

DOI:10.13350/j.cjpb.240607

• 论著 •

铜绿假单胞菌 PAO1 中环二鸟苷单磷酸代谢蛋白 PA0285 感应环境因素的研究^{*}

海娥^{1,2}, 张慧敏¹, 高晓菁¹, 张小敏³, 郭嘉义³, 黄卫东^{1**}

(1. 宁夏医科大学基础医学院生物化学与分子生物学系, 宁夏银川 750000; 2. 宁夏疾病预防控制中心; 3. 宁夏医科大学科技中心)

【摘要】 目的 分析铜绿假单胞菌中环二鸟苷单磷酸(c-di-GMP)代谢蛋白 PA0285 感应环境因素的作用,探讨其参与 c-di-GMP 信号转导的机制。**方法** 通过 PCR 技术对 *pa0285* 转座子突变菌株进行遗传背景确认;以铜绿假单胞菌野生型 PAO1 和 2 株 PA0285 插入失活突变菌株为研究对象,选定 24 种化合物,利用绿色荧光蛋白(GFP)报告基因融合方法及刚果红结合试验,检测细菌胞内 c-di-GMP 水平;通过生物膜定量试验分析特定环境因素对细菌生物膜形成的影响;使用 CAS 平板法进一步分析 PA0285 在特定环境条件下对细菌分泌嗜铁素的调控。**结果** 细菌基因组 PCR 结果表明转座子插入致 *pa0285* 基因失活;GFP 报告基因融合、刚果红结合试验及生物膜定量检测结果显示,与野生型 PAO1 相比,突变菌 $\Delta pa0285$ 胞内 c-di-GMP 水平升高($F=88.92, P<0.01$),生物膜合成增加($F=15.82, P<0.01$);将异亮氨酸(Ile)或缬氨酸(Val)添加至培养基时,突变菌 $\Delta pa0285$ 胞内 c-di-GMP 水平与 PAO1 相比降低($F=15.17, 60.17, P<0.01$),生物膜合成与 PAO1 比较差异无统计学意义($F=3.462, 0.5018, P=0.10001, 0.6287$)。CAS 定量检测结果显示,与野生型 PAO1 相比,突变菌 $\Delta pa0285$ 分泌嗜铁素含量下降($F=58.22, P<0.01$);CAS 平板观察结果显示,无外源化合物添加时,突变菌 $\Delta pa0285$ 菌落的螯合圈与野生型 PAO1 相比偏小,将精氨酸(Arg)、MgCl₂、CaCl₂ 添加至培养基时,突变菌 $\Delta pa0285$ 的菌落螯合圈与 PAO1 相比大小相近;将 Val 和 Ile 添加至培养基时,突变菌 $\Delta pa0285$ 的菌落螯合圈与野生型 PAO1 相比偏大。**结论** 铜绿假单胞菌 PAO1 中代谢蛋白 PA0285 具有磷酸二酯酶(PDE)的活性;PA0285 通过调控胞内 c-di-GMP 水平,进而影响生物膜合成及嗜铁素的分泌,以感应环境中氨基酸 Val 和 Ile。

【关键词】 铜绿假单胞菌 PAO1; PA0285 蛋白; 环二鸟苷单磷酸; 环境信号

【文献标识码】 A **【文章编号】** 1673-5234(2024)06-0653-06

[Journal of Pathogen Biology. 2024 Jun.;19(6):653-658.]

The functions of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 c-di-GMP metabolic protein PA0285 in sensing environmental factors

HAI E^{1,2}, ZHANG Huimin¹, GAO Xiaojin¹, ZHANG Xiaomin³, GUO Jiayi³, HUANG Weidong¹ (1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medicine, Ningxia Medicine University, Yinchuan 750000, China; 2. Ningxia Center for Disease Control and Prevention; 3. Science and Technology Center, Ningxia Medical University)***

【Abstract】 Objective To analyze the role of a cyclic diguanosine monophosphate (c-di-GMP) metabolite protein PA0285 of *P. aeruginosa* PAO1 in sensing environmental factors, and to explore the mechanisms of PA0285 involved in c-di-GMP signal transduction. **Methods** The genetic background of the *pa0285* transposon mutant strains were confirmed by genomic DNA PCR. 24 compounds were selected as environmental stimuli. The intracellular c-di-GMP levels of bacteria were monitored by GFP (green fluorescent protein) reporter gene fusion method and Congo red staining assay. The effects of individual environmental factors on bacterial biofilm formation were analyzed by crystal violet staining method. Bacterial siderophore production under specific environmental conditions was further analyzed by CAS (Chrome azurol S) plates. **Results** Bacterial genomic DNA PCR experiments showed that the transposon insertion inactivated the *pa0285* gene. The results of GFP reporter gene fusion method, Congo red staining assay and biofilm formation test showed that compared with WT PAO1, the intracellular c-di-GMP level of mutants $\Delta pa0285$ increased ($F=88.92, P<0.01$), the biofilm synthesis of mutants $\Delta pa0285$ increased ($F=15.82, P<0.01$). when isoleucine (Ile) or valine (Val) were added to the medium, the intracellular c-di-GMP level of mutants $\Delta pa0285$ decreased compared to WT PAO1 ($F=15.17, 60.17, P<0.01$), and the difference in biofilm synthesis was not statistically significant compared to WT PAO1

