



假单胞菌生物被膜核心胞外多糖生物合成系统研究进展*

刘佳文^{1)**} 吴倩^{1)**} 张昭寰^{1,2)***} 童金蓉¹⁾ 黄振华¹⁾

刘静¹⁾ 潘迎捷^{1,3,4)} 赵勇^{1,3,4)***}

(¹⁾ 上海海洋大学食品学院, 上海 201306; (²⁾ 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306;

(³⁾ 农业农村部水产品贮藏保鲜质量安全风险评估实验室(上海), 上海 201306;

(⁴⁾ 上海水产品加工及贮藏工程技术研究中心, 上海 201306)

摘要 胞外多糖是假单胞菌生物被膜的重要组成部分, 能增强菌体对外界环境、抗菌剂和宿主防御的耐受性。假单胞菌能产生3种与生物被膜形成密切相关的核心胞外多糖: 褐藻胶、Psl和Pel, 它们在细菌细胞中的合成和转运分别依赖对应的褐藻胶、Psl和Pel生物合成系统。因此, 本综述系统全面地总结了假单胞菌3种胞外多糖生物合成系统结构生物学的研究进展, 重点围绕已知结构的蛋白质进行具体的结构和功能阐述。在此基础之上, 对未来研究方向提出新的思路和见解, 可为假单胞菌生物被膜形成机制及控制策略奠定扎实的理论基础。

关键词 假单胞菌, 生物被膜, 核心胞外多糖, 褐藻胶生物合成系统, Psl生物合成系统, Pel生物合成系统

中图分类号 Q5, Q71, Q93

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0050

假单胞菌是常见的需氧型革兰氏阴性细菌, 广泛地分布在空气、土壤、水, 以及人体皮肤、消化道和呼吸道中, 可造成严重的水体污染, 引起人体呼吸道、泌尿系统及血液等多部位的慢性或急性疾病。生物被膜是细菌细胞及其分泌物(如胞外多糖、胞外蛋白质和胞外DNA等)黏附在生物或非生物材料表面而形成的多细胞聚集体^[1], 生物被膜的形成加剧了假单胞菌的危害, 可增强假单胞菌的致病性和耐药性, 严重威胁人类健康。

胞外多糖是假单胞菌生物被膜的主要成分, 在其生物被膜黏附、发育、成熟过程中发挥重要作用, 并能增强细菌对宿主细胞的侵袭力以及对抗生素类药物的耐受性^[2]。研究表明, 与假单胞菌生物被膜形成直接相关的3种核心胞外多糖为: 褐藻胶、Psl和Pel, 它们分别通过褐藻胶生物合成系统(alginate biosynthetic system)、Psl生物合成系统(Psl biosynthetic system)和Pel生物合成系统(Pel biosynthetic system)进行合成和转运^[3]。这3个生物合成系统主要包含4类蛋白质: 胞内蛋白、内膜

蛋白、周质蛋白和外膜蛋白。胞内蛋白位于细胞内膜内侧, 参与胞外多糖的合成, 并负责将多糖从胞内向内膜转运。内膜蛋白位于细胞内膜, 参与多糖的进一步修饰, 并负责将多糖传递给周质蛋白。周质蛋白位于细胞的周质空间中, 负责将多糖从周质空间到外膜。外膜蛋白位于细胞外膜, 负责将胞外多糖转运到细胞膜外, 最终参与假单胞菌生物被膜的形成, 使细菌能够抵抗外界不良环境的入侵, 导致严重的医疗、环境及食品安全问题^[4]。

关于假单胞菌褐藻胶、Psl和Pel胞外多糖生物合成系统的研究已经陆续开展(表1), 明晰其具体的结构和功能, 有助于人们更好地理解假单胞菌

* 国家博士后创新人才支持计划(BX20190194), 国家自然科学基金(32001800), 上海市“超级博士后”激励计划(2019348)和中国博士后科学基金(2019M661469)资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

张昭寰 Tel/Fax: 021-61900503,

E-mail: gongziwuhen@126.com, zh-zhang@shou.edu.cn

赵勇 Tel/Fax: 021-61900768, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

收稿日期: 2021-03-01, 接受日期: 2021-06-03

生物被膜的形成机理,并为抗被膜制剂的研发提供精准的三维靶标和理论基础。因此,本文系统地介绍了假单胞菌生物被膜3种核心胞外多糖的生物合

成系统,并详细地阐述了各蛋白质的结构、功能以及相互作用关系,最后对假单胞菌生物被膜胞外多糖生物合成系统的进一步研究提出展望。

Table 1 Function of known structure proteins in the core exopolysaccharide biosynthetic systems of *Pseudomonas*

表1 假单胞菌核心胞外多糖生物合成系统中已知结构蛋白质的功能

	相关蛋白质	已知结构PDB编号	功能	参考文献
褐藻胶生物合成系统	AlgC	1K35	磷酸甘露糖变位酶活性	[5]
	AlgD	1MV8	GDP-甘露糖脱氢酶活性	[6]
	Alg44	4RT0	c-di-GMP的调控	[7]
	AlgG	4NK6	C5甘露聚糖异构酶活性	[8]
	AlgJ	4O8V	O-乙酰化酶活性	[9]
	AlgF	6D10; 6CZT	O-乙酰化酶活性	[3]
	AlgX	4KNC	O-乙酰转移酶活性	[10]
	AlgL	4OZV	褐藻胶裂解酶活性	[3]
	AlgK	3E4B	TPR支架负责系统的稳定性	[11]
	AlgE	3RBH	β 桶状结构负责多糖的输出	[12]
Psl生物合成系统	PslG	5BX9	糖苷水解酶活性	[13]
Pel生物合成系统	PelD	4DN0	c-di-GMP的调控	[14]
	PelA	5TCB	糖苷水解酶活性	[15]
	PelB	5WFT	TPR支架负责系统的稳定性	[16]
	PelC	5T11	漏斗状结构负责多糖的吸附	[17]

