



单位代码 10635

学 号 012011317000167

西南大學

博士学位论文

结核分枝杆菌分泌性效应分子的
鉴定、功能与信号传递研究

论文作者：李 武

指导教师：谢建平 研究员

Yossef Av-Gay 教授

学科专业：微生物学

研究方向：药用微生物功能基因组学与新药筛选模型

提交论文日期：2015年04月10日

论文答辩日期：2015年06月02日

学位授予单位：西南大学

中国·重庆

2015年4月

独创性声明

学位论文题目：结核分枝杆菌分泌性效应分子的
鉴定、功能与信号传递研究

本人提交的学位论文是在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。论文中引用他人已经发表或出版过的研究成果，文中已加了特别标注。对本研究及学位论文撰写曾做出贡献的老师、朋友、同仁在文中作了明确说明并表示衷心感谢。

学位论文作者： 签字日期： 年 月 日

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解西南大学有关保留、使用学位论文的规定，有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权西南大学研究生院（筹）可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

（保密的学位论文在解密后适用本授权书，本论文：不保密，
保密期限至 年 月止）。

学位论文作者签名： 导师签名：

签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月 日

目 录

摘 要	I
Abstract	V
第 1 章 文献综述	1
1 结核病	1
1.1 结核分枝杆菌	1
1.2 结核病流行病学	1
2 分泌蛋白的潘多拉魔盒——分枝杆菌分泌系统	1
2.1 SecA1 分泌系统	2
2.2 SecA2 分泌系统	3
2.3 Tat 分泌系统	5
2.4 ESX 分泌系统	7
2.5 小结	9
3 分泌蛋白介导的结核分枝杆菌操控宿主的主要策略	10
3.1 宿主与结核杆菌之间的“博弈”	10
3.2 宿主的重要杀菌手段——吞噬体与溶酶体的融合	10
3.3 结核杆菌的反击——参与抑制吞噬溶酶体融合的效应分子	11
3.4 对于新药物开发的启示	16
3.5 小结	17
参考文献	17
第 2 章 绪论	31
1 选题依据、研究目的与意义	31
2 科学问题	31
3 研究内容与技术路线	31
4 本文创新点	32
5 本文不足之处	32
第 3 章 生物信息学预测结核分枝杆菌与宿主相互作用的关键胞外蛋白	35
1 引言	35
2 实验材料及方法	36
2.1 疾病模型中表达上调基因	36
2.2 胞内存活必需基因	38
2.3 结核杆菌蛋白质亚细胞定位分析	38
2.4 临床菌株丢失基因	39

2.5 胞外生存必需基因	39
2.6 结核杆菌与宿主及宿主肠道菌群蛋白质组的同源分析	39
3 结果与讨论	40
3.1 一个基于大量文献的复杂数据集的建立	40
3.2 所选基因的功能分类	44
3.3 与其它生物信息学结果比较	49
4 结论	50
参考文献	50
第 4 章 结核分枝杆菌 Rv3402c 蛋白在宿主-病原菌相互作用中的功能研究	63
1 引言	63
2 实验材料	64
2.1 实验质粒、菌株与细胞系	64
2.2 主要试剂	64
2.3 主要溶液与培养基配制	65
2.4 主要仪器	66
3 实验方法	66
3.1 基因克隆	66
3.2 蛋白表达与纯化	67
3.3 重组耻垢分枝杆菌亚细胞结构的分离与鉴定	68
3.4 蛋白酶 K 与胰蛋白酶敏感性分析	68
3.5 重组耻垢分枝杆菌菌落形态及脂肪酸组成的分析	69
3.6 重组耻垢分枝杆菌巨噬细胞内存活分析	70
3.7 重组耻垢分枝杆菌胞外生长及应力分析	70
3.8 巨噬细胞存活实验	71
3.9 利用 semi-RT-PCR 和 ELISA 对细胞因子表达的分析	71
3.10 生物信息学与统计学分析	71
4 结果与分析	72
4.1 Rv3402c 的基本特性	72
4.2 Rv3402c 成功表达于模式菌株耻垢分枝杆菌	73
4.3 Rv3402c 增强重组耻垢分枝杆菌在巨噬细胞内的存活率	73
4.4 Rv3402c 不能增强重组耻垢分枝杆菌的抗压能力	74
4.5 Rv3402c 部分定位于重组耻垢分枝杆菌细胞表面	76
4.6 Rv3402c 对重组耻垢分枝杆菌菌落形态及脂肪酸组成没有影响	77
4.7 表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌促进巨噬细胞死亡	79
4.8 表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌影响巨噬细胞的细胞因子分泌	80