* **【基金项目】** 国家自然科学基金项目(No. 81960365);宁夏回族自治区自然科学基金项目(No. 2022AAC03183)。

** **【通讯作者】** 黄卫东, E-mail: weidong1969@hotmail.com

【作者简介】 海娥(1992-),女,宁夏银川人,硕士,卫生检验主管技师,主要从事病原生物学的研究。E-mail: 951793582@qq.com

($F=3.462, 0.5018, P=0.10001, 0.6287$). CAS assay showed that compared with WT PAO1, the siderophore content of mutants $\Delta pa0285$ were decreased ($F=58.22, P<0.01$). CAS plate showed that the chelation circle of $\Delta pa0285$ was smaller than WT PAO1 when no exogenous compounds were added to the medium. When arginine (Arg), $MgCl_2$, and $CaCl_2$ were added to the medium, the chelation circle of the $\Delta pa0285$ was similar to WT PAO1. When Val and Ile were added to the medium, the chelation circle of $\Delta pa0285$ was larger than WT PAO1 and when arginine (Arg). **Conclusion**

PA0285, a metabolic protein of c-di-GMP in *P. aeruginosa* PAO1, is an active phosphodiesterase (PDE), which senses amino acids Val and Ile from environment by regulates the intracellular c-di-GMP level, and then affects biofilm synthesis and siderophore biosynthesis.

【Keywords】 *Pseudomonas aeruginosa* PAO1; PA0285; c-di-GMP; environmental signal

细菌为了适应复杂多样且不断变化的环境条件,进化出多种高效且精确的信号转导系统,包括双组分系统^[1]、群体感应系统和第二信使转导系统^[2]等,以帮助其监测各类环境条件的变化并迅速响应。在细菌信号转导系统中,存在第二信使分子如环腺苷单磷酸(cAMP)、环鸟苷单磷酸(cGMP)及环二鸟苷单磷酸(c-di-GMP)等^[3],其中 c-di-GMP 在调节微生物毒力和生物膜形成中发挥着重要作用^[4]。近年来,关于细菌胞内 c-di-GMP 代谢的研究在细菌信号转导领域备受关注。细菌胞内 c-di-GMP 的水平由其合成酶二鸟苷酸环化酶(DGCs)和水解酶磷酸二酯酶(PDEs)调控^[5]。当细菌表面受体接收到胞外信号时,细菌会根据胞外信号调节胞内合成酶与水解酶的催化活性,改变胞内 c-di-GMP 的浓度,下游相关受体分子通过感知胞内 c-di-GMP 浓度的变化,对相关代谢途径进行调节,从而调控细菌多种生物学功能^[6-8]。因此, c-di-GMP 胞内水平对细菌的生命活动有非常重要的作用,其中,高水平的胞内 c-di-GMP 通过限制细菌的运动,促进生物膜的形成,使得病原菌的致病力上升、耐药性增强^[9]。

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)是一种革兰阴性条件致病菌,常从肺囊性纤维化患者肺部、慢性感染患者创面及植入性医疗器械相关感染中分离获取,是引起医源性感染的重要病原体之一^[10]。由于其耐药率升高,已被世界卫生组织(WHO)列为人类健康最具威胁性的病原菌之一,铜绿假单胞菌的模式菌株 PAO1 基因组共编码 42 个 c-di-GMP 代谢蛋白^[11]。这些 c-di-GMP 代谢蛋白除了含有 C 端的催化结构域外,其 N 端通常还含有一些和信号感应有关的结构域,这些结构域包括 PAS、GAF 和 REC 等^[12]。

胞外环境信号的变化对细菌的生存能力、感染力及生理活动都有着非常重要的影响。目前,关于铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢蛋白的研究多集中在探讨 DGCs 与 PDEs 的催化活性对其生物学功能的影响^[8,13-15],但关于其响应哪些环境因素,及如何响应这些环境因素,目前尚不完全清楚。本研究拟通过对铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢蛋白 PA0285