1 褐藻胶胞外多糖生物合成系统

褐藻胶是一种由 β -D-甘露糖醛酸及其C5异构体 α -L-古罗糖醛酸组成的阴离子多糖^[18],是假单胞菌生物被膜的主要成分,也是假单胞菌产生黏附性的主要原因。褐藻胶的合成和转运需要13个蛋白质:胞内蛋白AlgA、AlgC和AlgD;内膜蛋白Alg8、Alg44;周质蛋白AlgI、AlgJ、AlgF、AlgX、AlgG和AlgL;外膜蛋白AlgK和AlgE。它们的合成和转运过程如图1所示。首先,单糖在AlgA、AlgC和AlgD的作用下转化为GDP-甘露糖酸,然后GDP-甘露糖酸经聚合酶(Alg8和Alg44)的催化后生成甘露聚糖。在AlgI、AlgJ、AlgF和AlgX的协同作用下,通过乙酰化作用对该聚合物进行改性,并通过AlgG及AlgL将其异构化,形成成熟的褐藻胶。最后,成熟的褐藻胶在AlgK参与的周质多蛋白复合物介导下穿过外膜的AlgE蛋白转运到细胞外。

1.1 胞内褐藻胶前体合成酶AlgA、AlgC和AlgD

褐藻胶的前体物质D-甘露糖酸在细菌细胞内合成,其合成主要分为以下4步:a.果糖-6-磷酸在AlgA的磷酸甘露糖异构酶(PMI)活性作用下生

成甘露糖-6-磷酸;b.甘露糖-6-磷酸经AlgC催化生成甘露糖-1-磷酸;c.甘露糖-1-磷酸进一步在AlgA的GDP-甘露糖焦磷酸化酶(GMP)活性作用下生成GDP-甘露糖;d.GDP-甘露糖在AlgD的催化下生成GDP-甘露糖酸^[19]。这些参与核苷酸结合的酶至少存在1个罗斯曼(Rossmann)折叠结构域,由交替的 β 链和 α 螺旋组成的二级结构,中心的6股平行 β 折叠连接到周围的5个 α 螺旋,这种结构能够产生或结合糖核苷酸前体^[4]。

AlgA是一种双功能酶,表现出磷酸甘露糖异构酶(PMI)和GDP-甘露糖焦磷酸化酶(GMP)活性^[20],但其结构尚未确定。Regni等^[5]在2002年解析了AlgC的晶体结构,是一种磷酸甘露糖变位酶,包含4个大小相近的结构域,这4个结构域排列成“心形”,并在其中心形成1个大的活性位点裂缝。研究表明,前3个结构域具有相同的拓扑结构,由夹在两个 α 螺旋之间的4股 β 折叠混合组成,而第4个结构域具有类似于TBP超家族蛋白(TATA-box binding protein superfamily)的结构,由2个 α 螺旋和4股反向 β 折叠组成。此外,AlgC结构中还包含4个活性位点:位于108位的丝氨酸涉及磷酸基团转移;位于242~246的残基具有 Mg^{2+}

从而将GDP-甘露糖催化成为GDP-甘露糖酸。

1.2 跨内膜复合物Alg8和Alg44

Alg8和Alg44均位于假单胞菌细胞内膜上,共同组成了跨内膜的复合物^[21]。Alg8是一种糖基转移酶,其三维结构未知,Oglesby等^[22]预测其含有4个跨膜螺旋以及1个可溶性胞质环。在胞质环中存在2个结构域,其中结构域A与II类 β 糖基转移酶的序列同源性较高,含有保守的天冬氨酸残基和DXD氨基酸基序,可能分别是NDP-葡萄糖和受体分子的结合位点;结构域B含有一个保守的天冬氨酸残基和LXXRW氨基酸基序,可能负责将多个NDP-葡萄糖转移到受体分子。Remminghorst等^[23]经实验证明,Alg8是褐藻胶生物合成的关键,*alg8*的过表达会导致褐藻胶产量增加、乙酰化以及差向异构化。

Alg44在体内以同源二聚体的形式存在,其N端有1个锚定于膜上的信号肽,以及1个位于细胞质的PilZ结构域,该结构域能够结合环二鸟苷酸(c-di-GMP)并调节褐藻胶的聚合^[24-26]。Whitney等^[7]解析出了Alg44胞质域与c-di-GMP复合物的结构,该结构呈现出1个分裂的桶状结构,包含6个反向平行的 β 链和1个 α 螺旋。Alg44蛋白C端含1个TM结构和周质域,其周质域中包含膜融合蛋白(MFP)结构,在褐藻胶前体GDP-甘露糖酸的聚合和修饰中发挥作用。Oglesby等^[22]认为Alg44蛋白的MFP结构域能够通过蛋白质间相互作用,向Alg44的N端发送构象信号,影响Alg8聚合D-甘露糖的能力,从而控制Alg44蛋白的PilZ结构域与c-di-GMP结合。

1.3 周质中乙酰化修饰蛋白AlgI、AlgJ、AlgF和AlgX

GDP-甘露糖酸形成多聚物后将进一步在周质空间内进行乙酰化修饰^[27],该乙酰化过程发生在甘露糖残基的C2和C3羟基,由AlgI、AlgJ、AlgF和AlgX构成的乙酰化复合物进行修饰。在细胞质中,AlgI与未知的乙酰供体分子相互作用,并穿过内膜将乙酰供体转移到AlgJ或AlgF。AlgX从AlgJ或AlgF中接收乙酰供体分子,然后催化褐藻胶的直接O-乙酰化^[28]。目前关于AlgI的具体结构尚未研究,AlgJ、AlgF和AlgX的结构于近些年陆续得到解析。

Baker等^[9]解析了恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*) AlgJ周质域的结构,该蛋白质含有4个平行的核心 β 链($\beta 3$ 、 $\beta 6$ ~8),在9个 α