4.9 表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌通过 NF- κ B, ERK 和 p38 途径 促进巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-1 β	81
5 讨论	83
参考文献	85
第 5 章 结核分枝杆菌蛋白酪氨酸激酶 A 的底物鉴定及其生理学作用研究	91
1 引言	91
2 实验材料	92
2.1 主要试剂	92
2.2 实验菌株及培养条件	92
2.3 抗体	92
3 实验方法	93
3.1 基因克隆, 蛋白表达与纯化	93
3.2 结核菌全菌体裂解液及滤液蛋白的制备	94
3.3 基因定点突变实验	94
3.4 体外蛋白激酶实验	96
3.5 放射性双向电泳分析	96
3.6 磷酸化氨基酸分析 (phospho-amino acid analysis)	97
3.7 pull-down 实验分析	97
3.8 硫氧还蛋白还原酶活性分析 (DTNB 法)	98
3.9 Western blot 分析蛋白质的亚细胞定位	98
4 结果与分析	99
4.1 以放射性双向电泳为基础的磷酸化蛋白质组学方法鉴定 PtkA 的底物... 99	
4.2 PtkA 体外蛋白激酶条件的优化	101
4.3 使用蛋白质组学方法无法找到 PtkA 底物的原因	103
4.4 借助生物信息学方法寻找 PtkA 的底物	105
4.5 TrxB2 是 PtkA 的特异性酪氨酸磷酸化底物	108
4.6 磷酸化作用不影响 TrxB2 的酶活性	109
4.7 磷酸化作用抑制 TrxB2 的分泌	110
5 讨论	111
参考文献	113
附 录	117
致 谢	121
在学期间发表的论文	123
在学期间参加的课题	125

结核分枝杆菌分泌性效应分子的 鉴定、功能与信号传递研究

微生物专业博士研究生 李 武

指导教师 谢建平 研究员

Yossef Av-Gay 教授

摘 要

由结核分枝杆菌感染导致的结核病仍然是世界上最致命的传染性疾​​病之一。全球约有三分之一的人口潜伏感染结核病。在 2013 年，全球大约有 900 万人患结核病，其中中国患者约占总比例数的 11%；另外还有 150 万结核病患者死亡，其中 36 万人为结核病和艾滋病毒共感染患者。据统计，在 2013 年，全球约有 48 万人患耐多药结核病，其中约有 9.0% 的耐多药结核病患者罹患广泛耐药结核病。这些触目惊心的数字表明结核分枝杆菌是人类最难对付的致病菌之一。结核分枝杆菌之所以有如此大的破坏力，是因为其在宿主巨噬细胞内成功的生存策略，而这主要归功于该菌释放的效应分子（或毒力因子）。结核分枝杆菌的效应分子包含各类脂质和分泌蛋白。目前鉴定出来的效应分子主要分为三类：(1)能增强结核分枝杆菌抵抗宿主产生的杀菌复合物，如 KatG、SodC 和 AhpC；(2)能阻断吞噬体成熟过程，如 PtpA、PknG 和 SapM；(3)能抑制宿主细胞的凋亡，如 NuoG 和 SodA。但这些效应分子还无法完全解析结核分枝杆菌的致病性；因此，鉴定和研究新的效应分子仍是当前工作的重点和难点。基于以上现状，本论文主要从以下几个方面进行研究。

首先，本文介绍了一种综合性的新型生物信息学方法预测参与宿主-病原菌相互作用的结核分枝杆菌关键性分泌蛋白。我们利用聚类分析方法按以下标准尽可能多地收集已有的文献数据：(a) 攻击巨噬细胞后结核分枝杆菌的基因表达和 DNA 芯片数据；(b) 利用全基因组插入诱变技术鉴定不同条件下基因的必需性数据；(c) 攻击动物模型后结核分枝杆菌基因表达数据；(d) 结核病患者体内结核分枝杆菌基因表达数据；(e) 结核分枝杆菌临床菌株丢失的基因数据；(f) 蛋白质亚细胞定位数据；(g) 结核分枝杆菌与宿主及宿主肠道菌群蛋白质组的非同源性分析数据。然后按照不同标准进行全基因组计分、排序将不同数据集的数据整合起来。接着我

们预测到结核分枝杆菌中 54 个潜在的与宿主相互作用的关键性分泌蛋白。这些蛋白质符合以下特征：在结核分枝杆菌感染过程中上调表达，结核分枝杆菌胞内存活而非胞外存活所必须，在临床菌株中保守存在，定位于细菌胞外，与宿主及宿主肠道菌群蛋白质组没有同源物。最后我们探讨了这些分泌蛋白进一步深入研究的可能性和重要性，为抗结核药物的开发提供了可供选择的平台。