调控自身酶活性响应环境信号的研究,筛选出 PA0285 参与感应的环境信号,初步研究其感应并调控的过程,以期为后续 c-di-GMP 信号转导机制研究提供理论基础。

材料与方法

1 材料

1.1 菌株和质粒 铜绿假单胞菌野生型 PAO1 与 $pa0285$ 基因转座子插入突变菌($\Delta pa0285$ -1、 $\Delta pa0285$ -2)由美国 Manoil 实验室惠赠, P_{cdrA} -GFP 质粒由同行惠赠。

1.2 主要试剂 gDNA 提取试剂盒和 DNA 聚合酶购于北京全式金生物技术有限公司;胰蛋白胨和酵母提取物购于英国 OXOID 公司;Maker 和氯化钠购于生工生物工程上海(股份)有限公司;刚果红购于美国 Sigma 公司;CAS 检测液购于北京 Coolaber 公司。

1.3 主要仪器设备 PCR 仪购自香港 Gene Company Limited 公司;电泳仪购自北京六一仪器厂;电转仪和凝胶成像系统购自美国 BIO-RAD 公司;高速冷冻离心机购自德国 Eppendorf 公司;酶标仪购自美国 Thermo Fisher 公司;多功能微孔板检测仪购自美国 BioTek 公司。

2 方法

2.1 PA0285 转座子突变菌株遗传背景确认 通过 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)数据库对 PA0285 蛋白结构域进行预测。收集细菌的过夜培养物,提取 gDNA 作为模板,以野生型 PAO1 基因组 DNA 为对照,使用基因 $pa0285$ 及转座子特异引物配对,引物序列见表 1,对转座子插入致基因失活的突变菌进行 PCR 验证。

表 1 基因转座子突变验证引物组合及序列
Table 1 Primer combinations and sequences for gene transposon mutation verification

引物名称 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence
PA0285-F1	CCGCCAGGCTCAGTCTTC
LacZ	GGGTAACGCCAGGGTTTCC
PA0285-F2	CGGGTGTAGAAGGCGTAGG
PhoA	CGGGTGCAGTAACGCCCT

表 2 化合物明细表
Table 2 Detailed list of compounds

化合物名称 Compound name	简写 Abbreviation	浓度 Concentration
甘氨酸	Gly	10 mmol/L
缬氨酸	Val	15 mmol/L
亮氨酸	Leu	10 mmol/L
异亮氨酸	Ile	15 mmol/L
羟脯氨酸	Hyp	10 mmol/L
苯丙氨酸	Phe	10 mmol/L
酪氨酸	Tyr	5 mmol/L
色氨酸	Trp	10 mmol/L
精氨酸	Arg	10 mmol/L
鸟氨酸	Orn	10 mmol/L
硫酸亚铁	FeSO ₄	4 mmol/L
硫酸锰	MnSO ₄	4 mmol/L
氯化钙	CaCl ₂	3 mmol/L
氯化镁	MgCl ₂	4 mmol/L
硫酸铵	(NH ₄) ₂ SO ₄	4 mmol/L
鼠李糖	Rhamnose	3%
蔗糖	Sucrose	2%
葡萄糖	Glucose	2%
麦芽糖	Maltose	2%
乳糖	Lactose	1%
尿素	Urea	8 mmol/L
咪唑	Imidazole	5 mmol/L
α-酮戊二酸	α-ketoglutaric acid	1 mmol/L
1,6-二磷酸果糖	FDP	8 mmol/L

2.2 胞内 c-di-GMP 水平测定 通过将 *P_{cdrA}*-GFP 质粒电转至野生型 PAO1、突变菌 $\Delta pa0285$ -1 及 $\Delta pa0285$ -2 中,构建含 *P_{cdrA}*-GFP 报告基因(*c*-di-GMP 响应的 *cdrA* 启动子与编码绿色荧光蛋白基因融合)的菌体。电转后的单克隆菌株在含庆大霉素的 LB 液体培养基中过夜培养作为种子液,吸取 10 μ L 种子至 2 mL 含化合物的 LB 液体培养基,37 $^{\circ}$ C、220 r/min 培养 24 h,测 A_{600} ;并吸取 1 mL 菌液至 EP 管中,4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 6 min,弃上清液,吸取 1 mL PBS 重悬菌体,将重悬后的菌悬液加至黑色酶标板,测任意荧光强度单位(FIU),激发波长 485 nm,发射波长 520 nm,增益 100;测得的荧光值 FIU 与菌液的生长情况 A_{600} 进行归一化处理,计算结果得到相对荧光单位(RFU),测得的 RFU 与胞内 c-di-GMP 含量成正比。

