

• 新技术 •

环二鸟苷酸信号分子抑制剂的研究进展

向绪稳^{1,2,3}, 刘星宇^{1,2,3}, 陶辉^{1,2,3}, 崔紫宁^{1,2,3}, 张炼辉^{1,2,3}

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642

2 华南农业大学农学院 群体微生物研究中心, 广东 广州 510642

3 广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642

向绪稳, 刘星宇, 陶辉, 等. 环二鸟苷酸信号分子抑制剂的研究进展. 生物工程学报, 2017, 33(9): 1466-1477.

Xiang XW, Liu XY, Tao H, et al. Progress in c-di-GMP inhibitors. Chin J Biotech, 2017, 33(9): 1466-1477.

摘要: 环二鸟苷酸 (Bis-(3'-5') cyclic diguanylic acid, c-di-GMP) 是细菌所特有的一类核酸类第二信使, 参与并调节细菌多种生理功能, 包括细胞分化、生物被膜的形成以及致病因子的产生等。阻断 c-di-GMP 信号的传导对于发展新型抗菌药物具有重要的意义。现有研究表明, 基于 c-di-GMP 调控的信号通路开发新型抗菌药物具有 3 类潜在的靶点, 分别是 c-di-GMP 合成酶 (DGCs)、c-di-GMP 降解酶 (PDEs) 以及 c-di-GMP 受体。文中根据上述 3 类关键靶点, 介绍了相关小分子抑制剂的研究进展, 并展望了 c-di-GMP 信号分子抑制剂的发展方向。

关键词: 环二鸟苷酸, 二鸟苷酸环化酶, 磷酸二酯酶, 受体, 抑制剂

Progress in c-di-GMP inhibitors

Xuwen Xiang^{1,2,3}, Xingyu Liu^{1,2,3}, Hui Tao^{1,2,3}, Zining Cui^{1,2,3}, and Lianhui Zhang^{1,2,3}

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources, Guangzhou 510642, Guangdong, China

2 Integrative Microbiology Research Centre, College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

3 Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: The cyclic dinucleotide c-di-GMP is known as an important second messenger in bacteria, which controls various important cellular processes, such as cell differentiation, biofilm formation and virulence factors production. It is

Received: March 28, 2017; **Accepted:** May 3, 2017

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2015CB150600), National Natural Science Foundation of China (No. 31570122), Pearl River S&T Nova Program of Guangzhou (No. 201506010029).

Corresponding author: Zining Cui. Tel: +86-20-85288229; E-mail: ziningcui@scau.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2015CB150600), 国家自然科学基金 (No. 31570122), 广州市珠江科技新星专项 (No. 201506010029) 资助。

extremely vital for the development of new antibacterial agents by virtue of blocking c-di-GMP signal conduction. Current research indicates that there are three potential targets for discovering new antibacterial agents based on c-di-GMP regulated signal pathway, which are c-di-GMP synthases, c-di-GMP degrading enzymes and c-di-GMP receptors. Herein, we review small molecules that have been developed to inhibit c-di-GMP related enzymes and indicate perspectives of c-di-GMP inhibitors.

Keywords: c-di-GMP, diguanylatecyclases, phosphodiesterases, receptors, inhibitors

环二鸟苷酸 (Bis-(3'-5') cyclic diguanylic acid, c-di-GMP) 是一类非常重要的核酸类第二信使, 普遍存在于各种细菌中, 参与并调节细菌多种生理功能, 其对细胞分化、生物被膜的形成以及致病因子的产生等有着重要的调节作用。阐明 c-di-GMP 对细菌生理活动的调控机理, 对于寻找新的作用靶点、开发新型抗菌药物和解决细菌耐药问题具有非常重要的意义。

现有研究结果表明: c-di-GMP 介导的信号通路由 4 部分组成 (图 1): 1) 感应外界信号而促进

c-di-GMP 合成的二鸟苷酸环化酶 (Diguanylate cyclases, DGCs); 2) 降解 c-di-GMP 的磷酸二酯酶 (Phosphodiesterases, PDEs); 3) 结合 c-di-GMP 的效应分子 (Effectors); 4) 受效应分子直接调控的下游靶标 (Targets)。细菌通过二鸟苷酸环化酶 GGDEF 和磷酸二酯酶 EAL 结构域 N-末端相连的感受结构域接收外来信号^[1-2], 并通过两种酶的拮抗作用调节细菌内 c-di-GMP 的水平。二鸟苷酸环化酶和磷酸二酯酶对 c-di-GMP 的合成和降解作用是整个信号通路的核心。