螺旋($\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ ~10)的包围下共同形成了 $\alpha/\beta/\alpha$ 折叠,两个反向平行的 β 链($\beta 4$ 和 $\beta 5$)位于 $\alpha/\beta/\alpha$ 折叠的侧边,且其顶部有一个 $\alpha 2$ 、 $\beta 2$ 和 $\beta 3$ 链组成的帽子结构。Ser-His-Asp保守催化三残基是该蛋白质表现出O-乙酰化活性的原因,其中D190和H192残基位于帽子结构中,而S288位于 $\alpha/\beta/\alpha$ 折叠中。AlgF的结构已经被解析,发布于PDB数据库中(PDB ID: 6CZT),具有2个串联的 β 三明治结构,介导AlgJ蛋白与AlgX蛋白相互作用,负责乙酰基的转移^[3]。

Riley等^[10]解析了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) AlgX的晶体结构,它是一种双结构域蛋白,其N端含有 $\alpha/\beta/\alpha$ 拓扑结构,包括7个核心 α 螺旋,与SGNH水解酶超家族具有结构同源性,不同之处在于AlgX只包含5股平行 β 股的前4股,第5股为单残基 β 桥(W153),且这4个核心 β 链的顺序也不同。D174、H176和S269残基组成了水解酶结构域的催化三联体,负责乙酰基向褐藻胶转移。AlgX的C端为碳水化合物结合模块(carbohydrate-binding module, CBM),呈现最常见的 β 三明治折叠,每个 β 折叠包含4个反向平行的 β 链。CBM中的芳香氨基酸和极性保守残基存在于蛋白质表面的凹槽中,形成一个独特的底物识别“夹点”,该“夹点”的存在有助于增加多糖-蛋白质复合物的稳定性。因此,GDP-甘露聚糖可在C端与AlgX结合,通过夹点并沿保守路径运动,然后通过AlgX的N端向GDP-甘露聚糖中添加乙酰基,从而实现多聚物的改性。

1.4 周质中异构化蛋白AlgG和AlgL

AlgG是一种C5差向异构酶,Wolfram等^[8]解析了丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*) AlgG蛋白的晶体结构,AlgG的主干是一个右手平行 β 螺旋,包括11个完整线圈和1个不完整线圈,每个线圈由3个 β 折叠组成,依次由3个转弯环连接。线圈4~10形成一个碳水化合物结合/糖水解结构域(carbohydrate-binding/sugar hydrolysis domains),N端的1个帽状螺旋与2个反平行的 β 折叠共同形成该结构域的盖子。AlgG能在聚合物水平上将甘露糖残基转化为古鲁酸,从而生成甘露酸、古鲁酸交替排列的成熟褐藻胶。Jain等^[29]认为AlgG除了具有异构酶活性,还能保护新生褐藻胶在穿过周质时不被AlgL降解。AlgL是一种褐藻胶水解酶,呈现(α/α)₆桶状折叠,能够裂解没有从周质空间中转出的褐藻胶,从而防止其在周质空间的积累^[30-31]。

1.5 外膜蛋白AlgK和AlgE

Keiski 等^[11]的结构解析表明, AlgK 是一种外膜脂蛋白, 由 22 个 α 螺旋组成的紧凑超螺旋结构, 其中 1 个 N 端螺旋与超螺旋结构的凹面相结合, 其余 21 个反向平行的 α 螺旋聚集形成右手超螺旋。AlgK 有 3 个蛋白质相互作用位点, 其中 2 个作用位点靠近 N 端的脂质锚, 从而直接与 AlgE 的周质环相互作用, 位于 C 端的作用位点可能与周质蛋白或内膜蛋白结合。研究认为, 该蛋白质具有至少 9.5 个 TPR 基序 (tetratricopeptide-like repeat), 在大型蛋白质复合物的组装中发挥支架作用, 可与 AlgE、Alg8 和 Alg44 相连接, 并与 AlgX 和 AlgG 一起形成跨周质通道^[32-33]。Tan 等^[34]研究认为, AlgK 可能是以“末端对末端”的形式与 AlgE 的周质孔相连接, 有效延长了褐藻胶的输出长度, 以便于其通过 AlgE 的 β 桶。

Whitney 等^[12]在 2011 年对外膜蛋白 AlgE 的结构进行了研究, 证明该蛋白质是由 18 个 β 股 (S1~S18) 组成的反向平行 β 桶状结构, 含 9 个胞外环 (L1~L9) 和 8 个周质环 (T1~T8), 能自发地结合到细胞外膜上, 其内部带正电性, 可与带电负性的褐藻胶结合。Tan 等^[34]认为 L2 和 T8 分别为该蛋白质的胞外门和周质门, 通过两个门控的开放与关闭来调节褐藻胶的转运。L2 可能通过二价阳离子稳定电负性的脂多糖 (LPS), 以防止 LPS 干扰褐藻胶的有效分泌。周质环 T8 的构象很灵活, 可以向下和向外运动, 负责将 AlgE 蛋白由“关闭”构象转变为“开放”构象, 使 AlgE 与 AlgK 直接相互作用, 从而促进褐藻胶向膜外转运。胞外环 L3 和 L7 折叠到桶腔中, 占据了通道的大部分体积从而限制孔隙的大小, 有助于该蛋白质结构的稳定^[35]。研究还发现, AlgE 的周质 T4 是维持 AlgE、AlgK、AlgX 和 Alg44 形成稳定多蛋白质复合物的重要区域^[36]。

2 Psl 胞外多糖生物合成系统

Psl 是一种由 D-甘露糖、D-葡萄糖和 L-鼠李糖组成的中性五糖^[37]。其合成和转运由 Psl 胞外多糖生物合成系统负责^[38]。Psl 操纵子包含 12 个基因 (PslA、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L), 当前只有 PslG 的周质域结构得到解析, 其余蛋白质结构仍是未知。Psl 胞外多糖的生物合成系统如图 2 所示, 糖-核苷酸前体经 PslB 合成后, 通过 PslF、PslH、PslI 和 PslC 转移糖基形成 Psl 重复单

元, 然后由内膜蛋白 PslA 提供一个位点, 将 Psl 重复单元组装到细胞质的类异戊二烯脂质上, 同时在 PslJ、PslK 和 PslL 等内膜蛋白的作用下, Psl 多糖聚合并穿过细胞内膜, 随后 PslE 作为周质支架帮助 Psl 多糖穿过周质, 最终 Psl 多糖经 PslD 到达细胞膜外^[39]。