2.3 刚果红结合试验 取 2 μ L 过夜培养的菌液,滴加至刚果红为 40 μ g/mL 的平板表面,37 $^{\circ}$ C 培养 72 h。观察菌苔颜色并记录。

2.4 生物膜形成检测 过夜培养的菌液按照 1 : 100 的比例接种于含特定化合物培养基的聚丙烯试管中,培养相应时间后,弃去菌液,经结晶紫染色 30 min 后,用双蒸水缓慢冲洗,倒置晾干后加入 5 mL 95%乙醇封闭溶剂,常温摇床培养 12 h,测定 A_{595} 。

2.5 嗜铁素平板观察及相对含量测定 取 1 μ L 过夜

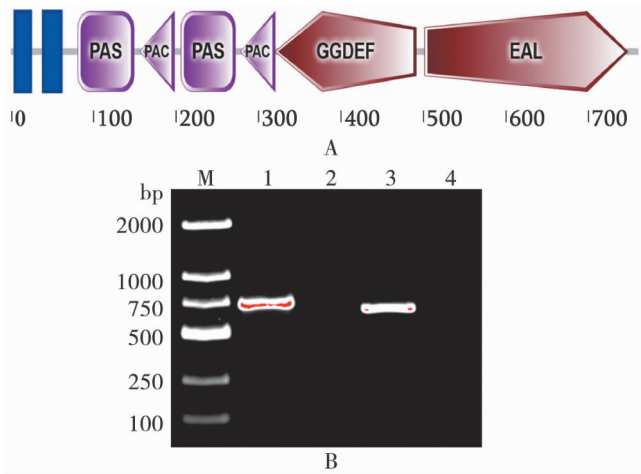
培养的菌液,滴加至 CAS 固体培养基表面,37 $^{\circ}$ C 培养 30 h,观察菌落周围的螯合圈。将过夜培养的 5 mL 菌液离心后,取上清与 CAS 检测液等体积混合,避光 30 min 后,用双蒸水对照调零,测 A_{630} (A_s),以空白培养基吸光值作参比值(A_r),依据公式 $[(A_r-A_s)/A_r] \times 100\%$ 计算,即为嗜铁素的相对含量。

2.6 统计学分析 采用 GraphPad Prism9.0 软件对数据进行统计分析,多个样本均数间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 基因组 DNA 的 PCR 试验验证转座子插入致 *pa0285* 基因失活

PA0285 结构预测显示,其含有 2 个 PAS,1 个 GGDEF 及 1 个 EAL 结构域(图 1A)。PCR 结果见图 1B,泳道 2 和 4 无 PCR 产物,即 PAO1 不含转座子,泳道 1 和 3 有 PCR 产物,即突变菌 $\Delta pa0285$ -1 及 $\Delta pa0285$ -2 的转座子均位于基因 *pa0285* 上,导致其失活。



A SMART 预测的 PA0285 结构 B PCR 验证突变菌株 $\Delta pa0285$ 转座子插入致基因失活 M DNA Marker(2 000 bp) 1,3 野生型 PAO1 2,4 分别为突变株 $\Delta pa0285$ -1 和 $\Delta pa0285$ -2

图 1 PA0285 结构的预测及验证转座子插入导致 *pa0285* 基因失活的琼脂糖凝胶电泳

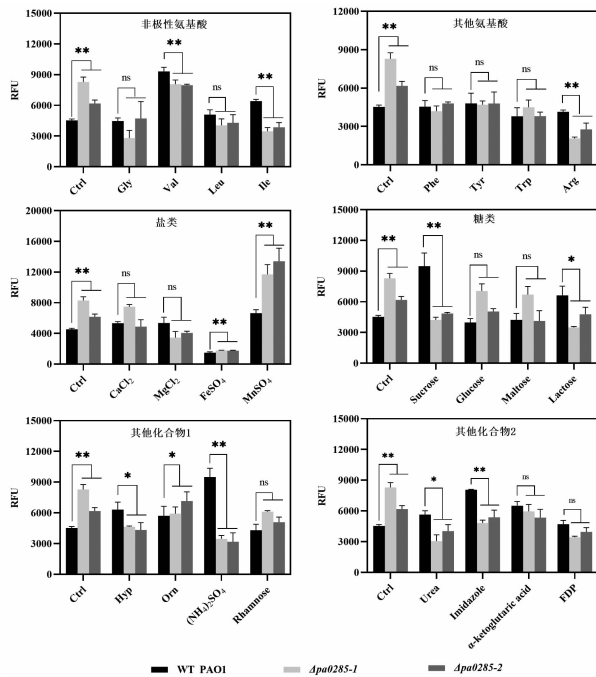
A The structure of PA0285 was predicted by the SMART B PCR verification of transposon insertion of mutant strain $\Delta pa0285$ M DNA Marker (2000 bp) 1,3 WT PAO1 2,4 $\Delta pa0285$ -1 and $\Delta pa0285$ -2