接着，我们选择一个可能的分泌蛋白 Rv3402c 进行了深入细致的分子生物学与细胞生物学方面的研究，本文重点研究了 Rv3402c 与宿主巨噬细胞之间的相互作用。首先我们构建了能够表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌（简称为 MS_Rv3402c）和空载体重组耻垢分枝杆菌（简称为 MS_Vec）。利用蛋白酶敏感性分析实验和 Western blot 首次实验证实了 Rv3402c 蛋白是一个分泌蛋白。接着发现重组菌 MS_Rv3402c 在巨噬细胞中的存活率显著增加，且该重组菌能诱导巨噬细胞的裂解死亡。重组菌 MS_Rv3402c 和对照菌 MS_Vec 在无菌培养基中显示出相同的生长速率，而且各自的抗压能力也不相上下，这暗示 MS_Rv3402c 胞内存活能力的增强可能是 Rv3402c 蛋白干扰宿主细胞先天免疫应答的结果。ELISA 以及半定量 RT-PCR 实验结果显示，MS_Rv3402c 刺激巨噬细胞产生促炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 的能力明显高于 MS_Vec。我们利用纯化的 Rv3402c 蛋白也佐证了这些细胞因子是特异性地由该蛋白介导产生的。通过信号通路抑制剂实验，我们发现 NF- κ B, ERK1/2 和 p38 信号途径对于 Rv3402c 诱导的 TNF- α 分泌是必需的。不过只有 NF- κ B 和 ERK1/2 信号通路是 Rv3402c 诱导的 IL-1 β 分泌所需的，而 p38 途径对其分泌没有影响。这说明 Rv3402c 刺激这两种细胞因子分泌的信号途径可能存在差异。以上结果揭示 Rv3402c 可能通过干扰宿主的信号途径来扰乱宿主的免疫应答，最终导致细菌的胞内存活率提高以及巨噬细胞的加速裂解死亡。

最后，本文研究了结核分枝杆菌中著名的分泌性效应分子 PtpA（蛋白酪氨酸磷酸酶 A）的调控蛋白 PtkA（蛋白酪氨酸激酶 A）的一些重要功能。序列比对结果显示，PtkA 最开始被认为是卤酸脱卤酶超家族的一员。不过通过生物化学方法分析其酶活性后发现该蛋白是一个蛋白酪氨酸激酶，且能磷酸化 PtpA 并调控其磷酸酶活性。我们首先联合体外蛋白激酶实验和放射性双向电泳技术鉴定 PtkA 的底物，意外地发现了 PtkA 的上游调控蛋白，该蛋白能够抑制 PtkA 的激酶活性。虽然目前还不能确定是哪个蛋白发挥抑制作用，但我们推测这极有可能是至今仍未见报道 PtkA 其它底物的主要原因。实验过程中，我们优化了实验室现有的重组 PtkA 蛋白及体外蛋白激酶实验条件，然后利用生物信息学方法预测到 8 个潜在的酪氨酸磷酸化蛋白质。通过一系列生物化学方法体外证明了 TrxB2 是 PtkA 在结核分枝杆菌中除自身及 PtpA 以外的第三个蛋白酪氨酸激酶底物，其磷酸化残基为 32 位的酪氨酸。根据序列比对信息发现，结核分枝杆菌的 TrxB2 和恶臭假单胞菌（*P.*

putida) 中的同源蛋白 TrxB2 的磷酸化酪氨酸残基是相同位置, 且磷酸化酪氨酸残基附近的氨基酸同源性也相当高。该结果从而也验证了细菌之间磷酸化位点的保守性。通过酶活分析以及 western blot 等试验发现 PtkA 对 TrxB2 的磷酸化作用不影响后者的酶活性, 但能抑制 TrxB2 的分泌; 也就是说结核分枝杆菌 H37Rv Δ *ptkA* 突变株分泌了更多的 TrxB2 到细菌细胞外。本实验室未发表的反向遗传学数据显示, 体外培养的结核分枝杆菌 H37Rv Δ *ptkA* 突变株比野生株更加耐受 H₂O₂ 和氢过氧化枯烯。鉴于 TrxB2 是一个硫氧还蛋白还原酶, 文献报道它能中和氧化压力。因此, 我们的实验结果可以解释这一现象: 结核分枝杆菌 H37Rv Δ *ptkA* 突变株分泌了更多的 TrxB2 到细胞外, TrxB2 独自或与 TrxC 共同对 H₂O₂ 和氢过氧化枯烯进行了中和解毒作用, 从而使该突变株更加耐受这些氧化压力。但是这一过程对于结核分枝杆菌自身的代谢或生存的意义还有待进一步研究。

总之, 本文预测了一批潜在的抗结核药物靶点, 确定了 Rv3402c 作为结核分枝杆菌效应蛋白的事实并拓展了人们对结核分枝杆菌分泌蛋白调控网络的认识。

关键词: 结核分枝杆菌 分泌蛋白 巨噬细胞 相互作用 信号传递 蛋白酪氨酸激酶

The identification, function and signaling of *Mycobacterium tuberculosis* secreted effectors