2.1 胞内蛋白PslB、PslF、PslH、PslI和PslC

PslB、PslF、PslH、PslI 和 PslC 位于细胞质中, 具体三维结构均属研究空白。PslB 是一种与 AlgA 相似的双功能酶, 预测具有 N 端 GMP 结构域和 C 端 PMI 结构域, 参与糖-核苷酸前体的生产^[37]。PslF、PslH 和 PslI 与分枝杆菌的磷脂酰肌醇甘露醇转移酶 PimA 结构具有相似性, 具有糖基转移酶 (glycosyltransferase, GT) 结构域, 属于 CAZyGT-4 家族的酶, 采用 GT-B 折叠, 通过保留机制转移糖基残基, 可能负责将活化的糖亚基加入到 Psl 多糖的重复结构中。PslC 与小鼠多肽 α -N 乙酰半乳糖氨基转移酶 T1 结构相似, 属于 CAZyGT-2 家族, 采用 GT-A 折叠, 可以负责葡萄糖、鼠李糖和甘露糖等多种核苷酸激活糖的转移。根据 PslF、PslH、PslI 和 PslC 的预测结构, 这些酶可能负责转移糖-核苷酸前体的糖基, 从而形成 Psl 多糖重复单元^[4]。

2.2 内膜蛋白PslA、PslE、PslJ、PslK、PslL和PslG

PslA、PslE、PslJ、PslK、PslL 和 PslG 这 6 种内膜蛋白都具有跨膜结构域, 可能在细胞内膜上组成复合物。目前, 除了 PslG 的可溶域结构之外, 其余 5 种蛋白质的结构尚不明确。PslA 与细菌的 WbaP 蛋白结构相似, 具有聚异戊二烯糖基磷酸转移酶活性, 可能为 Psl 低聚糖重复单元提供 1 个位点, 将其组装到内膜细胞质侧的类异戊二烯脂质上^[4]。PslE 的周质域与大肠杆菌内膜蛋白 Wzz 存在结构相似性, 是一种卷曲的线圈结构, 单体可组装成具有中心孔的六聚体或八聚体^[40]。Wu 等^[41]研究表明, PslE 可能作为支架, 与 PslA、PslD 相互作用形成内膜复合物, 促进 Psl 多糖向周质空间转运。PslJ 没有明显的结构同系物, PslK 蛋白与霍乱弧菌 NorM 蛋白结构相似, 能够通过挤压的方式将多糖分子转运至周质空间^[42]。PslL 具有酰基转移酶 3 结构域, 但 Psl 多糖不被小官能团修饰, 因此很难推测 PslL 的具体作用^[4]。

Baker 等^[13]解析了 PslG 蛋白第 31~442 位氨基酸的周质域结构, PslG (31~442) 具有糖苷水解酶活

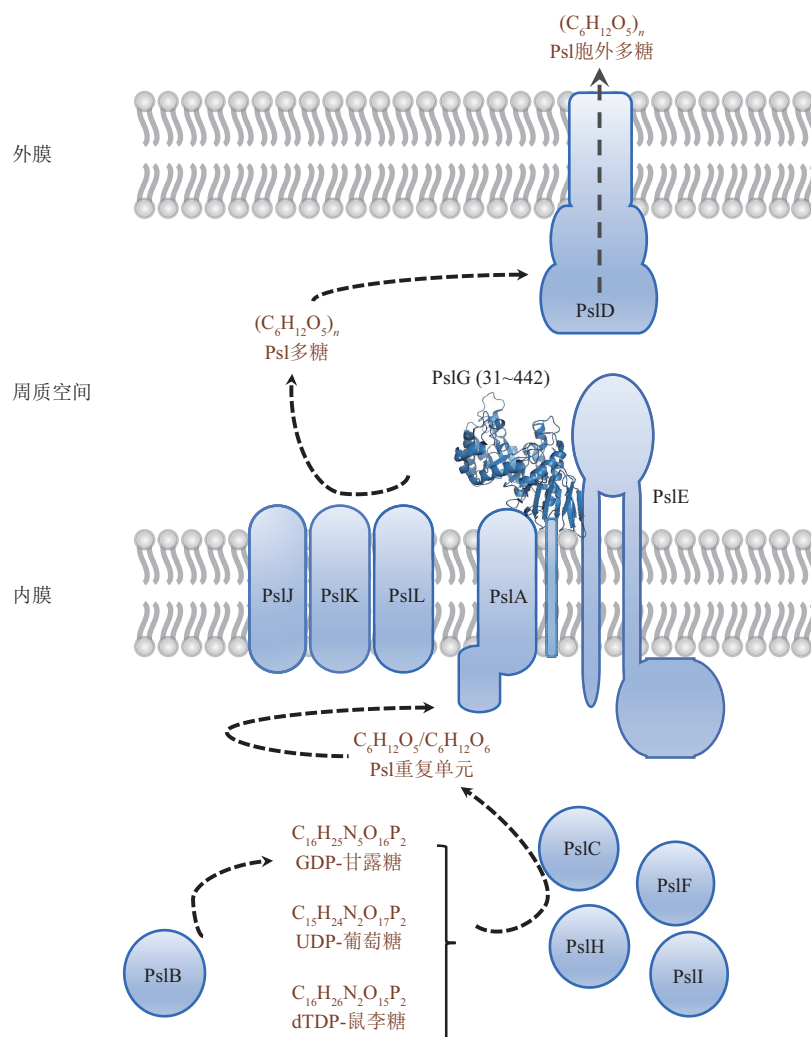


Fig. 2 Psl extracellular polysaccharide biosynthetic system

图2 Psl胞外多糖生物合成系统

PslG (31~442) 蛋白质结构根据PDB数据中5BX9^[13] 蛋白信息进行绘制。

性, 包含2个结构域: N端的 $(\beta/\alpha)_8$ 桶状结构中有6个大环 (L1~L6), 这些大环包含小的二级结构元件, 能够连接 $(\beta/\alpha)_8$ 折叠中的 α 螺旋和 β 折叠, 形成1个长约32Å的镰刀形深槽。C端的 β 三明治结构由1个小 β 折叠和在 $(\beta/\alpha)_8$ 催化结构域之后的6个 β 折叠组成。Wu等^[41]研究表明, 在PslG蛋白中, 与内膜结合部分有助于Psl的合成, 周质部分表现出水解活性, 与Psl胞外多糖的产生和初始黏附有关。

