



第二信使分子 c-di-AMP 调控细菌中钾离子转运的机制

蔡霞, 何进*

华中农业大学生命科学技术学院, 农业微生物学国家重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要: 钾离子(K^+)是维持生命体存活的必需元素。原核生物进化出一系列 K^+ 转运系统, 如 Kdp 系统、Ktr 系统和 Trk 系统等, 来维持胞内相对恒定的 K^+ 浓度。环二腺苷酸单磷酸(cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是新发现的第二信使分子, 可以与 K^+ 转运系统中的 KdpD、KtrA 和 TrkA 结合。当胞内 c-di-AMP 浓度高时, c-di-AMP 会与 K^+ 转运蛋白结合, 降低其转运活性。c-di-AMP 的靶标除蛋白质外, 还有 RNA 元件, 即 c-di-AMP 的核糖开关。高浓度的 c-di-AMP 与其核糖开关结合后, 可抑制下游 K^+ 转运蛋白编码基因, 如 *kdp*、*ktr* 和 *trk* 操纵子以及 *kup* 基因的转录, 从而调控 K^+ 的转运。总之, 胞内高浓度的 c-di-AMP 抑制细菌对 K^+ 的吸收。c-di-AMP 调控 K^+ 转运机制的研究, 不仅丰富了 K^+ 转运的调控方式, 而且也扩大了 c-di-AMP 的调控范围, 为细菌的利用与防治提供了新思路。

关键词: c-di-AMP, K^+ 转运系统, K^+ 转运, 受体/靶标, 核糖开关

环二腺苷酸单磷酸(cyclic diadenosine monophosphate, c-di-AMP)是新发现的第二信使分子, 参与细菌多种生理功能的调节。c-di-AMP 可以调节细菌对 K^+ 的转运, 但目前该调控机制还没有被系统描述。本文主要综述了细菌内 c-di-AMP 调控 K^+ 转运的机制。

钾是生物体所必需的微量元素, 主要以钾离子(K^+)的形式存在于生物体中^[1]。对于人体来说, 长期缺钾, 会有心律不整、神经传导不正常、呕吐等症状^[2]。植物中钾与光合作用和呼吸作用有关, 缺少钾会引起叶片收缩、发黄或出现棕褐色斑点等

现象。在细菌中, K^+ 主要维持胞内恒定的 pH、渗透压和正常的膜电位^[3], K^+ 的存在还会影响胞质内酶蛋白的活力^[4]。除此以外, K^+ 还作为重要的信号分子, 调节基因表达^[5], 参与细菌其他代谢途径的调控^[6-7]。对于细菌来说, 胞内 K^+ 浓度的升高被认为是细菌对外界环境中高浓度 NaCl 的响应^[1]。

与高等动物不同, 原核生物中并不存在 Na^+/K^+ ATP 泵, 而细菌胞内的 K^+ 浓度通常会高于外界环境, 为了控制 K^+ 的输入与输出, 细菌拥有一系列的 K^+ 转运系统(K^+ transport systems)、离子通道(ion channels)等来维持胞内的 K^+ 浓度。

基金项目: 国家自然科学基金(31270105); 中央高校基本科研专科基金(2662015PY175)

*通信作者。Tel/Fax: +86-27-87280670; E-mail: hejin@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2016-11-16; 修回日期: 2017-01-06; 网络出版日期: 2017-01-19

1 细菌中的离子通道

各物种拥有的 K^+ 转运系统, 可能是由原始的离子通道演化而来^[8-9]。依目前的研究来看, K^+ 转运系统因能更特异、更高效地转运 K^+ , 可能会逐渐替代 K^+ 通道。将大肠杆菌(*Escherichia coli*)中编码 K^+ 通道的基因 *kch* 敲除后, 不同的培养条件和压力都不会使突变株的生长受到影响; 敲除枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)的 K^+ 通道基因也不会使其产生表型变化^[9]; 而且基因组信息显示大多数细菌中并不存在编码 K^+ 通道的基因。可能是原核生物在进化过程中, K^+ 通道逐渐被淘汰了。

2 细菌中的 K^+ 转运系统

K^+ 转运系统在细菌转运 K^+ 的过程中起主要作用。目前, 已经报道的 K^+ 转运系统有 Kdp 系统、Trk 系统、Kup 系统^[10]和 Ktr 系统。经过深入研究, 对各 K^+ 转运系统的组成及功能已较清楚。