Ph.D Candidate in Microbiology: Wu Li

Supervisor: Prof. Jianping Xie & Prof. Yossef Av-Gay

Abstract

Tuberculosis (TB), caused by the facultative intracellular pathogen *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), remains one of the world's deadliest communicable diseases. About one-third of the global population was infected by latent tuberculosis. In 2013, an estimated 9.0 million people developed TB and China alone accounted for 11% of total cases; and 1.5 million died from the disease, 360 000 of whom were HIV-positive. Globally, an estimated 480 000 people have developed multidrug-resistant TB (MDR-TB) in 2013. On average, an estimated 9.0% of patients with MDR-TB had extensively drug resistant TB (XDR-TB). A string of shocking data abovementioned indicated that Mtb is still one of the most formidable pathogens. The pathogenesis of Mtb is largely depends on its successful intracellular survival, a process which depends on an array of effectors (or virulence factors) to colonize and replicate within the host. The success of Mtb can be attributed to these effectors which contain lipids and secreted proteins. These known effectors can be classified as (a) enhancing the resistance to host toxic compounds, such as KatG, SodC and AhpC, (b) blocking phagosomes maturation, such as PtpA, PknG and SapM, and (c) evading apoptosis through NuoG and SodA. It seems that there are still a large number of effectors to be discovered, although some have been identified. The identification and characterization of novel virulence factors can enrich our understanding of Mtb biology and facilitate better control measures. Therefore, we mainly performed several studies as follows.

The present study introduces a novel pipeline to predict Mtb proteins involved in host-pathogen interaction. In brief, data from multiple scales were integrated: (a) gene expression and DNA microarray experiments in macrophages; (b) genome-wide insertional mutagenesis defining gene essentiality under different conditions; (c) genes expressed in animal models; (d) genes expressed in TB patients; (e) genes lost in

clinical isolates; (f) cellular localization analysis and subcellular localization prediction tools; (g) non-homology analysis and gut flora non-homology analysis. We designed an integrative analysis pipeline including whole-genome scoring, ranking and prioritization algorithm and to screen datasets from multiple scales. Based on the criteria of essentiality and selectivity, 54 promising hits were identified. These proteins satisfying the following criteria: up-regulated during infection, essential for the pathogen's *in vivo* survival but not *in vitro* survival, conserved in clinical isolates, located outside of the pathogen and non-homologous to host proteome and gut flora proteome. It is expected that the 54 selected candidates can benefit the development of novel anti-TB drugs.

Secondly, we choose one potential secreted protein Rv3402c as target for an intensive study of molecular biology and cell biology, this paper focuses on the study of Rv3402c which involved in the interaction of pathogen and host macrophage cells. The Mtb iron regulated open reading frame (ORF) *rv3402c*, encoding a conserved hypothetical protein, was shown to be up-regulated upon infection in both human and mice macrophages. To explore the function of this ORF, we heterologously expressed the *rv3402c* gene in the non-pathogenic fast-growing *Mycobacterium smegmatis* strain, and demonstrated that Rv3402c, a cell envelope-associated protein, was able to enhance the intracellular survival of recombinant *M. smegmatis*. Enhanced growth was not found to be the result of an increased resistance to intracellular stresses, as growth of the Rv3402c expressing strain was unaffected by iron depletion, H₂O₂ exposure, or acidic conditions. Colonization of macrophages by *M. smegmatis* expressing Rv3402c was associated with substantial cell death and significantly greater amount of TNF- α and IL-1 β compared with controls. Rv3402c-induced TNF- α and IL-1 β production was found to be mediated by NF- κ B, ERK and p38 pathway in macrophages. In summary, our study suggests that Rv3402c delivered in a live *M. smegmatis* vehicle can modify the cytokines profile of macrophage, promote host cell death and enhance the persistence of mycobacterium within host cells.

Finally, this paper explored some important functions of protein tyrosine kinase A (PtkA) which is a regulatory protein of the famous Mtb secreted proteins protein tyrosine phosphatase A (PtpA). PtkA was originally annotated as a member of the haloacid dehalogenase (HAD) superfamily based upon sequence homology. However, biochemical analysis of its enzymatic activity demonstrated that PtkA is a genuine protein-tyrosine kinase. The unpublished data showed that Mtb H37Rv Δ *ptkA* deletion mutant is more resistant to oxidative stress (hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide).