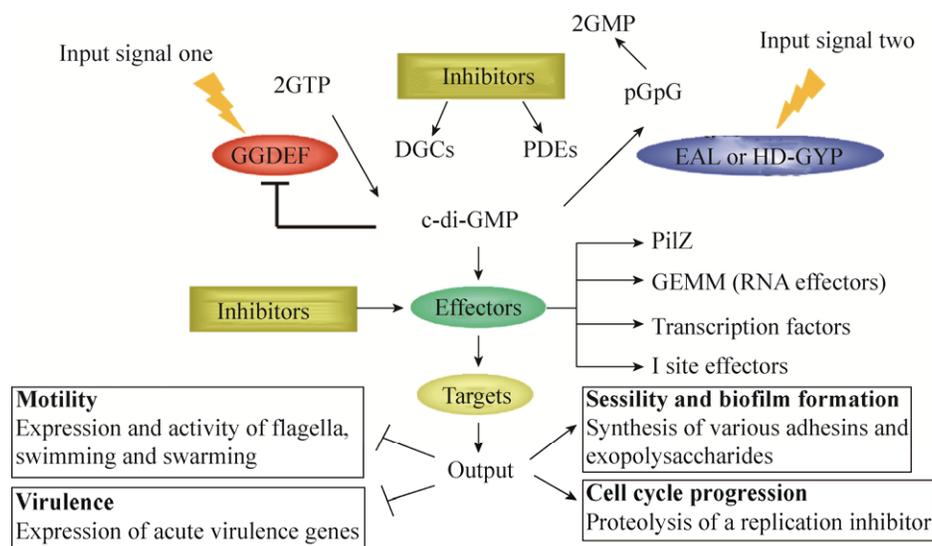


图 1 c-di-GMP 介导的信号调控通路及对应的抑制剂

Fig. 1 The c-di-GMP mediated signaling pathway and the corresponding inhibitors. DGCs and PDEs respond to different input signals through their amino-terminal sensory domains and balance the c-di-GMP level by their antagonistic activities. Multiple numbers of DGCs and PDEs are often found associated with sensor domains such as PAS for sensing gaseous ligands such as O₂, CO₂, NO etc. and BLUF for sensing light.

由于 c-di-GMP 介导的信号通路与细菌的多种生理活动有密切关系, 因此, 阻断 c-di-GMP 信号的传导对于发展新型抗菌药物具有重要的意义。从 c-di-GMP 介导的信号通路可以看出, 基于 c-di-GMP 调控的信号通路开发新型抗菌药物具有 3 类潜在的靶点, 分别是 c-di-GMP 合成酶抑制剂、c-di-GMP 降解酶抑制剂以及 c-di-GMP 受体抑制剂。本文将根据上述 3 类关键靶点, 介绍相关小分子抑制剂的研究进展。

1 c-di-GMP 合成酶 (二鸟苷酸环化酶) 抑制剂的研究进展

c-di-GMP 作为细菌的第二信使, 其在细菌内是级联式传导。因此, 相比于直接作用于 c-di-GMP 的下游靶点, 控制其内源合成显得更加高效。二鸟苷酸环化酶是合成 c-di-GMP 的关键酶, 该酶催化 2 分子的鸟苷三磷酸 (Guanosinetriphosphate, GTP) 生成 1 分子的 c-di-GMP 并释放 2 分子的焦磷酸盐。现有的研究表明, 大部分的二鸟苷酸环化酶具有 GGDEF 或 GGEEF 结构域^[3-5], 该结构域是其催化的活性位点 (A-site); 除该活性位点外, 一些二鸟苷酸环化酶还具有抑制位点 (I-site), c-di-GMP 能够以二聚体的形式与 I 位点或 A 位点结合, 从而抑制二鸟苷酸环化酶的活性^[6-7], 这种反馈抑制不仅能够有效地避免 GTP 的过度消耗, 而且还能维持胞内 c-di-GMP 水平的稳定^[8]。迄今为止, 研究人员已经合成并筛选出一批能够抑制二鸟苷酸环化酶的小分子化合物, 按照其化学结构特点可以分为 3 类: 环状二核苷酸衍生物、电中性核苷酸衍生物和非核苷酸类化合物。

1.1 环状二核苷酸衍生物

酶的催化活性受其所催化反应的产物反馈

调节, 二鸟苷酸环化酶同样如此。因此, 环二鸟苷酸及其衍生物是一种潜在的 DGCs 抑制剂, 通过对 c-di-GMP 的衍生不仅有利于发现新的二鸟苷酸环化酶抑制剂, 而且还有利于弄清楚 c-di-GMP 与二鸟苷酸环化酶作用的分子机制。近年来, 研究人员已经设计合成出许多环状二核苷酸类化合物, 包括碱基的替换、磷酸键和糖基的修饰等。

早在 2010 年, Ching 等^[9]就已经合成了一系列不同碱基的环状二核苷酸, 通过研究发现环二肌苷酸 (c-di-IMP, 图 2) 能够抑制集胞藻 *Synechocystis* sp. 的环二鸟苷酸合成酶 Slr1143, 并且抑制作用明显高于 c-di-GMP, 从而导致对生物被膜的形成具有较好的抑制作用。

2013 年, Sintim 课题组^[10]通过分析 c-di-GMP 与 DGC、PDE 和 PilZ 蛋白的复合物晶体结构, 发现 c-di-GMP 糖基的 2'-OH 对于结合代谢酶和受体蛋白 PilZ 具有非常重要的作用。在此基础上, 他们设计并合成了 3 种 2' 位取代基不同的化合物, 并且通过实验发现 2' 位被氟原子取代的衍生物

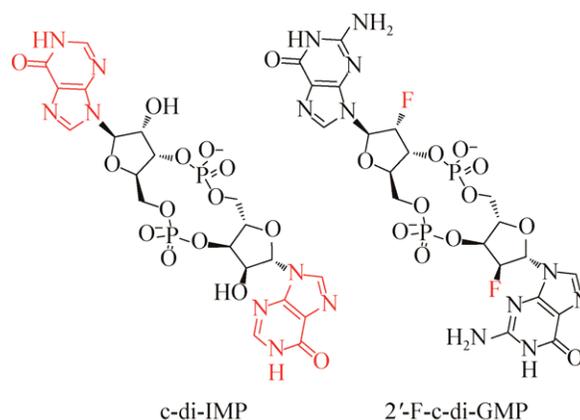


图 2 环状二核苷酸类抑制剂的化学结构^[9-10]

Fig. 2 The chemical structures of cyclic dinucleotide inhibitors^[9-10].