2.3 外膜蛋白PslD

PslD位于细胞外膜上, 与大肠杆菌荚膜转位酶Wza结构相似, 具有八聚体结构, 存在1个大的中心腔, 推测其与Wza具有相同的多糖跨膜转运功能, 可帮助Psl多糖从周质空间转移到细胞膜

外^[43]。不同之处在于, PslD具有2个周质离散环, 而Wza比它多1个, 并且PslD似乎缺乏外膜的 α 螺旋桶状结构, 因此在PslD具体的三维结构被解析出来之前, 对于其转运Psl多糖通过外膜的转运机制研究尚属空白。此外, Wu等^[41]研究表明, PslD与PslE具有很强的相互作用, 这种相互作用有助于PslD在外膜上的定位。

3 Pel胞外多糖生物合成系统

Pel是一种由部分乙酰化的N-乙酰半乳糖胺和N-乙酰葡萄糖胺组成的阳离子胞外多糖^[44], 能够帮助假单胞菌在气-水界面形成一层薄膜, 可以帮助细菌抵抗氨基糖苷类抗生素, 在生物被膜基质中发挥

结构和保护作用。参与Pel胞外多糖生物合成系统的7个蛋白质由7个基因操纵子pelA、B、C、D、E、F、G编码,其合成转运过程如图3所示: PelF蛋白以UDP-葡萄糖为底物将糖基转移到Pel多糖上, PelD蛋白与c-di-GMP结合调控Pel多糖的转

运, 位于内膜的PelE和PelG帮助Pel多糖穿过内膜, 周质中的伴侣蛋白PelA将Pel多糖修饰为成熟的阳离子多糖后, 成熟的Pel多糖被PelC吸引穿过外膜的PelB桶孔最终到达细胞外。

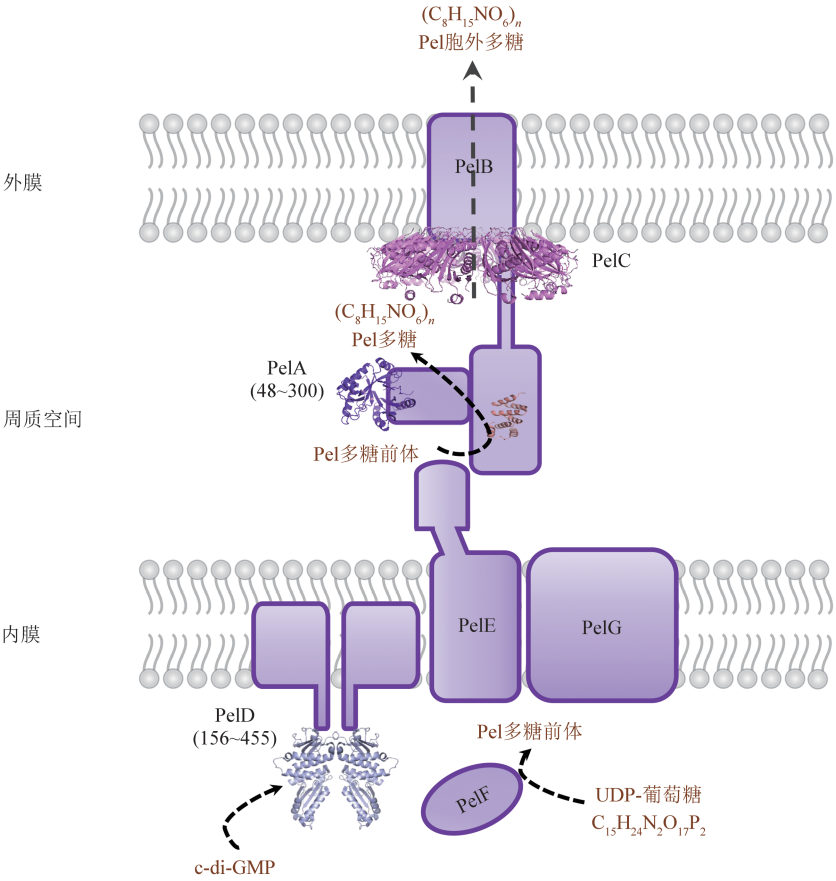


Fig. 3 Pel extracellular polysaccharide biosynthetic system
图3 Pel胞外多糖生物合成系统

PelD、PelA、PelB和PelC等蛋白质结构根据PDB数据中4DN0^[14]、5TCB^[15]、5WFT^[16]和5T11^[17]等蛋白质信息进行绘制。

3.1 胞内蛋白PelF

PelF是一种糖基转移酶,位于细胞质中,不含跨膜螺旋,以UDP-葡萄糖为底物合成Pel多糖^[45]。在CAZy数据库中,该蛋白质属于GT-4家族,呈现GT-B折叠,并且C端含有EX₇E基序^[46]。E405和E413是EX₇E基序中的2个保守残基,但E413对PelF蛋白的酶活性并没有影响。PelF还包含2个保守DXD基序,但与其他糖基转移酶不同,这4个天冬氨酸对PelF蛋白的酶活性没有影响。此外,K330和R325氨基酸残基对PelF的酶活性有重要作用,可与UDP-葡萄糖磷酸根的氧原子作用形成

氢键。

3.2 内膜聚合物PelDEG

内膜上的PelD、PelE和PelG蛋白组成一个三联体复合物,参与Pel胞外多糖的跨内膜转运。Whitfield等^[47]研究证明PelDEG复合物与PelF相互作用并帮助PelF定位于内膜,但PelDEG复合物的结构仍未知,仅有PelD胞质域的结构被解析。