Fig. 1 Prediction of PA0285 structure and gDNA PCR for verification of *pa0285* inactivation caused by transposon insertion

2 PA0285 可能通过调控胞内 c-di-GMP 水平感应环境信号

本研究选定 24 种化合物作为胞外环境信号进行检测,未添加任何化合物时,突变菌 $\Delta pa0285$ 胞内 c-di-GMP 水平均显著高于野生型 PAO1($F = 88.92, P < 0.01$)(图 2)。当添加 Val(缬氨酸)、Ile(异亮氨酸)、Arg(精氨酸)、Hyp(羟脯氨酸)、蔗糖、乳糖、硫酸

铵、尿素和咪唑作为外源环境信号,突变菌 $\Delta pa0285$ 的胞内 c-di-GMP 水平均低于野生型 PAO1 ($F = 15.17, 60.17, 36.87, 9.515, 42.47, 17.65, 71.32, 16.63, 47.74, P < 0.05$)。



注:组内比较,突变株与野生型比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns 差异无统计学意义。

图2 GFP 报告基因法测定胞内 c-di-GMP 含量, 分析 PA0285 感应的化合物

Note: Comparison within groups, mutant vs WT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ns no significance

Fig. 2 The compound-induced changes in intracellular c-di-GMP concentration of WT PAO1 and mutants $\Delta pa0285$, as quantified using a GFP reporter

根据荧光检测结果,选定7种化合物,进行刚果红结合试验检测,无任何外源化合物添加时,突变菌 $\Delta pa0285$ 菌苔颜色与野生型 PAO1 相比均较深(图3)。当刚果红平板中有 Arg、Ile、Val、蔗糖和咪唑存在时,突变菌 $\Delta pa0285$ 菌苔颜色与野生型 PAO1 相比均较浅。

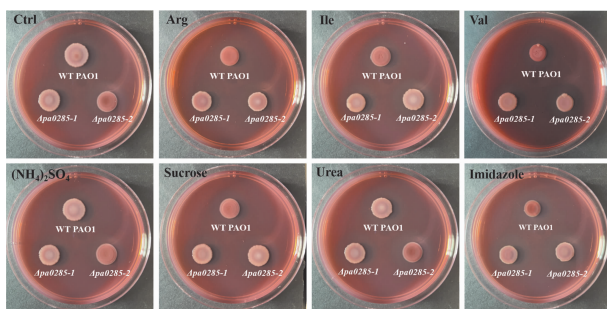
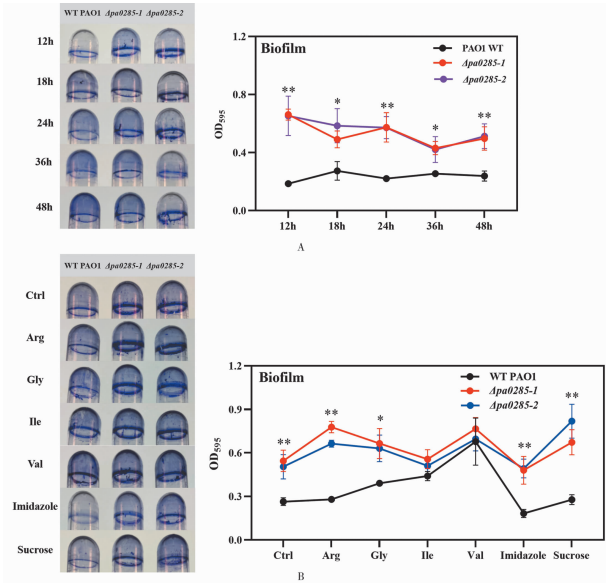


图3 刚果红结合试验分析化合物对胞内 c-di-GMP 合成的影响
Fig. 3 Congo red staining of WT PAO1 and mutants $\Delta pa0285$ in different compounds

3 PA0285 在特定环境条件下调控细菌生物膜合成

通过生物膜结晶紫染色及定量统计的方法,分析各菌株在培养 12、18、24、36 和 48 h 时生物膜形成情况,突变菌 $\Delta pa0285$ 的生物膜合成高于野生型 PAO1 ($F = 33.34, 10.77, 23.41, 8.635, 14.30, P < 0.05$) (图 4A)。



注:组内比较,突变株与野生型比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ A 不同时间点,生物膜合成检测 B 添加特定化合物,生物膜合成检测