2.1 Kdp 系统

Kdp 系统是一种可诱导、高亲和性的 K^+ 转运系统^[11]。Kdp 系统由双组分系统(two components system) KdpD/KdpE 和 KdpFABC 复合物组成, KdpD 是锚定在膜上的组氨酸激酶(histidine kinase), 可以响应外界信号, 如 Na^+ 、 NH_4^+ 等^[12]。当受到外界刺激时, KdpD 会被磷酸化, 已磷酸化的 KdpD 将磷酸基团传递给响应调节子(response regulator) KdpE, 增加 KdpE 对 *kdp* 操纵子启动子区的亲和性。KdpE 结合在 *kdp* 操纵子的启动子区, 起始 *kdp* 操纵子的转录, 最后形成 KdpFABC 复合物转运 K^+ 。KdpA 主要负责 K^+ 的转运。 K^+ 转运过程中所需的能量由 P 型的 ATP 酶——KdpB 提供, KdpB 可以结合并水解 ATP 释放能量。KdpC 通过氨基端的跨膜螺旋锚定在膜上, 增加 KdpB 对 ATP 的亲和力^[1,3,13-14]。KdpF 是有单一跨膜结构域的疏水蛋白, 主要维持 KdpFABC 复合物的稳定性^[15] (图 1)。

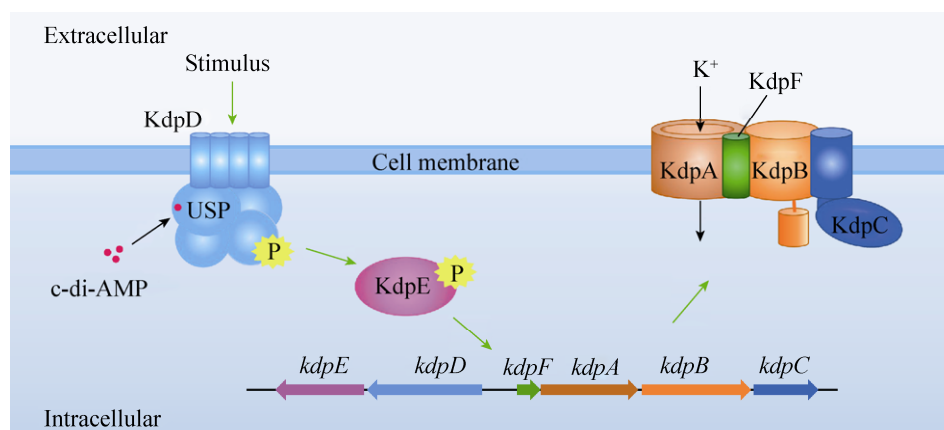


图 1. 金黄色葡萄球菌中 Kdp 系统的工作原理

Figure 1. The working mechanism of Kdp system in *Staphylococcus aureus*. The Kdp system is an inducible potassium uptake system^[11], and its expression is controlled by the KdpD/KdpE two-component system. The histidine kinase KdpD is a c-di-AMP receptor, which functions together with its response regulator KdpE to activate the expression of the transporter complex KdpFABC. KdpA is a membrane component, that forms the core component of potassium channel. KdpB provides the energy required for the potassium transport by binding and hydrolyzing ATP. KdpC increases the affinity of KtrB for ATP. KdpF contains a single transmembrane domain and to enhance stability of the Kdp complex^[15].

Kdp 系统广泛分布于各类细菌中,但是不同菌株中的 Kdp 系统,其操纵子的组成和排列方向有差异。在酸热脂环酸杆菌(*Alicyclobacillus acidocaldarius*)中, KdpD 被分为两部分,但是并没有失去组氨酸激酶的功能^[11]。

2.2 Ktr 系统

Ktr 系统是一种依赖 Na⁺的 K⁺转运系统。在菌株 *Synechocystis* sp. strain PCC 6803 中, Ktr 系统是主要的 K⁺转运系统。由 KtrA、KtrB 和 KtrE 组成。KtrB 形成转运 K⁺的核心组件, KtrA 和 KtrE 协助 KtrB 特异性地运输 K⁺^[16]。在金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)中, Ktr 系统由二聚体膜组分 KtrB 与 KtrD 以及胞质闸组分(gating component) KtrC 或 KtrA 组成。Ktr 系统的转运活性由结合在 KtrA/KtrC 上的核苷酸分子调控,当 ATP 结合在 KtrA/KtrC 上, Ktr 系统转运 K⁺的能力增强^[1]。

2.3 Trk 系统

Trk 系统是大肠杆菌转运 K⁺的主要系统之一,相对于大肠杆菌有多种 K⁺转运系统,海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)基因组中注释的只有 1 种 Trk 系统^[17]。Trk 系统是一个质子转运体,由 1 种跨膜蛋白和 1 个结合核苷酸的外周膜蛋白组成,在转运过程中需要质子动力和 ATP。在结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中, Trk 系统由 2 个高度同源的 TrkA 蛋白 CeoB 和 CeoC 组成, CeoB 和 CeoC 由操纵子 *ceoBC* 编码。TrkA 是一个亲和性较低的 K⁺转运蛋白,在中性 pH、需氧条件下转运 K⁺^[18-19]。

2.4 其他 K⁺转运系统

Kup 系统与其他 K⁺转运系统没有同源性,且 Kup 系统转运 K⁺的能力很弱,在大肠杆菌中, Kup

系统转运 K⁺的能力只有 Trk 系统的 1/10^[10]。

还有一些跨膜的离子转运蛋白,例如 CpaA (cation proton antiporter A)^[20],也能运输 K⁺。但对 K⁺亲和性不高,对 K⁺的转运没有特异性。