Therefore, we assumed that there is some unknown substrates of PtkA in Mtb. We firstly identified the substrates of PtkA by combination of *in vitro* kinase assay and radioactive two-dimensional electrophoresis (or named standard 2D-gel-based phosphoproteomic study). But we unexpectedly found PtkA's upstream regulatory protein that can inhibit the kinase activity of PtkA. It is very likely that the main reason that researchers cannot find other substrates of PtkA except itself and PtpA, although we don't know what the specific inhibitory protein(s) is/are. Besides, we have optimized the experimental conditions of purification and *in vitro* kinases assay of PtkA protein. Then, we made a list of phosphotyrosine-proteins from published bacterial phosphoproteomics studies. And found out the conservation of phosphotyrosine proteins which have homologue in Mtb. We overexpressed and purified those proteins in *E. coli*, and do *in vitro* kinase assay to check which one is the substrate of PtkA. Then we found TrxB2 was a genuine substrate of PtkA by using dose-manner dependent assay, phosphor-amino acid assay and site-direct mutagenesis. Phosphorylation of TrxB2 by PtkA does not affect the enzymatic activity of TrxB2, but it was able to inhibit the secretion of TrxB2. In another word, the Mtb H37Rv $\Delta ptkA$ mutants released more TrxB2 proteins out of the cell compare to Mtb wild type strain. Our unpublished data showed that Mtb H37Rv $\Delta ptkA$ mutants was more resistant to oxidative stress (hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide) compare to Mtb wild type strain. Given TrxB2 is a thioredoxin reductase which can neutralize the oxidative stress. Therefore, our results may explain this phenomenon abovementioned: Mtb H37Rv $\Delta ptkA$ mutants secreted more TrxB2 proteins into the extracellular, TrxB2 alone or combined with TrxC can detoxify hydrogen peroxide and cumene hydroperoxide, so that the $\Delta ptkA$ mutant strains showed more resistant to the oxidative stress.

In summary, this paper predicted an array of potential anti-TB drug targets, confirmed that Rv3402c is one of secreted effectors in Mtb and expanded our awareness of Mtb secreted protein regulatory networks.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*; effector; macrophage; interaction; signal transduction; protein tyrosine kinase

第 1 章 文献综述

1 结核病

1.1 结核分枝杆菌

结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*, 简称结核杆菌) 是一种缓慢生长、高 GC 含量 (65.6%)、专性需氧的杆状胞内致病菌。和其它革兰氏阴性和革兰氏阳性菌相比, 结核杆菌具有更强的酸碱耐受能力, 这和它细胞被膜的化学特性有关。结核杆菌的细胞被膜主要包含分枝酰基-阿拉伯半乳糖-肽聚糖 (mAGP) 复合体 [1,2,3,4,5], 这组成了细胞壁的内部结构。其它脂质如 phthiocerol dimycocerosates (PDIM), 糖肽磷脂 (glycopeptidolipid)、甲基萘醌 (menaquinone) 和糖基化的 phenolphthiocerols 等插入分枝菌酸层中构成细胞壁的外部结构 [6,7,8]。正是这层约占细菌干重 60% 的富含脂质的细胞被膜赋予了结核杆菌抗酸碱的特性, 也使得其细胞壁的渗透性只有典型的低渗透性细菌铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的 1/10~1/100 [9]。结核杆菌细胞壁的超低渗透性保证了其耐受宿主抗菌机制以及抗生素的杀灭作用。因此结核杆菌几乎可以在任何环境中生存, 这样的特性决定了它是细菌家族中最优秀的菌种之一。

1.2 结核病流行病学

由结核杆菌感染导致的结核病 (Tuberculosis) 仍然是世界上最致命的传染性疾病之一。全球范围内约有三分之一的人口感染结核杆菌, 其中有 5-10% 的人口属于活动性感染患者。2013 年, 全球估计有 900 万人罹患结核病, 其中中国患者占 11%。结核病每年都在缓慢减少。经过有效的诊断和治疗, 2000 年至 2013 年, 约有 3700 万患者痊愈。尽管现有的医疗技术条件能预防和治愈大多数结核病, 但是该病的死亡率仍不容乐观。现阶段, 压在全人类——特别是贫困人口头顶上的三座“结核病大山”分别是: 耐多药结核病 (multidrug-resistant TB, MDR-TB)、广泛耐药结核病 (extensively drug resistant TB, XDR-TB) 以及与艾滋病病毒 (HIV) 共感染。据统计, 仅在 2013 年, 全球就有约 48 万人患耐多药结核病, 其中有 9.0% 的耐多药结核病患者同时罹患广泛耐药结核病。在 2013 年, 全球约有 150 万结核病患者死亡, 其中 36 万人为结核病和艾滋病病毒共感染患者。(以上数据均引自 WHO 的《2014 年全球结核病报告》)