2'-F-c-di-GMP (图 2) 对铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa* 的二鸟苷酸环化酶 WspR 具有很好的抑制作用, 其对二鸟苷酸环化酶的抑制作用是 c-di-GMP 的 4 倍。但是, 该衍生物缺乏很好的选择性, 实验表明该化合物对磷酸二酯酶 RocR 也具有很强的抑制作用 ($IC_{50}=0.7 \mu\text{mol/L}$)。

弥散序列核磁共振谱 (DOSY) 表明 c-di-GMP 五元糖环 2 号位羟基的改变并不影响其聚合状态。因此, 他们认为 2'-F-c-di-GMP 可能是以二聚体的状态结合二鸟苷酸环化酶的抑制位点而产生抑制作用。

1.2 电中性核苷酸类似物

由于环二鸟苷酸类似物具有负电性, 相比于中性分子来说, 带电的化合物更不易通过被动扩散的形式进入细胞^[11-12]。在这种情况下, 电中性的核苷酸衍生物显得尤为重要。

2015 年, Fernicola 等^[13]对环二鸟苷酸的化学结构进行了一次大胆的改造, 将整个磷酸酯键用非经典的生物电子等排体 1,2,3-三氮唑替换, 并且从中筛选出了 2 个电中性的磷酸二酯酶抑制剂 DCI061 和 DCI058 (图 3)。实验显示, 这两

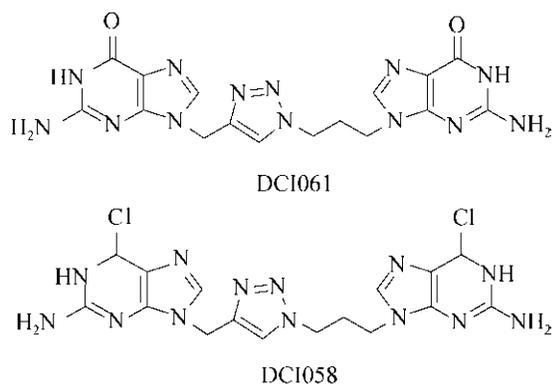


图 3 电中性核苷酸类抑制剂的化学结构^[13]

Fig. 3 The chemical structures of the neutral nucleotide inhibitors^[13].

个化合物不仅能够抑制新月柄杆菌 *Caulobacter crescentus* 的环二鸟苷酸合成酶 (PleD) 的活性, 而且对铜绿假单胞菌的磷酸二酯酶 (RocR) 也具有抑制作用。其中, DCI058 对新月柄杆菌环二鸟苷酸合成酶 (PleD) 的抑制作用远强于其对磷酸二酯酶 RocR 的抑制作用。通过进一步研究发现, DCI061 对 I 位点退化的环二鸟苷酸合成酶基本没有抑制作用。由此, 他们推断该化合物通过结合二鸟苷酸环化酶的 I 位点而抑制酶的活性。

1.3 非核苷酸类

早在 1998 年, Ohana 等^[14]通过研究发现, 豌豆的粗提物能够抑制木醋杆菌 *Acetobacter xylinum* 环二鸟苷酸酶的活性。他们通过分离纯化该粗提物得到了几种五环三萜类化合物, 并通过活性测试确定其中的三萜皂苷类化合物 (GTS, 图 5) 对木醋杆菌环二鸟苷酸酶具有抑制作用。同一年, Ohana 等又发现球孢阜孢霉 *Papularia sphaerosperma* 的次生代谢产物阜孢霉毒素 B (Papulacandin B) (图 5) 也能够抑制木醋杆菌 DGCs 的活性^[15]。

最近几年, 随着基于结构的虚拟筛选、高通量筛选以及基于片段的药物设计等手段的广泛应用, 一批全新的二鸟苷酸环化酶小分子抑制剂被发现。筛选得到的一些小分子化合物不仅能够抑制二鸟苷酸环化酶的活性, 同时能够对细菌的表型产生影响。

2014 年, Sambanthamoorthy 等^[16]通过一种基于药效团的高通量筛选发现了 4 个能够抑制鲍氏不动杆菌 *Acinetobacter baumannii* 和铜绿假单胞菌二鸟核苷酸环化酶 (DGCs) 的化合物 (LP1062、LP3134、LP3145、LP4010, 图 5)。研究显示, 4 个化合物都能够分散铜绿假单胞菌已

经形成的生物被膜。其中, LP-3134 还能够影响铜绿假单胞菌的黏附作用以及生物被膜的形成。

2016年, Fernicola 等^[17]以新月柄杆菌二鸟苷酸环化酶 PleD 的 3D 结构 (PDB: 2V0N^[18]和 4H54^[19]) 为基础, 运用虚拟筛选的方法, 对 ZINC 数据库中的 2.3×10^7 个化合物进行了筛选, 最终得到 7 个具有潜在抑制活性的磺酰脲 Schiff 碱类化合物。但是, 最终的活性测试实验显示仅有化合物 2 ($IC_{50}=(11.1 \pm 1.2) \mu\text{mol/L}$) 和化合物 7 ($IC_{50}=(11.1 \pm 1.1) \mu\text{mol/L}$) (图 4) 对 PleD 具有很好的抑制作用。随后, 他们利用分子对接模拟了化合物 2 和 7 与 PleD 蛋白活性腔的互作模式。结果显示, 苯磺酰基苯环上的硝基与磺胺基团上的氧原子分别与关键氨基酸活性位点 R366 和 N335 形成氢键, 对该化合物结合酶的活性位点是必不可少的。同时, 苯基苯环上 3、4 号位的 2 个羟基则与 Mg^{2+} 发生螯合作用, 从而抑制了该位点结合三磷酸腺苷 (GTP) 并催化形成磷酸酯键的能力 (图 4)。

过去的研究表明, 传统的高通量筛选和基于结构的虚拟筛选不仅需要分离纯化相应蛋白, 而

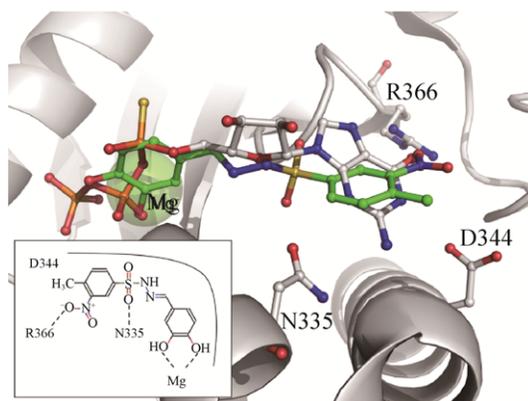


图 4 化合物 2 和 PleD 的晶体互作结构^[17]