3 c-di-AMP 调控 K⁺的转运

2008 年,在解析 DisA (DNA integrity scanning protein A)的晶体结构时意外发现了第二信使分子——c-di-AMP^[21]。含有 DAC 结构域(diadenylyl cyclase domain)的二腺苷酸环化酶(diadenylyl cyclase)可以利用 2 分子 ATP 合成 1 分子 c-di-AMP^[21-22]。含有 DHH 结构域(Asp-His-His domain)、DHH/DHHA1 结构域(因与 DHH 结构域毗连,所以被命名为 DHHA1 结构域)和 HD 结构域(His-Asp domain)的磷酸二酯酶(phosphodiesterase)则可以将 c-di-AMP 降解为 5'-pApA 或 AMP^[23-24]。生物信息学分析表明 DAC 结构域、DHH/DHHA1 结构域和 HD 结构域在原核生物中广泛分布,说明 c-di-AMP 在原核细胞中普遍存在。

c-di-AMP 参与细菌多种生理功能的调节,例如调控脂肪酸代谢^[25]、细菌在低盐环境的耐受性^[20]、损伤 DNA 的修复^[26]、细菌细胞壁的代谢平衡^[27]、细菌的毒力^[28-29]、芽胞的形成^[30]以及生物被膜的产生^[31]。作为第二信使分子, c-di-AMP 通过与相应的受体特异性结合发挥调控作用。目前,已报道 c-di-AMP 的受体主要有蛋白质类以及属于 RNA 调控元件的核糖开关(riboswitch)两大类^[32-35]。c-di-AMP 通过直接与蛋白类受体结合以及与 K⁺转运蛋白编码基因 5'-非翻译区(5'-untranslated region, 5'-UTR)的核糖开关结合来调控 K⁺的转运。

3.1 c-di-AMP 结合蛋白类受体调控 K⁺转运

虽然 c-di-AMP 被发现的较晚,但其调节功能已

引起人们极大的兴趣。目前鉴定到的 c-di-AMP 蛋白受体越来越多, 包括耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)中 TetR(tetracycline resistance)家族转录因子 DarR^[25,33]、丙酮酸羧化酶(pyruvate carboxylase, PC)和信号转导蛋白 PstA^[34,36-37], 以及李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)宿主的跨膜蛋白 STING^[38]。重要的是, c-di-AMP 还与参与调控 K⁺转运的 KdpD 以及 K⁺转运蛋白 KtrA、CapA 和 TrkA 等特异性结合, 从而调控 K⁺转运^[20,39]。

c-di-AMP 可以与双组分系统 KdpD/KdpE 中的 KdpD 结合。在金黄色葡萄球菌中, c-di-AMP 与 KdpD 的 USP 结构域(universal stress protein domain)特异性结合^[20,39](图 1)。通过序列比对, 发现 KdpD 广泛存在于细菌中, 与金黄色葡萄球菌序列同源的 KdpD 分别存在于绿弯菌门(Chloroflexi)、变形菌门(Proteobacteria)、厚壁菌门(Firmicutes)、放线菌门(Actinobacteria)、浮霉菌门(Planctomycetes)、衣原体门(Chlamydiae)、螺旋体门(Spirochaetes)、酸杆菌门(Acidobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes); 然而当用金黄色葡萄球菌 KdpD 的 USP 结构域作为查询序列时, KdpD 的同

源蛋白只存在于厚壁菌门与变形菌门中^[39]。生物信息学分析结果表明, 在厚壁菌门、放线菌门和部分变形菌门细菌中, 存在合成 c-di-AMP 的 DAC 结构域。因此, 可以推测, c-di-AMP 与 KdpD 结合后调控 *kdp* 操纵子的表达, 从而调控 K⁺的转运, 这种调控方式至少在厚壁菌门和少数变形菌门细菌中占据重要地位。例如, 在金黄色葡萄球菌中高浓度的 c-di-AMP 抑制 *kdp* 操纵子的转录, 而使细菌在低钾条件下的生存能力下降^[39]。

c-di-AMP 可以与 KtrA 的 RCK_C 结构域结合。KtrA 是 Ktr 系统的胞质闸组分, 由氨基端的 RCK_N 结构域和羧基端的 RCK_C 结构域组成(图 2-A)^[20,40]。RCK_N 结构域可以与 ATP 或 NADH 结合, 为 K⁺的转运提供能量, 并与膜组分 KtrB 或 KtrD 互相作用, 共同完成 K⁺的转运^[1,20]。RCK_C 结构域裸露在胞质中, 可与 c-di-AMP 结合, 调节 K⁺的转运(图 2-A)。实验表明, 金黄色葡萄球菌 *ktrA* 缺失突变株与 c-di-AMP 降解酶 *gdpP* 缺失突变株的生存能力均下降^[20], 表明高浓度的 c-di-AMP 不利于 K⁺的转运。枯草芽胞杆菌、李斯特菌中 c-di-AMP 同样可以结合 KtrA, 参与 K⁺转运的调

