 61: 131-48.
- [63] 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.
- [64] AHMAD I, LAMPROKOSTOPOULOU A, LE GUYON S, et

- al. Complex c-di-GMP signaling networks mediate transition between virulence properties and biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28351.
- [65] HISERT K B, MACCOSS M, SHILOH M U, et al. A glutamate-alanine-leucine (EAL) domain protein of *Salmonella* controls bacterial survival in mice, antioxidant defence and killing of macrophages: role of cyclic diGMP [J]. Mol Microbiol, 2005, 56(5): 1234-45.
- [66] KUMAGAI Y, MATSUO J, HAYAKAWA Y, et al. Cyclic di-GMP signaling regulates invasion by *Ehrlichia chaffeensis* of human monocytes [J]. J Bacteriol, 2010, 192(16): 4122-33.
- [67] LACEY M M, PARTRIDGE J D, GREEN J. *Escherichia coli* K-12 YfgF is an anaerobic cyclic di-GMP phosphodiesterase with roles in cell surface remodelling and the oxidative stress response [J]. Microbiology, 2010, 156(Pt 9): 2873-86.
- [68] MCWHIRTER S M, BARBALAT R, MONROE K M, et al. A host type I interferon response is induced by cytosolic sensing of the bacterial second messenger cyclic-di-GMP [J]. J Exp Med, 2009, 206(9): 1899-911.
- [69] SAUER J D, SOTELO-TROHA K, VON MOLTKE J, et al. 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 [J]. Infect Immun, 2011, 79(2): 688-94.
- [70] TISCHLER A D, CAMILLI A. Cyclic diguanylate regulates *Vibrio cholerae* virulence gene expression [J]. Infect Immun, 2005, 73(9): 5873-82.
- [71] YANG F, TIAN F, SUN L, et al. A novel two-component system PdeK/PdeR regulates c-di-GMP turnover and virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2012, 25(10): 1361-9.
- [72] YANG F, XUE D, TIAN F, et al. Identification of c-di-GMP signaling components in *Xanthomonas oryzae* and their orthologs in *Xanthomonads* involved in regulation of bacterial virulence expression [J]. Front Microbiol, 2019, 10: 1402.
- [73] EDMUNDS A C, CASTIBLANCO L F, SUNDIN G W, et al. Cyclic di-GMP modulates the disease progression of *Erwinia amylovora* [J]. J Bacteriol, 2013, 195(10): 2155-65.
- [74] HE Y W, NG A Y, XU M, et al. *Xanthomonas campestris* cell-cell communication involves a putative nucleotide receptor protein Clp and a hierarchical signalling network [J]. Mol Microbiol, 2007, 64(2): 281-92.
- [75] CHEN W, KUOLEE R, YAN H. The potential of 3',5'-cyclic diguanylic acid (c-di-GMP) as an effective vaccine adjuvant [J]. Vaccine, 2010, 28(18): 3080-5.
- [76] WAN C, ZHANG P, LEE D J, et al. Disintegration of aerobic granules: role of second messenger cyclic di-GMP [J]. Bioresour Technol, 2013, 146: 330-5.
- [77] HECHT G B, NEWTON A. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus* [J]. J Bacteriol, 1995, 177(21): 6223-9.
- [78] WHITELEY C G, LEE D J. Bacterial diguanylate cyclases: structure, function and mechanism in exopolysaccharide biofilm development [J]. Biotechnol Adv, 2015, 33(1): 124-41.
- [79] RYJENKOV D A, TARUTINA M, MOSKVIN O V, et al. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain [J]. J Bacteriol, 2005, 187(5): 1792-8.
- [80] WASSMANN P, CHAN C, PAUL R, et al. Structure of BeF3--modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition [J]. Structure, 2007, 15(8): 915-27.
- [81] TAYLOR B L, ZHULIN I B. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1999, 63(2): 479-506.
- [82] ZHANG Y, GUO J, ZHANG N, et al. Characterization and analysis of a novel diguanylate cyclase PA0847 from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 [J]. Infect Drug Resist, 2019, 12: 655-65.
- [83] TISCHLER A D, CAMILLI A. Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation [J]. Mol Microbiol, 2004, 53(3): 857-69.
- [84] CHRISTEN B, CHRISTEN M, PAUL R, et al. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling [J]. J Biol Chem, 2006, 281(42): 32015-24.
- [85] KAZMIERCZAK B I, LEBRON M B, MURRAY T S. Analysis of FimX, a phosphodiesterase that governs twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Mol Microbiol, 2006, 60(4): 1026-43.
- [86] QI Y, CHUAH M L, 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.
- [87] DE N, PIRRUCCELLO M, KRASTEVA P V, et al. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase Wspr [J]. PLoS Biol, 2008, 6(3): e67.
- [88] CHEN Y, LIU S, LIU C, et al. Desbis (PA2771) from *Pseudomonas aeruginosa* is a highly active diguanylate cyclase with unique activity regulation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 29499.
- [89] SESHASAYEE A S, FRASER G M, LUSCOMBE N M. Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity [J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(18): 5970-81.
- [90] YANG C Y, CHIN K H, CHUAH M L, et al. The structure and inhibition of a GGDEF diguanylate cyclase complexed with (c-di-GMP)(2) at the active site [J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2011, 67(Pt 12): 997-1008.
- [91] ROGERS E A, TEREKHOVA D, ZHANG H M, et al. Rrp1, a cyclic-di-GMP-producing response regulator, is an important regulator of *Borrelia burgdorferi* core cellular functions [J]. Mol Microbiol, 2009, 71(6): 1551-73.
- [92] AN S Q, CHIN K H, FEBRER M, et al. A cyclic GMP-dependent signalling pathway regulates bacterial phytopathogenesis [J]. EMBO J, 2013, 32(18): 2430-8.
- [93] ALMBLAD H, HARRISON J J, RYBTKE M, et al. The cyclic AMP-Vfr signaling pathway in *Pseudomonas aeruginosa* is inhibited by cyclic di-GMP [J]. J Bacteriol, 2015, 197(13): 2190-200.
- [94] ZHRINGER F, LACANNA E, JENAL U, et al. Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase [J]. Structure, 2013, 21(7): 1149-57.
- [95] PAUL R, ABEL S, WASSMANN P, et al. Activation of the diguanylate cyclase PleD by phosphorylation-mediated dimerization [J]. J Biol Chem, 2007, 282(40): 29170-7.

- [96] CRISS W E. Second messenger system [J]. *Oncology*, 1974, 30(1): 43-80.
- [97] BOTSFORD J L, HARMAN J G. Cyclic AMP in prokaryotes [J]. *Microbiol Rev*, 1992, 56(1): 100-22.
- [98] BOWLER C, NEUHAUS G, YAMAGATA H, et al. Cyclic GMP and calcium mediate phytochrome phototransduction [J]. *Cell*, 1994, 77(1): 73-81.
- [99] DANILCHANKA O, MEKALANOS J J. Cyclic dinucleotides and the innate immune response [J]. *Cell*, 2013, 154(5): 962-70.
- [100] WITTE G, HARTUNG S, BUTTNER K, et al. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 167-78.
- [101] DAVIES B W, BOGARD R W, YOUNG T S, et al. Coordinated regulation of accessory genetic elements produces cyclic dinucleotides for *V. cholerae* virulence [J]. *Cell*, 2012, 149(2): 358-70.
- [102] HORNUNG V, HARTMANN R, ABLASSER A, et al. OAS proteins and cGAS: unifying concepts in sensing and responding to cytosolic nucleic acids [J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(8): 521-8.