Whitney等^[14]对PelD蛋白第156~455位氨基酸的胞质域结构进行了研究,PelD(156~455)含4个跨膜螺旋,第4个跨膜螺旋延伸到细胞质中,连接跨膜结构域与可溶性细胞质区域。N端含有1个

GAF 结构域, 其拓扑结构为 $\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$, C 端为 GGDEF 结构域, 其拓扑结构为 $\alpha\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta\alpha$, 二者经一段无序的短链连接, 形成了 1 个 $653\text{\AA}^2$ 的界面。在 GGDEF 结构域中存在保守的 RXXD 基序, 可作为与 c-di-GMP 结合的 I 位点。当 c-di-GMP 与该位点结合时, N 端的 GAF 结构域会发生 14° 旋转, 使得界面的面积从 $653\text{\AA}^2$ 减小为 $609\text{\AA}^2$, 以调控 Pel 多糖的生物合成。PelE 包含 1 个 I 型输出信号单元和 2 个跨膜螺旋结构域, 这种排列使得 PelE 的大部分 C 端位于周质空间中^[48]。预测 C 端区域都是 α 螺旋, 含有至少有 4~5 个 TPR 基序, 可作为支架蛋白, 通过与 PelA 和 PelB 相互作用, 促进 Pel 多糖的转运。PelG 与霍乱弧菌的 NorM 结构相似, 预测含有 12 个 TM 结构域, 可能与 MATE 蛋白家族成员具有相似的功能, 在 Pel 多糖通过内膜的过程中发挥作用^[42]。

3.3 周质伴侣蛋白 PelA

PelA 是 Pel 多糖的伴侣蛋白, 主要位于周质空间中^[49]。通过生物信息学分析发现, PelA 含两个主要的结构域, N 端为糖苷水解酶域 (glycoside hydrolase, GH), 属于 GH114 家族, 该区域的结构已经被解析 (PDB ID: 5TCB), 呈现 β_8/α_7 TIM 桶状结构, 其中有 1 个高度电负性的裂缝, 内表面为保守的酸性残基, 在阳离子多糖的结合中起到关键作用^[3]。C 端结构域为碳水化合物酯酶域, 表现出金属依赖的脱乙酰酶活性, 被证明与 Pel 多糖的合成直接相关。Pel 多糖在周质空间中能够通过 PelA 进行脱乙酰化修饰, 形成成熟的 Pel 多糖。

3.4 外膜上的复合物 PelBC

PelB 的 N 端含 19 个连续的 TPR 结构基序, 可作为该系统中其余蛋白质的结构支架^[4]。Marmont 等^[16] 研究表明, 该 TPR 结构域的离散区域能够与 PelA 相互作用, 但每个 TPR 基序的作用又有所不同, 其中 R9~R14 能够促进 PelA 在周质空间中的定位, R15~R19 可以作为重复的“间隔区”, 引起 PelA 和 PelC 之间的空间碰撞。PelB 能够将 PelA “招募”到外膜, 并与 PelA 直接相互作用, 诱导 PelA 发生构象改变, 使其脱乙酰酶活性增加, 水解酶活性降低, 使得 Pel 多糖更有效的脱乙酰化。Marmont 等^[17] 经实验证明, PelB 的 C 端为跨膜 β 桶状结构, 预测由 16 个 β 链组成, 负责将 Pel 多糖转运到膜外。C 端 β 桶结构域和 N 端 TPR 结构域之间是一段约 120 个残基的连接区域, 其具体的结构还无法预测, 推测这段结构穿过 PelC 的中间孔,

并与其相互作用。

PelC 为外膜脂蛋白, 位于外膜的内侧。Marmont 等^[17] 解析了 PelC 的结构, 结果表明 PelC 单体为混合的 α/β 折叠, 在体内形成中心约 $30\text{\AA}$ 孔隙的十二环状聚合物。该聚合物类似于 1 个没有柄的“漏斗”, 凸面靠近细胞外膜, 与磷脂的电负性基团相互作用。N 端的 149 位色氨酸保守残基在孔内聚合形成 1 个芳香带, 负责将 PelC 聚合物锚定在外膜上。而 PelC 的凹面呈高度电负性, 负责将带正电荷的 Pel 多糖吸附到“漏斗”内部, 将其引导进入 PelB 的 β 桶中, 并将其转运到细胞膜外, 参与假单胞菌生物被膜的构筑。

4 总结与展望

假单胞菌被视为研究生物被膜的模式菌株, 褐藻胶、Psl 和 Pel 胞外多糖是假单胞菌生物被膜的重要组成部分, 能够帮助细菌细胞抵抗外界的不利条件, 其合成和转运依赖于对应的褐藻胶、Psl 和 Pel 胞外多糖生物合成系统。本文系统地总结了这 3 种系统相关蛋白质结构生物学的研究进展, 在微观层面阐述了这些系统的相关功能, 可为假单胞菌胞外多糖合成、转运和分泌的进一步研究奠定扎实的理论基础, 并为进一步揭示细菌生物被膜的形成机制提供新的视野及思路。基于以上假单胞菌胞外多糖生物合成系统的研究现状, 本文对其未来的研究方向提出以下两点展望。

4.1 解析相关膜蛋白及复合物的未知结构和功能

在目前已经解析的假单胞菌胞外多糖生物合成系统的三维结构中, 除了 AlgE 之外, 大多数研究均集中于可溶性蛋白、或者膜蛋白的可溶部分, 对于这 3 种系统相关膜蛋白的研究还相对较少, 尤其缺乏膜蛋白复合物的研究, 极大限制了人们对于这些生物合成系统作用机制的理解。因此, 未来研究应着重针对膜蛋白及膜蛋白复合物的未知结构和功能展开, 以明晰此类系统的分子机理及生命调控过程, 揭示胞外多糖的生物合成与假单胞菌生物被膜形成之间复杂的相互作用关系, 为假单胞菌生物被膜形成机制的研究奠定理论基础。

4.2 研发靶向于胞外多糖生物合成系统的新型抗生物被膜制剂

生物被膜是假单胞菌抵抗外界不利条件的保护屏障, 胞外多糖在该保护屏障中起着结构支撑作用, 其合成转运依赖胞外多糖生物合成系统。若针对性地破坏这些蛋白质的活性, 能够有效阻断胞外