图4 特定条件下野生型 PAO1 和突变菌 $\Delta pa0285$ 生物膜形成检测

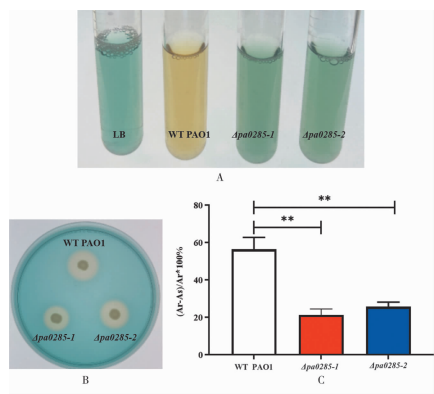
Note: Comparison within groups, mutant vs WT. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ A Detection of the biofilm synthesis at different time points B Detection of the biofilm synthesis in different compounds

Fig. 4 Biofilm formation of WT PAO1 and mutants $\Delta pa0285$ in different culture

依据刚果红试验结果,选定6种化合物作为细菌胞外环境信号进行检测,未添加任何化合物时,突变菌 $\Delta pa0285$ 的生物膜合成高于野生型 PAO1 ($F = 15.82, P < 0.01$) (4B)。分别添加 Arg(精氨酸)、Gly(甘氨酸)、咪唑(Imidazole)或蔗糖(Sucrose)至培养基时,突变菌 $\Delta pa0285$ 的生物膜合成高于野生型 PAO1 ($F = 280.1, 10.42, 19.71, 31.89, P < 0.05$)。添加 Ile(异亮氨酸)或 Val(缬氨酸)至培养基时,突变菌 $\Delta pa0285$ 的生物膜合成与野生型 PAO1 比较差异无统计学意义 ($F = 3.462, 0.5018, P = 0.10001, 0.6287$)。

4 在特定环境条件下 PA0285 调控细菌分泌嗜铁素

当 CAS 检测液中的铁离子被细菌分泌的嗜铁素夺走时,培养基的颜色由蓝色变为黄色(图 5A)。野生型 PAO1 和突变菌 $\Delta pa0285$ 产嗜铁素的试验研究表明,野生型 PAO1 及突变菌株均为产嗜铁素菌株(图 5B)。突变菌 $\Delta pa0285$ 分泌嗜铁素的含量低于野生型 PAO1 ($F = 58.22, P < 0.01$,图 5C)。



注:突变株与野生型比较, * * $P<0.01$ A 嗜铁素检测 B 筛选产嗜铁素菌株 C 嗜铁素相对含量测定

图 5 野生型 PAO1 和突变菌 $\Delta pa0285$ 产嗜铁素的检测

Note: mutant vs WT. * * $P<0.01$ A Detection of siderophore B Screened siderophore-producing bacteria C Determination of relative concentration of siderophore

Fig. 5 Production of siderophore by WT PAO1 and mutants $\Delta pa0285$

正常情况下,突变菌 $\Delta pa0285$ 菌落的整合圈与野生型 PAO1 相比偏小,当添加精氨酸(Arg)、 $MgCl_2$ 、 $CaCl_2$ 至 CAS 平板中时,突变菌 $\Delta pa0285$ 菌落的整合圈与野生型 PAO1 大小相近;当 CAS 平板中有 Val 或 Ile 存在时,突变菌 $\Delta pa0285$ 菌落的整合圈与野生型 PAO1 相比偏大(图 6)。

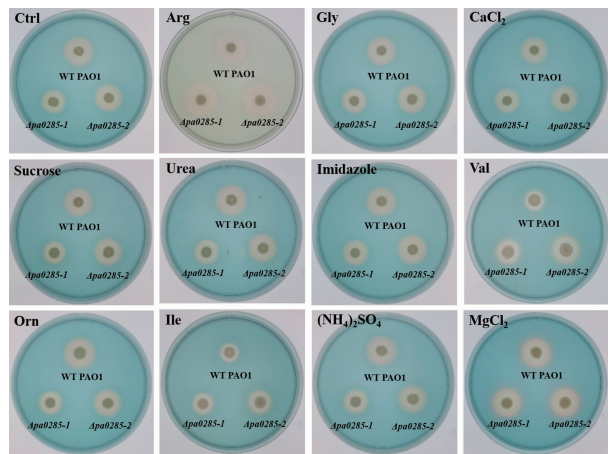


图 6 化合物对野生型 PAO1 和突变菌 $\Delta pa0285$ 产嗜铁素的影响

Fig. 6 Production of siderophore by WT PAO1 and mutants $\Delta pa0285$ in the presence of a certain compound