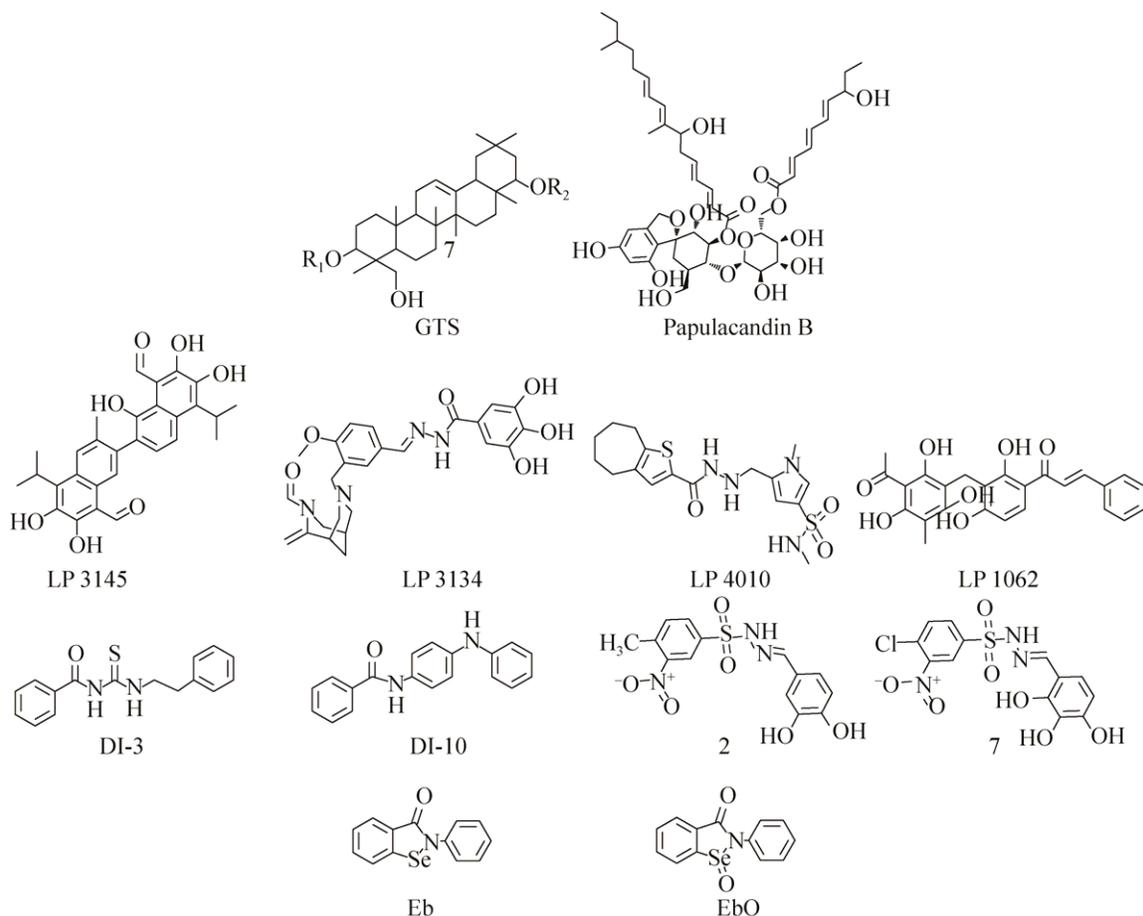
Fig. 4 Molecular simulation of compound 2 with PleD^[17].

且经常会导致假阳性的产生, 因此, 开发合适的筛选方法显得尤为重要。

在 2012 年, Sambanthamoorthy 等^[20]利用霍乱弧菌 *Vibrio cholerae* 中高浓度的 c-di-GMP 抑制荧光素酶 VC1673-*lux*^[21]的表达这一特性筛选得到了 7 个能够抑制霍乱弧菌二鸟苷酸环化酶的小分子拮抗剂, 进而对霍乱弧菌生物被膜的形成产生抑制作用。该筛选方法不需要分离纯化 DGCs 蛋白, 大大提高了筛选效率。在这 7 个小分子化合物中, 有 2 个 (DI-3 和 DI-10, 图 5) 能够通过抑制二鸟苷酸环化酶显著降低霍乱弧菌细胞内 c-di-GMP 的含量。

实验表明, 化合物 DI-3 不仅对霍乱弧菌生物被膜的形成有抑制作用, 而且对铜绿假单胞菌生物被膜的形成表现出同样的抑制作用, 表现出广谱的抗生物被膜活性。

2014 年, Lieberman 等^[22]通过基于微分径向毛细管作用的配体分析方法 (Differential radial capillary action of ligand assay, DRaCALA)^[23-24], 筛选得到了依布硒啉 (Eb) 和依布硒啉氧化物 (EbO) 两个二鸟苷酸环化酶的抑制剂 (图 5), 依布硒啉和布硒啉氧化物对铜绿假单胞菌的二鸟苷酸环化酶 WspR 和新月柄杆菌的二鸟苷酸环化酶 PleD 都具有很好的抑制活性。通过进一步的研究, 他们推测依布硒啉 (Eb) 和依布硒啉氧化物 (EbO) 可能是通过共价结合位于 DGC 酶的活性位点上的半胱氨酸残基而抑制二鸟苷酸环化酶的活性。虽然实验证明依布硒啉和布硒啉氧化物能够抑制新月柄杆菌和铜绿假单胞菌中二鸟苷酸环化酶的活性, 但是表型实验显示: Eb 和 EbO 仅能够改变铜绿假单胞菌 PA14 菌株的运动状态和生物被膜的形成, 而对新月杆菌生物被膜的形成并没有影响。

图5 非核苷酸类抑制剂的化学结构^[14-17,20,22]Fig. 5 The chemical structures of non-nucleoside inhibitors^[14-17,20,22].