多糖合成转运过程, 从根本上控制细菌生物被膜的形成。虽然目前已有多种抗生物被膜制剂被陆续研发, 但仅停留于破坏胞外多糖、胞外蛋白和胞外DNA的层面^[50]。胞外多糖生物合成系统的存在, 将不断地为细菌输送新合成的胞外多糖, 导致细菌生物被膜的再次形成。因此, 未来新型抗生物被膜制剂的研究, 可基于胞外多糖生物合成系统设计靶向控制策略, 从源头上彻底清除细菌生物被膜。

参 考 文 献

- [1] Zhang L, Hong X S, Zhao X, *et al.* Exposure to environmentally relevant concentrations of deltamethrin renders the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) vulnerable to *Pseudomonas fluorescens* infection. *Sci Total Environ*, 2020, **715**: 136943
- [2] Flemming H C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 2010, **8**(9): 623-633
- [3] Low K E, Howell P L. Gram-negative synthase-dependent exopolysaccharide biosynthetic machines. *Curr Opin Struct Biol*, 2018, **53**: 32-44
- [4] Franklin M J, Nivens D E, Weadge J T, *et al.* Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol*, 2011, **2**: 167
- [5] Regni C, Tipton P A, Beamer L J. Crystal structure of PMM/PGM: an enzyme in the biosynthetic pathway of *P-aeruginosa* virulence factors. *Structure*, 2002, **10**(2): 269-279
- [6] Snook C F, Tipton P A, Beamer L J. Crystal structure of GDP-mannose dehydrogenase: a key enzyme of alginate biosynthesis in *P-aeruginosa*. *Biochemistry*, 2003, **42**(16): 4658-4668
- [7] Whitney J C, Whitfield G B, Marmont L S, *et al.* Dimeric c-di-GMP is required for post-translational regulation of alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 2015, **290**(20): 12451-12462
- [8] Wolfram F, Kitova E N, Robinson H, *et al.* Catalytic mechanism and mode of action of the periplasmic alginate epimerase AlgG. *J Biol Chem*, 2014, **289**(9): 6006-6019
- [9] Baker P, Ricer T, Moynihan P J, *et al.* *P. aeruginosa* SGNH hydrolase-like proteins AlgJ and AlgX have similar topology but separate and distinct roles in alginate acetylation. *PLoS Pathog*, 2014, **10**(8): e1004334
- [10] Riley L M, Weadge J T, Baker P, *et al.* Structural and functional characterization of *Pseudomonas aeruginosa* AlgX: role of AlgX in alginate acetylation. *J Biol Chem*, 2013, **288**(31): 22299-22314
- [11] Keiski C L, Harwich M, Jain S, *et al.* AlgK is a TPR-containing protein and the periplasmic component of a novel exopolysaccharide secretin. *Structure*, 2010, **18**(2): 265-273
- [12] Whitney J C, Hay I D, Li C, *et al.* Structural basis for alginate secretion across the bacterial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, **108**(32): 13083-13088
- [13] Baker P, Whitfield G B, Hill P J, *et al.* Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG reveals that its levels are critical for Psl polysaccharide biosynthesis and biofilm formation. *J Biol Chem*, 2015, **290**(47): 28374-28387
- [14] Whitney J C, Colvin K M, Marmont L S, *et al.* Structure of the cytoplasmic region of PelD, a degenerate diguanylate cyclase receptor that regulates exopolysaccharide production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 2012, **287**(28): 23582-23593
- [15] Baker P, Hill P J, Snarr B D, *et al.* Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci Adv*, 2016, **2**(5): e1501632
- [16] Marmont L S, Whitfield G B, Rich J D, *et al.* PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem*, 2017, **292**(47): 19411-19422
- [17] Marmont L S, Rich J D, Whitney J C, *et al.* Oligomeric lipoprotein PelC guides Pel polysaccharide export across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(11): 2892-2897
- [18] Whitney J C, Howell P L. Synthase-dependent exopolysaccharide secretion in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*, 2013, **21**(2): 63-72
- [19] Hay I D, Rehman Z U, Ghafoor A, *et al.* Bacterial biosynthesis of alginates. *J Chem Technol Biot*, 2010, **85**(6): 752-759
- [20] Zielinski N A, Chakrabarty A M, Berry A. Characterization and regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* algC gene encoding phosphomannomutase. *J Biol Chem*, 1991, **266**(15): 9754-9763
- [21] Moradali M F, Ghods S, Rehm B H A. Activation mechanism and cellular localization of membrane-anchored alginate polymerase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 2017, **83**(9): e03499-16
- [22] Oglesby L L, Jain S, Ohman D E. Membrane topology and roles of *Pseudomonas aeruginosa* Alg8 and Alg44 in alginate polymerization. *Microbiology*, 2008, **154**: 1605-1615
- [23] Remminghorst U, Rehm B H A. *In vitro* alginate polymerization and the functional role of Alg8 in alginate production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microb*, 2006, **72**(1): 298-305
- [24] Amikam D, Galperin M Y. PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 2006, **22**(1): 3-6
- [25] Remminghorst U, Rehm B H A. Alg44, a unique protein required for alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett*, 2006, **580**(16): 3883-3888
- [26] 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*. *Mol Microbiol*, 2007, **65**(4): 876-895
- [27] Pier G B, Coleman F, Grout M, *et al.* Role of alginate O acetylation in resistance of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to opsonic phagocytosis. *Infect Immun*, 2001, **69**(3): 1895-1901
- [28] Chanasit W, Gonzaga Z J C, Rehm B H A. Analysis of the alginate O-acetylation machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, **104**(5): 2179-2191