2 分泌蛋白的潘多拉魔盒——分枝杆菌分泌系统

结核杆菌分泌蛋白通过分泌系统进入宿主细胞内, 从而干扰宿主的正常杀菌途

径, 以达到致病目的 [10]。目前已知的分枝杆菌属的分泌系统主要有 4 种: 通用型分泌系统(general secretion pathway, SecA1)、替代型分泌系统(accessory secretion system, SecA2)、双精氨酸分泌系统(twin-arginine translocation, Tat)和Ⅶ型分泌系统(type Ⅶ secretion systems, T7S system or ESX) [11,12,13,14]。在细菌中, 大部分的分泌蛋白都是通过通用型分泌系统(SecA1)从胞内合成位点转运穿过细胞膜的, 由 SecA ATPase 为蛋白的转运提供能量 [15]。分枝杆菌属有两个互不重叠的 SecA 同系物: SecA1 和 SecA2, 因此这两个蛋白分别衍生出 SecA1 和 SecA2 分泌系统。在致病性的结核杆菌和非致病性的分枝杆菌属模式生物耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中, SecA1 对于蛋白转运是必须的, 称为“管家型”分泌系统; 而 SecA2 是非必需的“备用型”分泌系统, 用来转运一些特异的蛋白 [16,17,18]。“备用型”分泌系统 SecA2 只分布在李斯特氏菌属、分枝杆菌属等少数几类细菌中 [19]。以上两种分泌系统一般转运未折叠的蛋白质。Tat 分泌系统出现较早, 也比较重要, 一般转运折叠的蛋白质, 缺失 *tat* 基因的结核杆菌无法存活。ESX 分泌系统是分枝杆菌中发现的相对较晚的一类分泌系统的统称, 由 ESX-1~ESX-5 组成, 近年来对这些分泌系统的研究越来越深入, 也发现该类系统在结核杆菌的致病性中发挥着举足轻重的作用 [20]。下面就这几个分泌系统做一简要综述。

2.1 SecA1 分泌系统

SecA1 分泌系统非常保守, 普遍存在于所有细菌中(其它细菌中叫 Sec 系统), 一般分泌未折叠的、N-端有信号肽的底物蛋白。主要由跨膜组分 SecY、SecE、SecG、SecD、SecF 以及用于识别信号肽序列的 ATP 酶 SecA1(其它细菌中叫 SecA)组成。SecA 在所有细菌中是必需的, 但真核生物中该分泌系统的同系物使用的是不同的 ATP 酶 [21]。SecA 是 Sec 分泌系统的中心部件, 它不仅是其他组件的连接纽带, 而且为蛋白分泌提供能量 [22]。像其它革兰氏阳性菌一样, 分枝杆菌属也缺乏分子伴侣 SecB; 因此, 它们可能利用其它位于细胞质内的分子伴侣将未折叠状态的蛋白质从核糖体运输至 SecA 处 [23]。跨膜蛋白 SecY、SecE 和 SecG 构成 SecA1 分泌系统的跨膜转运通道, 所有底物蛋白都从该跨膜通道穿过细胞膜 [24]。SecD 和 SecF 构成调节亚基, 防止插入膜中的 SecA 脱落 [25,26]。

和其它细菌一样, 分枝杆菌属 SecA1 分泌系统底物蛋白的信号肽序列(下文称 SecA1 信号肽)也包含三个功能域, 带正电荷的 N-末端, 一个疏水结构域和一个不带电荷的极性结构域。革兰氏阴性细菌中, SecA1 信号肽大约由 20 个氨基酸残基组成; 而革兰氏阳性细菌中, SecA1 信号肽大约由 60 个氨基酸残基组成。分枝杆菌的 SecA1 信号肽序列类似于革兰氏阳性菌, 但这些序列的功能不详 [27]。

鉴于 SecA1 分泌系统十分保守，且其在大肠杆菌中研究的最为透彻，以下将以大肠杆菌中的 Sec 分泌系统为例简要总结该类系统转移蛋白的具体机制。Sec 分泌系统分泌底物蛋白大体可以分为三个过程：寻靶、转运和释放。

(1) 寻靶。从核糖体中首先合成出来的是信号肽，新生的信号肽会阻止整个肽链的折叠 [28,29]，并且允许诸如 SecB 和 GroEL [30]等分子伴侣的结合。不管是哪种分子伴侣结合，最终的结果都是使得合成出来的底物能够准确无误地结合到 Sec 分泌系统位于细胞质的那一侧。Sec 分泌系统结合底物蛋白前体和分子伴侣复合体的受体是 SecA 分子。信号肽可以促使底物前体复合物与 SecA 的结合，有报道称即便没有其他辅助因子，信号肽也可以特异地结合 SecA [31]。一旦和 Sec 分泌系统组分作用，底物蛋白前体就会从分子伴侣 SecB 上脱离，并转移到已经和 SecYEG 结合的 SecA 上 [32]。此时，SecB 就会进入下一个循环。

(2) 转运。在转运过程中最重要的是 SecA 使用 ATP 的能量进行的插入-脱离循环 [25,33]。SecA 在高亲和力核苷酸位点 (NBD1) 结合 ATP 时插入，ATP 水解时脱离[22]。SecA 介导的转运底物蛋白前体的过程分为两个不同的阶段 [34]：首先，多肽链结合 SecA 导致转运大约 20 个氨基酸。接下来，ATP 结合上 SecA 促使另外 15-20 个氨基酸转运。此时，底物蛋白前体已经旋入分泌系统并靠近 SecA 和 SecY [28]。SecDF 可以固定住插入的 SecA 从而防止转运中间体的旋出 [26]。当结合上 SecA 的 ATP 水解时，多聚底物蛋白前体就从 SecA 释放进入跨膜通道 SecYEG 的“孔洞”。SecA 插入和脱离的多次循环使得多肽链以分段的形式转运。当底物转运了一半时，如果去掉 SecA，该分泌系统也能继续完成转运过程 [26,28]。改变 SecG 的拓扑结构可能会促进 SecA 循环 [22]。这种效果在分泌系统受到诸如低温、缺乏 SecD 或 SecF [26]或低 PMF 水平损伤时表现的更加明显。而在缺失 SecG 后，另外两个转运子组分 SecD 和 SecF 就显得很重要了 [35]。因为它们对插入膜中的 SecA 有稳定作用。