2 c-di-GMP 降解酶 (磷酸二酯酶) 抑制剂的研究进展

磷酸二酯酶 (PDEs) 具有水解第二信使的功能,存在多种亚型。细菌内负责降解 c-di-GMP 的磷酸二酯酶 (PDEs) 一般含有 EAL 结构域或者 HD-GYP 结构域,其中 EAL 结构域水解 c-di-GMP 为 2 分子 GMP^[25-26]; HD-GYP 则水解其为链状二核苷酸 5'-pGpG^[27]; 磷酸二酯酶 (PDEs) 是控制 c-di-GMP 代谢的关键酶。因此,该酶也是开发 c-di-GMP 信号分子抑制剂的重要

作用靶点之一。

第一个能够选择性抑制磷酸二酯酶 (PDEs) 活性的化合物是 Sintim 课题组^[28]设计合成的 *endo-S-c-di-GMP* (图 6),其仅对铜绿假单胞菌的磷酸二酯酶 RocR 具有很明显的抑制作用,而对 DGC 蛋白 WspR 和 PilZ 蛋白 Alg44 没有任何影响;根据 c-di-GMP 与 DGC、PilZ 以及 PDE 活性腔结合的复合物晶体结构 (PDB: 3I5A^[4]、3KYF^[29-30]、3HV8^[31-32]、3N3T^[33]),他们认为:相比于 c-di-GMP, *endo-S-c-di-GMP* 在一价金属存在的溶液中大多以单体的形式存在,这种单体

的“开放”状态对于结合 DGCs 的 GGDEF 结构域和 PilZ 是不利的，而对于结合磷酸二酯酶 RocR 的 EAL 结构域是有利的。因此，该化合物表现出很好的选择性。在随后的研究中 Sintim 课题组也发现 *c*-di-GMP 衍生物 2'-H-*c*-di-GMP 和 2'-OMe-*c*-di-GMP (图 6) 对磷酸二酯酶 RocR 具有一定的抑制作用^[10]。

2013 年，Strobel 课题组^[34]在研究环二鸟苷酸衍生物对磷酸二酯酶 EAL 结构域蛋白的耐受性时发现，双取代的硫代磷酸酯衍生物 *c*-(RpRp)-di-Gps/*c*-(RpSp)-di-Gps (图 6) 能够抵抗磷酸二酯酶的水解作用，并且仍然可以结合 *c*-di-GMP 核糖开关。紧接着他们在此基础上，设计合成了电中性的 2'-H 的甲基磷酸酯类化合物 *c*-di-dG_{p(Me)}-I / *c*-di-dG_{p(Me)}-II (图 6)，该衍生物同样能够抵抗磷酸二酯酶的水解作用和结合核糖开关的能力。

虽然 Sintim 课题组^[28]和 Strobel 课题组^[34]分别在 2011 年和 2013 年就已经成功合成并筛选出了能够竞争性抑制磷酸二酯酶活性的环状二鸟

苷酸衍生物，但是他们并没有测试这些化合物对不同细菌种类 *c*-di-GMP 降解酶的抑制作用，以及对细菌表型的影响。直到 2016 年，Sintim 课题组^[35]利用分子对接实验高通量地从 250 000 种化合物中筛选得到了 1 个具有高度选择性的磷酸二酯酶抑制剂——苯并异噻唑啉酮衍生物 (BZ-1, 图 6)。

实验表明，该化合物仅对磷酸二酯酶蛋白 RocR 具有抑制作用，而对其他 PDEs 蛋白无影响。表型实验显示，该化合物对铜绿假单胞菌的涌动 (Swarming) 具有很强的抑制作用，对其泳动 (Swimming) 和生物被膜的形成并没有影响。同时，实验发现磷酸二酯酶蛋白 RocR 的抑制并不会影响铜绿假单胞菌 *c*-di-GMP 的整体水平。

这些发现暗示 *c*-di-GMP 代谢酶对 *c*-di-GMP 浓度的调控既有全局水平又有局部水平。同时，苯并异噻唑啉酮 BZ-1 也是第一个被发现的能够通过抑制磷酸二酯酶的活性进而影响细菌表型的小分子抑制剂。

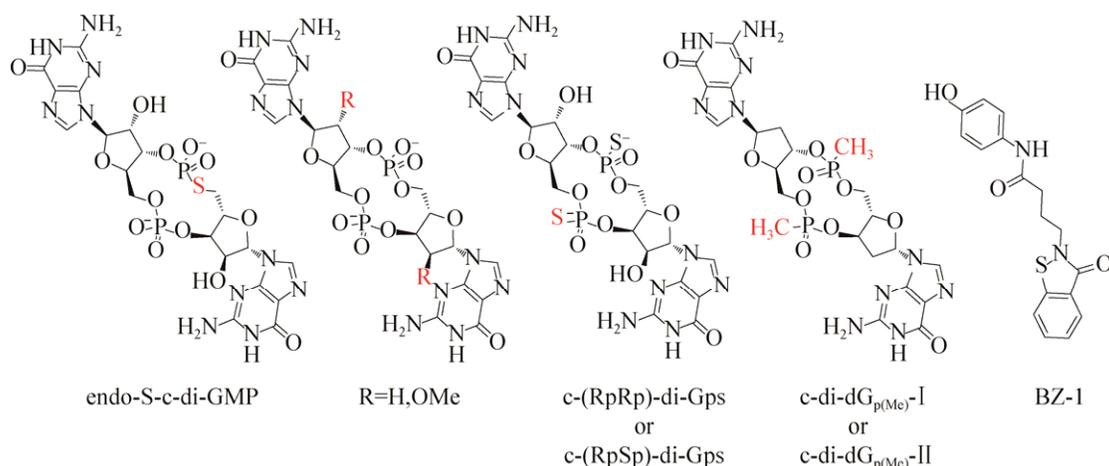


图 6 *c*-di-GMP 降解酶 (磷酸二酯酶) 抑制剂的化学结构^[10,28,34-35]

Fig. 6 Chemical structures of *c*-di-GMP degrading enzyme inhibitors^[10,28,34-35].