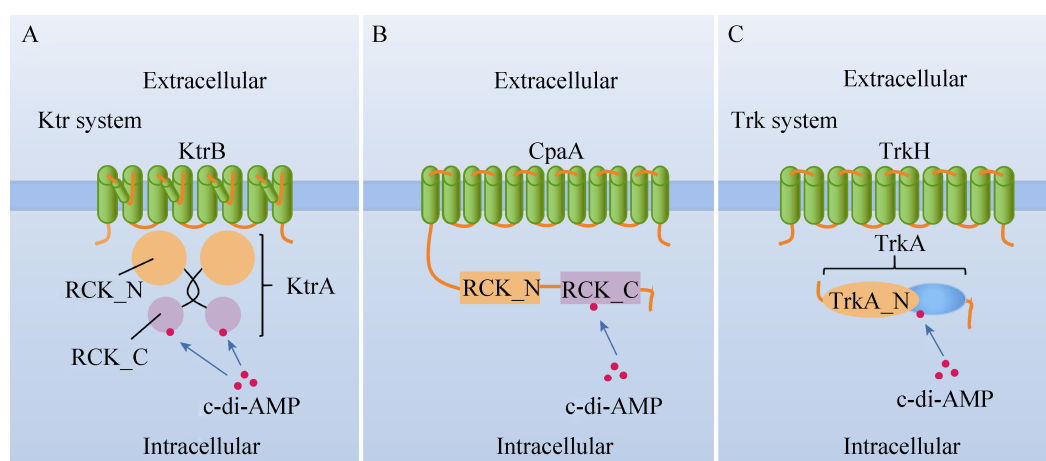


图 2. c-di-AMP 与 K⁺转运系统中的蛋白结合

Figure 2. c-di-AMP binds with several K⁺ uptake transporters. A: c-di-AMP can bind with the RCK_C domain of KtrA; B: c-di-AMP can also bind with the RCK_C domain of CpaA; C: Similarly, c-di-AMP also binds with TrkA.

控^[18,32]。在枯草芽胞杆菌中, 5 个含有 RCK_C 结构域的蛋白都与 K^+ 等一价离子的转运有关^[32]。

c-di-AMP 可与 CpaA 结合。CpaA 是一个离子转运蛋白, 可以将胞内的 K^+ 与 Na^+ 输送到胞外, 同时向胞内输送 H^+ 。c-di-AMP 也与 CpaA 的 RCK_C 结构域结合(图 2-B)^[41], 增加 CpaA 的转运活性, 加速胞内 K^+ 的流失。

肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)中 Trk 系统由 TrkA 与 TrkH 组成。最新研究发现, 当 TrkA 与 TrkH 结合后, 促进 K^+ 的摄取。而胞质中的 c-di-AMP 又可与 TrkA 结合(图 2-C), 结合 c-di-AMP 的 TrkA 对 TrkH 的亲和力下降, 两者的结合受到阻遏, 从而影响细菌对 K^+ 的摄取^[42]。高浓度的 c-di-AMP 抑制 Trk 系统对 K^+ 的转运。

c-di-AMP 的蛋白类受体有很多与 K^+ 的转运相关, c-di-AMP 与受体结合后, 会改变受体原有的功能或活性。一般而言, 高水平的 c-di-AMP 会抑制细菌对 K^+ 的吸收、降低胞内的 K^+ 浓度。

3.2 c-di-AMP 通过结合核糖开关调控 K^+ 的转运

c-di-AMP 可与核糖开关特异性结合, 调节下游基因的转录和翻译^[35]。核糖开关是位于 mRNA

5'-UTR 的一种 RNA 元件, 由适配体区(aptamer domain)和表达平台区(expression platform)组成。适配体区与特异的配体结合后, 引起核糖开关构象的改变, 在转录时形成终止子(terminator)或抗终止子(anti-terminator)结构或在翻译时形成隔离子(sequestor)或抗隔离子(anti-sequestor)结构, 调控下游基因的转录或翻译^[43-44]。

特异性响应 c-di-AMP 的核糖开关在 Rfam 中被注释为 *ydaO*, 1 分子 *ydaO* 可以结合 2 分子 c-di-AMP^[45]。2004 年, Breaker 团队报道了 *ydaO*, 但是因没有找到合适的配体, 认为其是“孤儿核糖开关”^[46]。直到 2013 年, Breaker 团队才确认 *ydaO* 的配体是 c-di-AMP^[47]。

ydaO 广泛地分布在原核生物中, 包括绿弯菌门、蓝细菌门(Cyanobacteria)、变形菌门、厚壁菌门、放线菌门、酸杆菌门、梭杆菌门(Fusobacteria)和疣微菌门(Verrucomicrobia), 且下游基因功能具有多样性。这表明细菌可以通过 *ydaO* 调控多种生理功能, 主要包括: 细胞壁的代谢、 Na^+/K^+ 的转运、芽胞的萌发及氨基酸或其他代谢物的转运等。基因组信息显示, 在变形菌门、厚壁菌门和疣微菌门中, *ydaO* 都参与调控 K^+ 的转运(图 3)^[47-48]。