(3) 释放。一旦底物蛋白暴露于周质空间中，其 Lep 切割位点就能够被蛋白酶捕获。Lep 是一个膜蛋白，暴露于周质中的是一个大的包含催化中心的亲水结构域 [36]。此结构域可能位于转运子出口靠近信号肽切割位点附近。一旦信号肽被切割下来，剩下的成熟肽链就不再附着在膜上而开始迅速折叠成成熟的分泌蛋白。

2.2 SecA2 分泌系统

2.2.1 SecA2 分泌系统简介

和大多数革兰氏阴性菌完全不同的是，所有已经测序的分枝杆菌属基因组都编码一个非必需的 SecA 同系物，叫做 SecA2 [16,37]。越来越多的革兰氏阳性菌也被发现既编码 SecA1 也编码 SecA2，包括单增李斯特氏菌 (*Listeria monocytogenes*)

[16,38]。分枝杆菌属中 *secA2* 基因簇是在评价结核杆菌基因组序列时被发现的 [16]。不管是致病性的还是非致病性的分枝杆菌，一个细菌都有两个 *secA* 基因 (*SecA1* 和 *SecA2*)。分枝杆菌属中 *secA1* 是必需基因，*secA2* 是非必需基因，目前人们已经在耻垢分枝杆菌、结核杆菌和 *M. bovis* BCG 中构建了 *secA2* 突变株 [16,39]。在结核杆菌中，*SecA2* 序列与 *SecA1* 只有 50% 的序列相似性及 38% 的序列一致性，说明二者并不是简单的重复等位基因 [16]。因此，尽管两种分泌系统都能分泌底物蛋白，但它们在功能上是不重叠的，互相也无法替换。即使 *SecA2* 过表达，也不能替代 *SecA1* 的作用；反之亦然 [16]。不过最近的研究又有新见解，Rigel 等人发现 *SecA1* 分泌系统功能受损时，*SecA2* 分泌系统的底物 Msmeg1712 (详见下文) 的分泌会受到一定的抑制，这说明 *SecA2* 转运底物时，也需要 *SecA1* 的参与 [40]。此外，他们还发现 *SecA1* 蛋白平均分布于细胞质和细胞膜上，而 *SecA2* 蛋白主要定位于细胞质中；而且 *SecA2* 行使功能时也需要 ATP 的参与。

2.2.2 *SecA2* 分泌系统的底物

在使用二维-PAGE 比较耻垢分枝杆菌的细胞膜组分时，Gibbons 等人发现了 *SecA2* 分泌系统的两个具有信号肽的底物蛋白：脂蛋白 Msmeg1704 和 Msmeg1712 [41]。当缺失 *secA2* 基因时，这两个蛋白无法分泌到细胞壁上，而是聚集在细胞质和细胞膜组分中；且它们似乎要比成熟的分泌蛋白大一些，因此推测它们为未加工的前体蛋白。不过值得注意的是，*secA2* 的缺失并没有完全阻断这些脂蛋白的分泌 [41]。推测可能还有其它分泌系统介导这些蛋白的分泌，但还需研究证明。应该注意的是，并不是所有的脂蛋白都是由 *SecA2* 分泌系统分泌的 [41]。

在对结核杆菌分泌蛋白中进行的一次相对蛋白质组学分析发现了 *SecA2* 分泌系统的底物 SodA (铁超氧化物歧化酶) [39]。使用二维 PAGE 比较结核杆菌野生型和 *secA2* 突变株的培养基滤液蛋白组分 (CFP) 时，只发现了少量的蛋白有差异。发现三个蛋白质在 *secA2* 突变株的 CFP 组分中的量减少了：SodA，Acr (α -晶体蛋白，HspX) 和 Rv0390 (功能未知的蛋白)，且都缺少信号肽 [39]。采用免疫印迹分析和酶法分析检测到缺少 *SecA2* 分泌系统时，分泌到培养基中的 SodA 蛋白数量及其超氧化物歧化酶活性都降低了 [39,42]。通过免疫印迹分析发现另外一个抗氧化蛋白 KatG (过氧化氢酶-过氧化物酶) 的分泌也依赖 *SecA2* 分泌系统，它也缺少信号肽。因此，综合以上不同的底物蛋白的信息，说明 *SecA2* 分泌系统能分泌有信号肽和无信号肽的底物蛋白。但其具体机制还有待进一步研究。