3 c-di-GMP 受体抑制剂的研究进展

c-di-GMP 结合下游的受体分子是其发挥信使功能的关键,迄今为止已经发现了 c-di-GMP 的 4 种受体分子:1) PilZ 结构域蛋白;2) 具有 I 位点的结构域蛋白;3) 转录因子;4) 核糖体开关 GEMM。这些受体分子通过结合 c-di-GMP 并作用于相应的靶点而直接控制细菌某些生理活动。因此,相比于控制 c-di-GMP 的代谢,通过调控 c-di-GMP 与受体分子的相互作用将能够更精确更直接地控制细菌的生理活动。然而,由于 c-di-GMP 与受体分子之间的作用机制尚未完全清晰,因此,对 c-di-GMP 受体分子抑制剂的研究仍然处于探索阶段。迄今为止,研究人员仅仅对 PilZ 结构域蛋白和核糖体开关抑制剂做了相应的研究。本节将对这两种抑制剂的研究进展进行论述。

3.1 PilZ 结构域蛋白抑制剂

PilZ 结构域蛋白是细菌内广泛存在的一类 c-di-GMP 受体,该结构域蛋白由于其保守的 RXXXR₂₀₋₃₀(D/N)X(S/A)XXG (X 代表任意氨基酸)序列而得名^[36],PilZ 蛋白结合 c-di-GMP 后引起结构域构象的变化,并通过蛋白-蛋白相互作用发挥其生物学作用^[37]。

铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa* 中的 Alg44 蛋白是典型的 PilZ 结构域蛋白^[38-39],2013 年,Sintim 课题组^[10]在研究二鸟苷酸环化酶的抑制剂时发现,2'-F-c-di-GMP 和 2'-H-c-di-GMP (图 2 和图 6) 能够与 c-di-GMP 竞争性结合 Alg44 蛋白;其中 2'-F-c-di-GMP (图 2) 对 Alg44 蛋白的抑制作用是 c-di-GMP 的 2 倍,但是 2'-F-c-di-GMP 对 WspR 蛋白同样具有很强的抑制作用,缺乏选择

性。这些研究表明 c-di-GMP 衍生物可以作为 PilZ 结构域蛋白的潜在抑制剂。

3.2 核糖体开关抑制剂

核糖体开关 (Riboswitch) 能够和 c-di-GMP 相结合从而调控基因的表达,其主要是根据细胞内 c-di-GMP 信号分子的浓度变化而调目标蛋白的 mRNA 转录水平。2008 年,Breaker 课题组^[40]发现了第一类 c-di-GMP 核糖体开关 Vc2RNA,该核糖体开关结合 c-di-GMP 有利于下游基因的转录。2010 年,他们又发现了第二类 c-di-GMP 核糖体开关 CdA RNA,这类核糖体开关与 c-di-GMP 具有很好的亲和力,并且参与 mRNA 的自我剪切^[41]。

2011 年,Strobel 课题组^[42]在研究 c-di-GMP 及其衍生物与两种核糖体开关的结合能力时发现,c-di-GMP 的碱基、2'-OH 和磷酸酯键是 c-di-GMP 结合核糖体开关的关键基团。其中,鸟嘌呤是 c-di-GMP 特异性识别 I 类核糖体开关 Vc2RNA 所必需的。各种研究表明,c-di-GMP 中 2'-OH 和磷酸酯键的改变虽然明显降低了 c-di-GMP 与 Vc2 RNA、CdA RNA 和 WspR 的结合能力,但是这种改变却提高了对两种核糖体开关的识别能力。例如,2'-OMe-c-di-GMP (图 6) 能够特异性结合 II 类核糖体开关^[43],endo-S-c-di-GMP (图 6) 能够特异性识别 I 类核糖体开关^[44],基于这一发现 Strobel 课题组通过对 c-di-GMP 的 2'-OH 和磷酸酯键进行修饰,筛选出了两种能够特异性结合 Vc2 RNA (I 类核糖体开关) 的小分子化合物 2'-[biotin]-endo-S-c-di-GMP 和 2'-[biotin]-AHC-c-di-GMP (图 7)^[45],这些小分子化合物能够与 c-di-GMP 竞争性结合 I 类核糖体开关,是潜在的核糖体开关抑制剂。

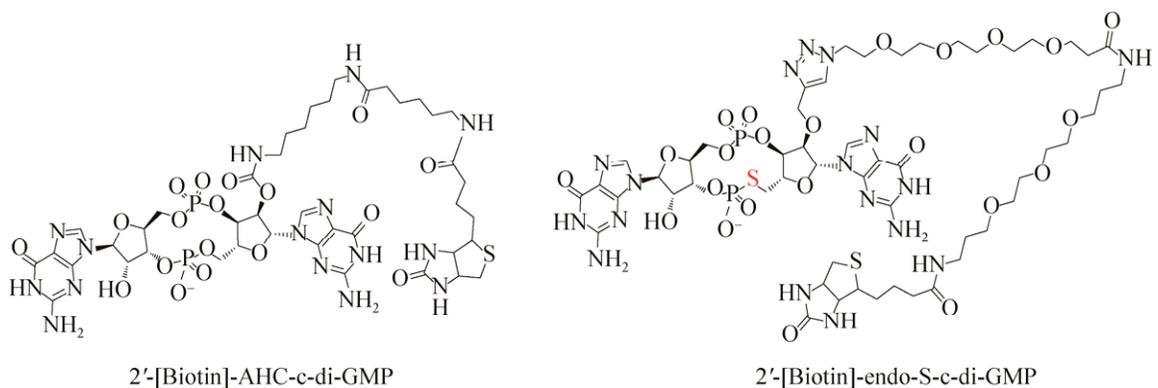


图7 核糖体开关抑制剂的化学结构^[45]

Fig. 7 Chemical structures of riboswitch inhibitors^[45].