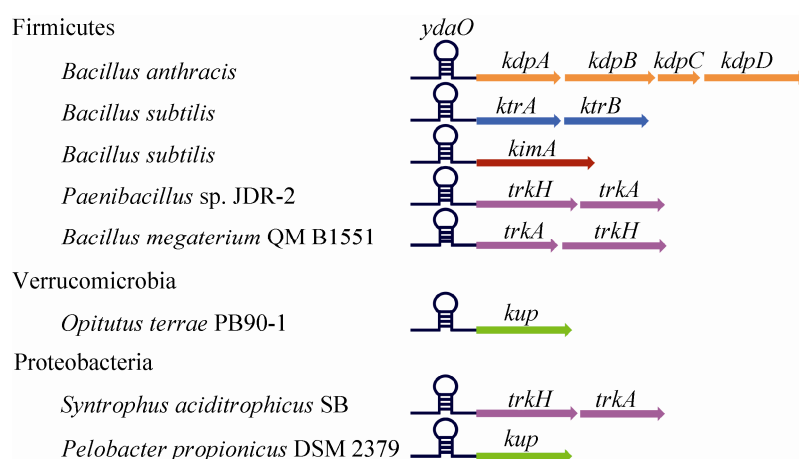


图 3. *ydaO* 调控细菌中 K^+ 的转运基因^[47]

Figure 3. *ydaO* riboswitch control K^+ transport genes in a wide variety of bacteria^[47]. In the graph, we show several typical examples to illustrate the distribution of *ydaO* in Firmicutes, Proteobacteria and Verrucomicrobia.

在厚壁菌门的不同细菌中, *ydaO* 分别调控 *kdp*、*kat* 和 *trk* 操纵子等 K^+ 转运基因的表达; 变形菌门中, *ydaO* 分别位于 *trk* 和 *kup* 操纵子的 5'-UTR; 疣微菌门中, *ydaO* 调控 *kup* 基因的表达(图 3)^[47]。c-di-AMP 可以通过核糖开关控制 K^+ 转运蛋白基因的表达, 调控 K^+ 转运。

实验研究过程中, 我们发现蜡样芽胞杆菌群 (*Bacillus cereus* group) 中 *kdp* mRNA 的 5'-UTR 普遍存在一个 *ydaO*。将苏云金芽胞杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中的 c-di-AMP 合成酶敲除后的突变株

$\Delta disA$ 、 $\Delta cdaA$ 、 $\Delta cdaS$ 、 $\Delta disA\Delta cdaS$ 及 $\Delta cdaA\Delta cdaS$ 中, 检测到胞内 c-di-AMP 浓度降低^[30]。用 RT-qPCR 实验检测 *kdp* 操纵子转录量的变化, 发现在 c-di-AMP 合成酶缺失株中, *kdp* 操纵子的转录量增加。说明该 *ydaO* 为转录抑制型核糖开关, 当胞内 c-di-AMP 的浓度低时, *ydaO* 打开, 下游基因顺利转录, 形成有活性的 K^+ 转运蛋白转运 K^+ (图 4-A)。胞内 c-di-AMP 浓度高时, *ydaO* 关闭, 转录终止, 抑制下游基因的转录(图 4-B)。*ydaO* 下游基因的转录受 c-di-AMP 浓度的严格调控。

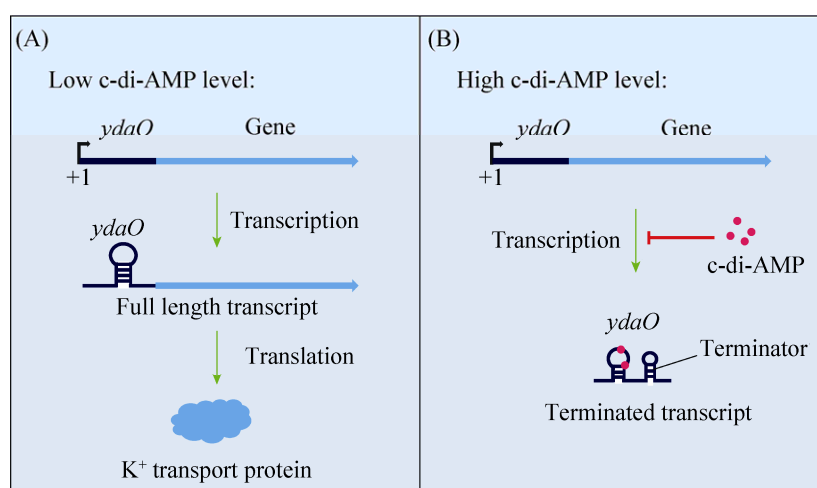


图 4. c-di-AMP 调控细菌中 K^+ 转运的机制

Figure 4. c-di-AMP regulates potassium ion transport in bacteria. A: when the intracellular c-di-AMP concentration is low, *ydaO* is in an open state, causing the nominal transcription of downstream gene to produce active K^+ transporter; B: when the intracellular c-di-AMP level is high, *ydaO* binds with c-di-AMP to form a terminator, leading to transcriptional termination.