- [29] Jain S, Franklin M J, Ertesvag H, *et al.* The dual roles of AlgG in C-5-epimerization and secretion of alginate polymers in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol*, 2003, **47**(4): 1123-1133
- [30] Gheorghita A A, Wong S, Wolfram F, *et al.* Role of AlgL in *Pseudomonas aeruginosa* alginate biosynthesis. *Acta Crystallogr A*, 2018, **74**: A165-A165
- [31] Farrell E K, Tipton P A. Functional characterization of AlgL, an alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 2012, **51**(51): 10259-10266
- [32] Rehman Z U, Wang Y, Moradali M F, *et al.* Insights into the assembly of the alginate biosynthesis machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microb*, 2013, **79**(10): 3264-3272
- [33] Moradali M F, Donati I, Sims I M, *et al.* Alginate polymerization and modification are linked in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mbio*, 2015, **6**(3): 17
- [34] Tan J, Rouse S L, Li D, *et al.* A conformational landscape for alginate secretion across the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, **70**(Pt 8): 2054-2068
- [35] Hay I D, Rehman Z U, Rehm B H A. Membrane topology of outer membrane protein AlgE, which is required for alginate production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microb*, 2010, **76**(6): 1806-1812
- [36] Rehman Z U, Rehm B H A. Dual roles of *Pseudomonas aeruginosa* AlgE in secretion of the virulence factor alginate and formation of the secretion complex. *Appl Environ Microb*, 2013, **79**(6): 2002-2011
- [37] Byrd M S, Sadovskaya I, Vinogradov E, *et al.* Genetic and biochemical analyses of the *Pseudomonas aeruginosa* Psl exopolysaccharide reveal overlapping roles for polysaccharide synthesis enzymes in Psl and LPS production. *Mol Microbiol*, 2009, **73**(4): 622-638
- [38] Byrd M S, Pang B, Mishra M, *et al.* The *Pseudomonas aeruginosa* exopolysaccharide Psl facilitates surface adherence and NF-kappa B activation in A549 cells. *Mbio*, 2010, **1**(3): e00140-10
- [39] Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 2006, **75**: 39-68
- [40] Grangeasse C, Cozzzone A J, Deutscher J, *et al.* Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci*, 2007, **32**(2): 86-94
- [41] Wu H J, Wang D, Tang M M, *et al.* The advance of assembly of exopolysaccharide Psl biosynthesis machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen*, 2019, **8**(10): e857
- [42] He X, Szweczyk P, Karyakin A, *et al.* Structure of a cation-bound multidrug and toxic compound extrusion transporter. *Nature*, 2010, **467**(7318): 991-U139
- [43] Yu S, Su T T, Wu H J, *et al.* PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix. *Cell Res*, 2015, **25**(12): 1352-1367
- [44] 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. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, **112**(36): 11353-11358
- [45] Ghafoor A, Jordens Z, Rehm B H A. Role of PelF in Pel polysaccharide biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microb*, 2013, **79**(9): 2968-2978
- [46] Coutinho P M, Deleury E, Davies G J, *et al.* An evolving hierarchical family classification for glycosyltransferases. *J Mol Biol*, 2003, **328**(2): 307-317
- [47] Whitfield G B, Marmont L S, Ostaszewski A, *et al.* Pel polysaccharide biosynthesis requires an inner membrane complex comprised of PelD, PelE, PelF, and PelG. *J Bacteriol*, 2020, **202**(8): e00684-19
- [48] D'Andrea LD, Regan L. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci*, 2003, **28**(12): 655-662
- [49] Colvin K M, Alnabelsya N, Baker P, *et al.* PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 2013, **195**(10): 2329-2339
- [50] 吴倩, 张昭寰, 童金蓉, 等. 酶制剂清除食源性致病菌生物被膜的研究进展. *生物工程学报*, 2021, **37**(7): 2366-2378
- Wu Q, Zhang Z H, Tong J R, *et al.* *Chinese Journal of Biotechnology*, 2021, **37**(7): 2366-2378

Research Progress on *Pseudomonas* Biofilm Formation-related Key Extracellular Polysaccharide Biosynthetic Systems*

LIU Jia-Wen^{1)**}, WU Qian^{1)**}, ZHANG Zhao-Huan^{1,2)***}, TONG Jin-Rong¹⁾, HUANG Zhen-Hua¹⁾,
LIU Jing¹⁾, PAN Ying-Jie^{1,3,4)}, ZHAO Yong^{1,3,4)***}

¹⁾College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

²⁾College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

³⁾Laboratory of Quality & Safety Risk Assessment for Aquatic Product on Storage and Preservation (Shanghai),
Ministry of Agriculture, Shanghai 201306, China;

⁴⁾Shanghai Engineering Research Centre of Aquatic-Product Processing & Preservation, Shanghai 201306, China)

Abstract Extracellular polysaccharides serve as the major structural components of *Pseudomonas* biofilm matrix, which can enhance the tolerance of bacteria for environment, antimicrobials and host defense. *Pseudomonas* mainly produce three key extracellular polysaccharides implicated in biofilm formation: alginate, Psl and Pel, and their synthesis and transport depend on the corresponding alginate, Psl and Pel biosynthetic systems. Therefore, this review comprehensively summarizes the progress on structural biology of *Pseudomonas* biofilm formation-related three exopolysaccharide biosynthetic systems, and describes the known structures and functions of proteins in these three systems. On this basis, new insights are put forward for future research directions, which can lay a solid theoretical foundation for formation mechanism and control strategies of *Pseudomonas* biofilm.

Key words *Pseudomonas*, biofilm, key extracellular polysaccharide, alginate biosynthetic system, Psl biosynthetic system, Pel biosynthetic system

DOI: 10.16476/j.pibb.2021.0050

* This work was supported by grants from the National Postdoctoral Program for Innovative Talents of China (BX20190194), The National Natural Science Foundation of China (32001800), Shanghai Post-doctoral Excellence Program (2019348) and China Postdoctoral Science Foundation (2019M661469).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

ZHANG Zhao-Huan. Tel/Fax: 86-21-61900503, E-mail: gongziwuhen@126.com, zh-zhang@shou.edu.cn

ZHAO Yong. Tel/Fax: 86-21-61900768, E-mail: yzhao@shou.edu.cn

Received: March 1, 2021 Accepted: June 3, 2021