讨 论

细菌需要不断地适应外部环境得以生存,第二信使 c-di-GMP 在细菌应对环境变化的过程中起着重要调节作用。铜绿假单胞菌 PAO1 是实验室研究 c-di-GMP 调控机制常用的模式菌株,共编码 42 种参与调节胞内 c-di-GMP 水平的蛋白,对这些蛋白的结构和功能分析,揭示了其催化机制、调控原理及反馈控制^[11,16-17],其中 PA0285 蛋白不仅有 GGDEF 和 EAL 双催化结构域,还包含 2 个 PAS 感应结构域,具有对胞外不同环境信号响应的结构基础。

由于 PA0285 具有 GGDEF 及 EAL 结构域,提示它可能参与细菌胞内 c-di-GMP 的合成及降解。为了明确它在调控胞内 c-di-GMP 水平过程中的作用,通过 P_{cdrA} -GFP 报告基因融合法定量检测铜绿假单胞菌野生型 PAO1 和突变株 $\Delta pa0285$ 的胞内 c-di-GMP 水平,结果表明 $pa0285$ 基因失活使 c-di-GMP 合成增加,这提示 PA0285 可能具有 PDE 活性。由于细菌胞内 c-di-GMP 升高会导致胞外多糖等物质的产生,增强刚果红的染色,使细菌菌苔的颜色变深,呈现为红色或紫色^[18]。本研究的刚果红结合试验结果进一步证实 PA0285 具有 PDE 活性,与 Cai 等^[19] 研究结果一致。

蛋白结构预测结果显示 PA0285 的 N 端含有的 PAS 结构域,具有参与细菌对胞外环境信号感应的结构基础。选定 24 种化合物作为胞外环境信号,对此进行分析。胞内 c-di-GMP 含量检测结果表明,PA0285 可能参与细菌对胞外环境信号 Val(缬氨酸)、Ile(异亮氨酸)、Arg(精氨酸)、蔗糖、硫酸铵、尿素和咪唑的感应,与刚果红结合试验共同分析,结果显示,当感应到胞外环境中的 Arg、Ile、Val、蔗糖和咪唑时,PA0285 可能会调控细菌胞内 c-di-GMP 含量升高,从而应对这种变化。

生物膜(Biofilm)是细菌为了适应环境、利于生存,从而与胞外多糖、胞外 DNA、蛋白质等组成的复杂结构,对细菌的耐药性和致病性具有重要作用。多项研究报道证实,铜绿假单胞菌的胞内 c-di-GMP 水平对细菌生物膜形成能力和运动能力起着调控作用^[9,20]。根据生物膜形成试验结果,推断 PA0285 参与调控细菌生物膜的消散。结合细菌胞内 c-di-GMP 含量测定结果,也印证了相关文献的报道,即胞内高水平的 c-di-GMP 促使生物膜的形成增加^[9]。在不同环境中,PA0285 对细菌生物膜形成影响的检测结果表明,当胞外环境中存在氨基酸 Val 或 Ile 时,PA0285 通过调控胞内 c-di-GMP 水平的上升、进而促进生物膜的形成以应对这种变。

嗜铁素(siderophore)是细菌分泌的一种可以整合环境中铁离子的重要衍生物,对细菌生物膜的形成和致病性至关重要。根据细菌分泌嗜铁素含量的检测结果,推断 PA0285 参与调控细菌分泌嗜铁素的过程。Gac/Rsm 系统是铜绿假单胞菌的一个保守信号转导系统,控制细菌毒力因子的产生,C-di-GMP 信号转导系统与 Gac/Rsm 信号转导系统协同参与调控铜绿假单胞菌分泌嗜铁素^[21-23]。本研究结果表明,无任何外源化合物时,PA0285 上调嗜铁素合成相关基因的表达;当环境中存在 Val 或 Ile 时,PA0285 通过下调嗜铁素合成相关基因的表达,细菌可以更好地适应环境

中存在的氨基酸 Val 或 Ile。

PAS 结构域的三级结构较为保守,但其一级结构的序列相似性低至 20%^[24]。由于底物和辅助因子结合的差异,PAS 结构域也表现出复杂、多样的感应功能。本项研究的结果表明,PA0285 通过 N 端的 PAS 结构域识别胞外信号氨基酸 Val 和 Ile,并将该信号传递至 C 端,使 C 端 GGDEF-EAL 结构域酶活性发生变化,影响调控胞内 c-di-GMP 水平升高,导致细菌部分生物学功能的发生改变。