综上所述, 无论是通过蛋白受体还是核糖开关调控 K^+ 的转运, 高浓度 c-di-AMP 都扮演抑制细菌对 K^+ 的吸收、降低胞内 K^+ 浓度的角色。

4 问题和展望

K^+ 转运的调控对细菌的生存极为重要, 合适的 K^+ 浓度有助于细菌适应环境中盐浓度的改变,

控制胞内酶的活性, 调节胞内酸碱平衡以及保持适当的细胞膜电位。也许 K^+ 的转运还受其他胞外或胞内信号的调控, 但是胞内 c-di-AMP 对 K^+ 转运的调节是一种非常重要的调控方式, 为揭示细菌内部复杂的调控网络打开了新的一页。但是, 细菌胞内含有 c-di-AMP 时, 是否其 K^+ 转运就一定受 c-di-AMP 调控呢? 在同一细菌中, c-di-AMP

通过蛋白与核糖开关调控 K^+ 转运这两种调控方式是否同时存在? c-di-AMP 是否与核糖开关结合后控制蛋白的翻译起始过程? K^+ 浓度的变化是否影响 c-di-AMP 的合成? 以及 c-di-AMP 是否有新的蛋白受体或其他新功能, 都需要进一步研究。

c-di-AMP 对细菌的调控功能具有一定的应用潜力, 可以作为药物筛选的靶标, 用于防止病菌感染; 在生产应用方面, c-di-AMP 调控 K^+ 转运的方式为优化菌株的培养和工作条件提供了理论基础。

参考文献

- [1] Gründling A. Potassium uptake systems in *Staphylococcus aureus*: new stories about ancient systems. *mBio*, 2013, 4(5): e00784-13.
- [2] Zacchia M, Abategiovanni ML, Stratigis S, Capasso G. Potassium: from physiology to clinical implications. *Kidney Diseases*, 2016, 2(2): 72–79.
- [3] Ballal A, Basu B, Apte SK. The Kdp-ATPase system and its regulation. *Journal of Biosciences*, 2007, 32(3): 559–568.
- [4] Nanatani K, Shijuku T, Takano Y, Zulkifli L, Yamazaki T, Tominaga A, Souma S, Onai K, Morishita M, Ishiura M, Hagemann M, Suzuki I, Maruyama H, Arai F, Uozumi N. Comparative analysis of *kdp* and *ktr* mutants reveals distinct roles of the potassium transporters in the model cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(4): 676–687.
- [5] Epstein W. The roles and regulation of potassium in bacteria. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 2003, 75: 293–320.
- [6] Ali MK, Li X, Tang Q, Liu X, Chen F, Xiao J, Ali M, Chou SH, He J. Regulation of inducible potassium transporter KdpFABC by the KdpD/KdpE two-component system in *Mycobacterium smegmatis*. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 570.
- [7] Diskowski M, Mikusevic V, Stock C, Hänel I. Functional diversity of the superfamily of K^+ transporters to meet various requirements. *Biological Chemistry*, 2015, 396(9/10): 1003–1014.
- [8] Booth IR, Miller S, Müller A, Lehtovirta-Morley L. The evolution of bacterial mechanosensitive channels. *Cell Calcium*, 2015, 57(3): 140–150.
- [9] Loukin SH, Kuo MMC, Zhou XL, Haynes WJ, Kung C, Saimi Y. Microbial K^+ channels. *The Journal of General Physiology*, 2005, 125(6): 521–527.
- [10] Sato Y, Nanatani K, Hamamoto S, Shimizu M, Takahashi M, Tabuchi-Kobayashi M, Mizutani A, Schroeder JI, Souma S, Uozumi N. Defining membrane spanning domains and crucial membrane-localized acidic amino acid residues for K^+ transport of a Kup/HAK/KT-type *Escherichia coli* potassium transporter. *Journal of Biochemistry*, 2014, 155(5): 315–323.
- [11] Huang CS, Pedersen BP, Stokes DL. Crystal structure of the potassium-importing KdpFABC membrane complex. *Nature*, 2017, 546(7660): 681–685.
- [12] Epstein W. The KdpD sensor kinase of *Escherichia coli* responds to several distinct signals to turn on expression of the Kdp transport system. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(2): 212–220.
- [13] Greie JC. The KdpFABC complex from *Escherichia coli*: a chimeric K^+ transporter merging ion pumps with ion channels. *European Journal of Cell Biology*, 2011, 90(9): 705–710.
- [14] Surmann K, Laermann V, Zimmann P, Altendorf K, Hammer E. Absolute quantification of the Kdp subunits of *Escherichia coli* by multiple reaction monitoring. *Proteomics*, 2014, 14(13/14): 1630–1638.
- [15] Gannoun-Zaki L, Belon C, Dupont C, Hilbert F, Kremer L, Blanc-Potard AB. Overexpression of the *Salmonella* KdpF membrane peptide modulates expression of *kdp* genes and intramacrophage growth. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 359(1): 34–41.
- [16] Zulkifli L, Akai M, Yoshikawa A, Shimojima M, Ohta H, Guy HR, Uozumi N. The KtrA and KtrE subunits are required for Na^+ -dependent K^+ uptake by KtrB across the plasma membrane in *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192(19): 5063–5070.
- [17] Johnson HA, Hampton E, Lesley SA. The *Thermotoga maritima* Trk potassium transporter—from frameshift to function. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191(7): 2276–2284.
- [18] Cholo MC, Boshoff HI, Steel HC, Cockeran R, Matlola NM, Downing KJ, Mizrahi V, Anderson R. Effects of clofazimine on potassium uptake by a Trk-deletion mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006, 57(1): 79–84.
- [19] Cholo MC, van Rensburg EJ, Osman AG, Anderson R. Expression of the genes encoding the Trk and Kdp potassium transport systems of *Mycobacterium tuberculosis* during growth *in vitro*. *Biomed Research International*, 2015, 2015: 608682.
- [20] Corrigan RM, Campeotto I, Jeganathan T, Roelofs KG, Lee VT, Gründling A. Systematic identification of conserved bacterial c-di-AMP receptor proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(22): 9084–9089.