4 展望

c-di-GMP 是细菌所特有的一类核酸类第二信使，对 c-di-GMP 信号通路的研究以及针对这一通路的小分子抑制剂的开发对于发展新一代抗菌药物具有重要的意义和价值。迄今为止，由于 c-di-GMP 代谢酶的缺失所引起细菌表型的变化已经被观察到，而对 c-di-GMP 受体分子的作用机制尚未完全清楚。因此，对于 c-di-GMP 信号分子抑制剂的研究仍将主要集中在 c-di-GMP 的代谢酶上；虽然目前为止已经报道了一批能够抑制 c-di-GMP 代谢酶的小分子化合物，但是这些小分子化合物在生物活性方面往往缺乏很好的选择性；同时在化学结构多样性方面仍有很大的发掘空间。因此，弄清楚 c-di-GMP 信号的作用机制，开发高效结构多样且具有高度选择性的小分子化合物将是发展 c-di-GMP 信号分子抑制剂的前进方向。同时，在更多的细菌中阐明这些小分子抑制剂的生物学功能也将是潜在的研究课题。伴随着生物学的发展，以及对 c-di-GMP 受体分子作用机制的进一步深入研究，将会为开发 c-di-GMP 受体抑制剂带来蓬勃的发展。

REFERENCES

- [1] Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. Corrigendum to “novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems”. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 204(1): 213–214.
- [2] Galperin MY. Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Environ Microbiol*, 2004, 6(6): 552–567.
- [3] Tal R, Wong HC, Calhoun 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 Bacteriol*, 1998, 180(17): 4416–4425.
- [4] De N, Navarro MVAS, Raghavan RV, et al. Determinants for the activation and autoinhibition of the diguanylate cyclase response regulator WspR. *J Mol Biol*, 2009, 393(3): 619–633.
- [5] Simm R, Morr M, Kader A, et al. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. *Mol Microbiol*, 2004, 53(4): 1123–1134.
- [6] Yang CY, Chin KH, Chuah LC, et al. The structure and inhibition of a GGDEF diguanylate cyclase complexed with (c-di-GMP)₂ at the active site. *Acta Crystallogr*, 2011, 67(12): 997–1008.
- [7] Seshasayee ASN, Fraser GM, Luscombe NM.

- Comparative genomics of cyclic-di-GMP signalling in bacteria: post-translational regulation and catalytic activity. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(18): 5970–5981.
- [8] Christen B, Christen M, Paul R, et al. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J Biol Chem*, 2006, 281(42): 32015–32024.
- [9] Ching SM, Tan WJ, Chua KL, et al. Synthesis of cyclic di-nucleotidic acids as potential inhibitors targeting diguanylate cyclase. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(18): 6657–6665.
- [10] Zhou J, Watt S, Wang JX, et al. Potent suppression of c-di-GMP synthesis *via* I-site allosteric inhibition of diguanylate cyclases with 2'-F-c-di-GMP. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(14): 4396–4404.
- [11] Varma RS. Synthesis of oligonucleotide analogues with modified backbones. *ChemInform*, 1994, 25(5), doi: 10.1002/chin.199405298.
- [12] Rozners E. Carbohydrate chemistry for RNA interference: synthesis and properties of RNA analogues modified in sugar-phosphate backbone. *Curr Org Chem*, 2006, 10(6): 675–692.
- [13] Fernicola S, Torquati I, Paiardini A, et al. Synthesis of triazole-linked analogues of c-di-GMP and their interactions with diguanylate cyclase. *J Med Chem*, 2015, 58(20): 8269–8284.
- [14] Ohana P, Delmer DP, Carlson RW, et al. Identification of a novel triterpenoid saponin from *Pisum sativum* as a specific inhibitor of the diguanylate cyclase of *Acetobacter xylinum*. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(2): 144–152.
- [15] Ohana P, Delmer DP, Volman G, et al. Glycosylated triterpenoid saponin: a specific inhibitor of diguanylate cyclase from *Acetobacter xylinum*. Biological activity and distribution. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(2): 153–159.
- [16] Sambanthamoorthy K, Luo CY, Pattabiraman N, et al. Identification of small molecules inhibiting diguanylate cyclases to control bacterial biofilm development. *Biofouling*, 2014, 30(1): 17–28.
- [17] Fernicola S, Paiardini A, Giardina G, et al. *In silico* discovery and *in vitro* validation of catechol-containing sulfonylhydrazide compounds as potent inhibitors of the diguanylate cyclase PleD. *J Bacteriol*, 2016, 198(1): 147–156.
- [18] Wassmann P, Chan C, Paul R, et al. Structure of BeF₃⁻-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure*, 2007, 15(8): 915–927.
- [19] Zähringer F, Lacanna E, Jenal U, et al. Structure and signaling mechanism of a zinc-sensory diguanylate cyclase. *Structure*, 2013, 21(7): 1149–1157.
- [20] Sambanthamoorthy K, Sloup RE, Parashar V, et al. Identification of small molecules That antagonize diguanylate cyclase enzymes to inhibit biofilm formation. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(10): 5202–5211.
- [21] Srivastava D, Harris RC, Waters CM. Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of *vpsT* and *aphA* in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 2011, 193(22): 6331–6341.
- [22] Lieberman OJ, Orr MW, Wang Y, et al. High-throughput screening using the differential radial capillary action of ligand assay identifies ebselen as an inhibitor of diguanylate cyclases. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(1): 183–192.
- [23] Roelofs KG, Wang JX, Sintim HO, et al. Differential radial capillary action of ligand assay for high-throughput detection of protein-metabolite interactions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(37): 15528–15533.
- [24] Donaldson GP, Roelofs KG, Luo YL, et al. A rapid assay for affinity and kinetics of molecular interactions with nucleic acids. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(7): e48.
- [25] Ryan RP, McCarthy Y, Andrade M, et al. Cell-cell