当前抗生素的广泛使用,导致多重耐药细菌的出现,经典抗生素的使用效果越来越差,临床上对抗菌感染的选择越来越有限,未来的研究需要寻找新的抗菌治疗靶点和免疫预防方案,目前广泛认为第二信使分子 c-di-GMP 是抗菌研究的潜在靶点之一。本研究初步探索了铜绿假单胞菌 PAO1 如何通过 c-di-GMP 信号转导机制对环境信号进行响应,并筛选出了 PA0285 参与感应的氨基酸 Val 和 Ile,为后续 c-di-GMP 信号转导机制研究提供了坚定的工作基础,并对未来抗菌策略的研究及优化提供理论参考。

【参考文献】

- [1] 李猛,李冠华,苑琳. 医院常见病原菌双组分系统在耐药机理方面的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2016,11(8):760-764,762.
- [2] Hendry TA, Gallagher KA. Cyclic-di-GMP promotes bacteria-host association[J]. Nat Microbiol,2023,8(10):1758-1759.
- [3] Kalia D, Merey G, Nakayama S, et al. Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis[J]. Chem Soc Rev,2013,42(1):305-341.
- [4] 赵文瑾,尚道涵,谢来工,等. 铜绿假单胞菌环二鸟苷酸代谢及其调控生物膜形成研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2022,17(12):1468-1474.
- [5] Jenal U, Reinders A, Lori C. Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire[J]. Nat Rev Microbiol,2017,15(5):271-284.
- [6] Jenal U, Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria [J]. Annu Rev Genet,2006,40(1):385-407.
- [7] O'Connor JR, Kuwada NJ, 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):720-729.
- [8] 席那仁,海娥,张小敏,等. 铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA2072 的生物学分析[J]. 微生物学通报,2023,50(5):2113-2126.
- [9] Ha DG, O'Toole GA, Ghannoum M, et al. C-di-GMP and its effects on biofilm formation and dispersion: a *Pseudomonas aeruginosa* review [J]. Microbiol Spectr,2015,3(2).
- [10] Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections [J]. N Engl J Med,2014,370(13):1198-1208.
- [11] Stover CK, Pham Xq, Fau-Erwin AL, Erwin Al, Fau-Mizoguchi SD, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen[J]. Nature,2000,406(6799):959-964.
- [12] Eilers K, Kuok Hoong Yam J, Morton R, et al. Phenotypic and integrated analysis of a comprehensive *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 library of mutants lacking cyclic-di-GMP related genes [J]. Front Microbiol,2022,13:949597.
- [13] Yao Y, Xi N, Hai E, et al. PA0575 (RmcA) interacts with other c-di-GMP metabolizing proteins in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. J Gen Appl Microbiol,2023,68(5):232-241.
- [14] 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,2019,12:655-665.
- [15] 詹学良,姚严翔,芦晓红,等. 铜绿假单胞菌 PAO1 中 c-di-GMP 代谢相关基因 PA0575 对表型的影响[J]. 微生物学通报,2020,47(6):1927-1934.
- [16] Rybtke MT, Borlee BR, Murakami K, et al. Fluorescence-Based reporter for gauging cyclic-di-GMP Levels in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Appl Environ Microbiol,2012,78(15):5060-5069.
- [17] Mhatre E, Snyder DJ, Sileo E, et al. One gene, multiple ecological strategies: A biofilm regulator is a capacitor for sustainable diversity[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2020,117(35):21647-21657.
- [18] Jones CJ, Wozniak DJ. Congo red stain identifies matrix overproduction and is an indirect measurement for c-di-GMP in many species of bacteria[J]. Methods Mol Biol,2017,1657:147-156.
- [19] Cai YM, Yu KW, Liu JH, et al. The c-di-GMP phosphodiesterase PipA (PA0285) regulates auto aggregation and Pf4 bacteriophage production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1[J]. Appl Environ Microbiol,2022,88(12):e0003922.
- [20] Gjermansen M, Ragas PT, Tolker-Nielsen T. Proteins with GGDEF and EAL domains regulate *Pseudomonas putida* biofilm formation and dispersal [J]. FEMS Microbiol Lett,2006,265(2):215-224.
- [21] Dumas Z, Ross-Gillespie AK, Kummerli R. Switching between apparently redundant iron-uptake mechanisms benefits bacteria in changeable environments [J]. Proc Biol Sci,2013,280(1764):20131055.
- [22] Kirienko NV, Ausubel F, MRuvkun G. Mitophagy confers resistance to siderophore mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2015,112(6):1821-1826.
- [23] Frangipani E, Visaggio D, Heeb S, et al. The Gac/Rsm and cyclic-di-GMP signaling networks coordinately regulate iron uptake in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. Environ Microbiol,2014,16(3):676-688.
- [24] Moglich A, Ayers R, AMoffat K. Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains [J]. Structure,2009,17(10):1282-1294.

【收稿日期】 2023-12-28 【修回日期】 2024-03-15