- [21] Witte G, Hartung S, Büttner K, Hopfner KP. Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Molecular Cell*, 2008, 30(2): 167–178.
- [22] Zheng C, Wang JP, Luo YC, Fu Y, Su JM, He J. Highly efficient enzymatic preparation of c-di-AMP using the diadenylate cyclase DisA from *Bacillus thuringiensis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2013, 52(6/7): 319–324.
- [23] Tang Q, Luo YC, Zheng C, Yin K, Ali MK, Li XF, He J. Functional analysis of a c-di-AMP-specific phosphodiesterase MsPDE from *Mycobacterium smegmatis*. *International Journal of Biological Science*, 2015, 11(7): 813–824.
- [24] Bai YL, Yang J, Eisele LE, Underwood AJ, Koestler BJ, Waters CM, Metzger DW, Bai GC. Two DHH subfamily 1 proteins in *Streptococcus pneumoniae* possess cyclic di-AMP phosphodiesterase activity and affect bacterial growth and virulence. *Journal of Bacteriology*, 2013, 195(22): 5123–5132.
- [25] Zhang L, Li WH, He ZG. DarR, a TetR-like transcriptional factor, is a cyclic di-AMP-responsive repressor in *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(5): 3085–3096.
- [26] Oppenheimer-Shaanan Y, Wexselblatt E, Katzhendler J, Yavin E, Ben-Yehuda S. c-di-AMP reports DNA integrity during sporulation in *Bacillus subtilis*. *EMBO Reports*, 2011, 12(6): 594–601.
- [27] Corrigan RM, Abbott JC, Burhenne H, Kaeffer V, Gründling A. c-di-AMP is a new second messenger in *Staphylococcus aureus* with a role in controlling cell size and envelope stress. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002217.
- [28] Cho KH, Kang SO. *Streptococcus pyogenes* c-di-AMP phosphodiesterase, GdpP, influences SpeB processing and virulence. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69425.
- [29] Huynh TN, Luo SK, Pensinger D, Sauer JD, Tong L, Woodward JJ. An HD-domain phosphodiesterase mediates cooperative hydrolysis of c-di-AMP to affect bacterial growth and virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(7): E747–756.
- [30] Zheng C, Ma Y, Wang X, Xie YQ, Ali MK, He J. Functional analysis of the sporulation-specific diadenylate cyclase CdaS in *Bacillus thuringiensis*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6: 908.
- [31] Gundlach J, Rath H, Herzberg C, Mäder U, Stülke J. Second messenger signaling in *Bacillus subtilis*: accumulation of cyclic di-AMP inhibits biofilm formation. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 804.
- [32] Corrigan RM, Gründling A. Cyclic di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nature Reviews Microbiology*, 2013, 11(8): 513–524.
- [33] Commichau FM, Dickmanns A, Gundlach J, Ficner R, Stülke J. A jack of all trades: the multiple roles of the unique essential second messenger cyclic di-AMP. *Molecular Microbiology*, 2015, 97(2): 189–204.
- [34] Sureka K, Choi PH, Precit M, Delince M, Pensinger DA, Huynh TN, Jurado AR, Goo YA, Sadilek M, Iavarone AT, Sauer JD, Tong L, Woodward JJ. The cyclic dinucleotide c-di-AMP is an allosteric regulator of metabolic enzyme function. *Cell*, 2014, 158(6): 1389–1401.
- [35] Ramesh A. Second messenger-sensing riboswitches in bacteria. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2015, 47-48: 3–8.
- [36] Campeotto I, Zhang Y, Mladenov MG, Freemont PS, Gründling A. Complex structure and biochemical characterization of the *Staphylococcus aureus* cyclic diadenylate monophosphate (c-di-AMP)-binding protein PstA, the founding member of a new signal transduction protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(5): 2888–2901.
- [37] Müller M, Hopfner KP, Witte G. c-di-AMP recognition by *Staphylococcus aureus* PstA. *FEBS Letters*, 2015, 589(1): 45–51.
- [38] Woodward JJ, Iavarone AT, Portnoy DA. c-di-AMP secreted by intracellular *Listeria monocytogenes* activates a host type I interferon response. *Science*, 2010, 328(5986): 1703–1705.
- [39] Moscoso JA, Schramke H, Zhang Y, Tosi T, Dehbi A, Jung K, Gründling A. Binding of cyclic di-AMP to the *Staphylococcus aureus* sensor kinase KdpD occurs via the universal stress protein domain and downregulates the expression of the Kdp potassium transporter. *Journal of Bacteriology*, 2016, 198(1): 98–110.
- [40] Kim H, Youn SJ, Kim SO, Ko J, Lee JO, Choi BS. Structural studies of potassium transport protein KtrA regulator of conductance of K⁺ (RCK) C domain in complex with cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP). *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(26): 16393–16402.
- [41] Chin KH, Liang JM, Yang JG, Shih MS, Tu ZL, Wang YC, Sun XH, Hu NJ, Liang ZX, Dow JM, Ryan PR, Chou SH. Structural insights into the distinct binding mode of cyclic di-AMP with SaCpaA_RCK. *Biochemistry*, 2015, 54(31): 4936–4951.
- [42] Du B, Sun JH. Cyclic diadenosine monophosphate—a new second messenger in bacteria—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2015, 55(2): 126–133. (in Chinese)
杜斌, 孙建和. 环二腺苷酸(c-di-AMP)—细菌的一种新型第二信使. *微生物学报*, 2015, 55(2): 126–133.
- [43] Serganov A, Nudler E. A decade of riboswitches. *Cell*, 2013, 152(1/2): 17–24.
- [44] Breaker RR. Riboswitches and the RNA world. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2012, 4(2): a003566.
- [45] Jones CP, Ferré-D'Amaré AR. Crystal structure of a