- signal-dependent dynamic interactions between HD-GYP and GGDEF domain proteins mediate virulence in *Xanthomonas campestris*. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(13): 5989–5994.
- [26] Ryan RP, Fouhy Y, Lucey JF, et al. Cell-cell signaling in *Xanthomonas campestris* involves an HD-GYP domain protein that functions in cyclic di-GMP turnover. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(17): 6712–6717.
- [27] Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains. J Bacteriol, 2005, 187(14): 4774–4781.
- [28] Wang JX, Zhou J, Donaldson GP, et al. Conservative change to the phosphate moiety of cyclic diguanylic monophosphate remarkably affects its polymorphism and ability to bind DGC, PDE, and PilZ proteins. J Am Chem Soc, 2011, 133(24): 9320–9330.
- [29] Alm RA, Boder AJ, Free PD, et al. Identification of a novel gene, *pilZ*, essential for type 4 fimbrial biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 1996, 178(1): 46–53.
- [30] Ko J, Ryu KS, Kim H, et al. Structure of PP4397 reveals the molecular basis for different c-di-GMP binding modes by PilZ domain proteins. J Mol Biol, 2010, 398(1): 97–110.
- [31] Galperin MY, Nikolskaya AN, Koonin EV. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. FEMS Microbiol Lett, 2001, 203(1): 11–21.
- [32] Navarro MVAS, De N, Bae N, et al. Structural analysis of the GGDEF-EAL domain-containing c-di-GMP receptor FimX. Structure, 2009, 17(8): 1104–1116.
- [33] Tchigvintsev A, Xu XH, Singer A, et al. Structural insight into the mechanism of c-di-GMP hydrolysis by EAL domain phosphodiesterases. J Mol Biol, 2010, 402(3): 524–538.
- [34] Shanahan CA, Gaffney BL, Jones RA, et al. Identification of c-di-GMP derivatives resistant to an EAL domain phosphodiesterase. Biochemistry, 2013, 52(2): 365–377.
- [35] Zheng Y, Tsuji G, Opoku-Temeng C, et al. Inhibition of *P. aeruginosa* c-di-GMP phosphodiesterase RocR and swarming motility by a benzoisothiazolinone derivative. Chem Sci, 2016, 7(9): 6238–6244.
- [36] Ryjenkov DA, Simm R, Römling U, et al. The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. J Biol Chem, 2006, 281(41): 30310–30314.
- [37] Amikam D, Galperin MY. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. Bioinformatics, 2006, 22(1): 3–6.
- [38] Merighi M, Lee VT, 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*. Mol Microbiol, 2007, 65(4): 876–895.
- [39] Remminghorst U, Rehm BH. Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. FEBS Lett, 2006, 580(16): 3883–3888.
- [40] Sudarsan N, Lee ER, Weinberg Z, et al. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger cyclic di-GMP. Science, 2008, 321(5887): 411–413.
- [41] Lee ER, Baker JL, Weinberg Z, et al. An allosteric self-splicing ribozyme triggered by a bacterial second messenger. Science, 2010, 329(5993): 845–848.
- [42] Furukawa K, Gu HZ, Sudarsan N, et al. Identification of ligand analogues that control c-di-GMP riboswitches. ACS Chem Biol, 2012, 7(8): 1436–1443.

- [43] Smith KD, Shanahan CA, Moore EL, et al. Structural basis of differential ligand recognition by two classes of bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate-binding riboswitches. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108(19): 7757-7762.
- [44] Zhou J, Sayre DA, Wang JX, et al. Endo-S-c-di-GMP analogues-polymorphism and binding studies with class I riboswitch. *Molecules*, 2012, 17(11): 13376-13389.
- [45] Luo YL, Zhou J, Watt SK, et al. Differential binding of 2'-biotinylated analogs of c-di-GMP with c-di-GMP riboswitches and binding proteins. *Mol Biosyst*, 2012, 8(3): 772-778.

(本文责编 陈宏宇)

张炼辉 教授，国际群体感应研究权威专家，国家“千人计划”特聘专家、长江讲座特聘教授、“973”首席科学家（微生物群体感应通讯系统及病害防控应用基础）、国务院学位委员会第七届学科评议组成员、广东省领军人才、新加坡 2005 年度“国家科学奖”得主，2017 年当选为美国微生物科学院（American Academy of Microbiology, AAM）院士（Fellow），被认为是群体感应领域的奠基者之一，群体淬灭防治植物病害新理论的建立者。2013 年协调华南农业大学校内多个单位组建“广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室”；同年协助引进广东省“群体微生物基础理论与前沿技术创新团队”；2016 年组建了首个华南农业大学校级研究中心——“群体微生物研究中心”。



崔紫宁 教授，2010 年毕业于中国农业大学，获得理学博士。日本 JSPS 外籍特别研究员（2010-2012），入选 2015 年珠江科技新星。主要从事活性小分子的设计合成、农药学以及化学生物学相关的科研与教学工作。主持国家自然科学基金面上及青年项目各 1 项，973 计划子课题 1 项，省部级项目 3 项。至今发表 SCI 研究论文 40 余篇，申请中国发明专利 12 项，获得授权 5 项。