- c-di-AMP riboswitch reveals an internally pseudo-dimeric RNA. *The EMBO Journal*, 2014, 33(22): 2692–2703.
- [46] Barrick JE, Corbino KA, Winkler WC, Nahvi A, Mandal M, Collins J, Lee M, Roth A, Sudarsan N, Jona I, Wickiser JK, Breaker RR. New RNA motifs suggest an expanded scope for riboswitches in bacterial genetic control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(17): 6421–6426.
- [47] Nelson JW, Sudarsan N, Furukawa K, Weinberg Z, Wang JX, Breaker RR. Riboswitches in eubacteria sense the second messenger c-di-AMP. *Nature Chemical Biology*, 2013, 9(12): 834–839.
- [48] Kellenberger CA, Chen C, Whiteley AT, Portnoy DA, Hammond MC. RNA-based fluorescent biosensors for live cell imaging of second messenger cyclic di-AMP. *Journal of the American Chemical Society*, 2015, 137(20): 6432–6435.

Second messenger c-di-AMP regulates potassium ion transport in bacteria

Xia Cai, Jin He^{*}

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: Potassium ion (K^+) is a ubiquitous monovalent cation necessary for all living cells. To maintain homeostatic intracellular K^+ concentration, most prokaryotes possess several unique K^+ uptake systems to transport K^+ . A newly found second messenger—cyclic diadenosine monophosphate (c-di-AMP), plays an important role in regulating K^+ transport by binding to several K^+ transport-related proteins, such as KdpD, KtrA and TrkA. When the intracellular c-di-AMP concentration is high, c-di-AMP can bind its receptor or effector proteins to inhibit transporter activity. In addition, riboswitch could also be targeted by c-di-AMP to control the transcription of downstream K^+ transporter genes, including *ktr*, *trk* and *kdp* operon and *kup* gene. High intracellular c-di-AMP concentration depresses bacterial K^+ uptake. Therefore, understanding the mechanism of K^+ transport inhibition by c-di-AMP not only enriches the regulation mode of the K^+ transport, but also sparkle new ideas for the control and applications of bacteria.

Keywords: c-di-AMP, K^+ transport systems, K^+ uptake, receptor/effector, riboswitch

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31270105) and by the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2662015PY175)

^{*}Corresponding author. Tel/Fax: +86-27-87280670; E-mail: hejin@mail.hzau.edu.cn

Received: 16 November 2016; Revised: 6 January 2017; Published online: 19 January 2017