2.2.3 *SecA2* 分泌系统在结核杆菌致病性中的作用

耻垢分枝杆菌 *secA2* 突变株在完全培养基上生长受限，这说明该分泌系统对

细菌的适应性有着多方面的作用 [16]。在小鼠模型中，结核杆菌 *secA2* 突变株在感染早期显示出明显的生长缺陷，且感染了该突变株的小鼠的存活时间明显比感染了野生型结核杆菌的小鼠长 [39,43]。结核杆菌 *secA2* 突变株在感染巨噬细胞模型中也表现出毒力减弱 [43]。鉴于结核杆菌 *secA2* 突变株无法正常地分泌抗氧化酶 SodA 和 KatG，因此 SecA2 分泌系统可能具有保护结核杆菌免受巨噬细胞的氧化压力的能力。但在不产生氧化压力的巨噬细胞中，结核杆菌 *secA2* 突变株仍表现出生长受限，这说明 SecA2 分泌系统应该还有其他作用。感染结核杆菌 *secA2* 突变株的巨噬细胞细胞凋亡率上升 [42]。此外，感染结核杆菌 *secA2* 突变株的巨噬细胞也能释放更多的促炎症细胞因子，所以 SecA2 分泌系统及其底物的另外一个作用可能是限制宿主细胞的免疫应答 [43]。与目前广泛使用的 BCG 疫苗相比，结核杆菌 *secA2* 突变株在小鼠和豚鼠被结核杆菌感染时能够为宿主提供更多的保护性免疫反应 [42]。这种保护性免疫反应源于感染了 *secA2* 突变株的动物模型加强了 CD8⁺ T 细胞应答。这显示了 SecA2 分泌系统能够帮助结核杆菌规避宿主保护性免疫应答。结核杆菌在宿主巨噬细胞中生存的一个策略是阻止吞噬体酸化。巨噬细胞被结核杆菌 *secA2* 突变株感染后，吞噬体酸化率更高，这说明 SecA2 分泌系统分泌了某些能够干扰吞噬体成熟的底物蛋白，从而促进结核杆菌在巨噬细胞内的生存 [44]。但具体是哪个分泌蛋白起作用还有待进一步研究 [45]。

在单增李斯特氏菌中，SecA2 分泌系统能够分泌分解肽聚糖层的酶 [46]。被这些分泌性酶消化的肽聚糖的分解产物被宿主识别后，能够改变宿主天然免疫应答从而为细菌的增殖提供有利环境 [46]。有意思的是，结核杆菌 *secA2* 突变株在感染巨噬细胞时会产生更强烈的炎症免疫反应，这与该假设不谋而合 [43]。其次，格氏链球菌 (*Streptococcus gordonii*) 的 SecA2 分泌系统能分泌高度糖基化的粘附分子 GspB [47,48,49]。因此，细菌进化出 SecA2 分泌系统可能反应了某些底物结构上的变异：这类底物拥有复杂的翻译后修饰，已经无法由经典的 SecA1 分泌系统分泌出胞外。总而言之，要了解 SecA2 分泌系统在结核杆菌致病性中更详细的贡献，鉴定出更多的分泌底物是关键。

2.3 Tat 分泌系统

Tat 分泌系统不仅存在于革兰氏阳性菌中，也存在于革兰氏阴性菌中，但与 Sec 分泌系统的普遍性不同的是，该系统并不存在于每一种细菌中 [50]。病原菌中的 Tat 分泌系统一般都负责分泌毒力蛋白，因此该分泌系统对致病性有贡献 [51]。在结核杆菌中，Tat 分泌系统在致病性和耐药性方面有重要作用，而且也是结核杆菌生存必需的 [52]。目前，人们对于 Tat 分泌系统的了解大多源自大肠杆菌 [53,54]，因此下文也主要以大肠杆菌 Tat 分泌系统为蓝本来介绍结核杆菌的 Tat 分泌系统。

2.3.1 Tat 分泌系统的组成

和大肠杆菌一样,分枝杆菌属的 Tat 分泌系统主要由三种蛋白构成: TatA、TatB 和 TatC [37,52,55]。结核杆菌的 *tatA*、*tatB* 和 *tatC* 与大肠杆菌的同源基因的序列一致性分别为 44%、38%和 43% [56]。TatA 和 TatB 是小分子同源蛋白,都包含一个跨膜结构域;而 TatC 是一个包含六个跨膜结构域的大分子蛋白 [57]。TatB 和 TatC 形成具有分泌底物结合位点的复合物 [58,59]。一旦分泌底物结合 TatBC, TatA 就被招募至该复合物 [59]。TatA 能以不同数目单体的形式形成转运通道,这可能是满足不同大小和形状的底物蛋白的分泌需求 [53,60]。一个功能完整的 Tat 分泌系统一般只包含 1 个 TatB 和 TatC,而 TatA 单体则可能有多达 20 个。三种组分的比例对于 Tat 分泌系统行使正常功能至关重要。过表达 *tatB* 时,此分泌系统的功能完全丧失 [61]。过表达 *tatA* 时,对 Tat 分泌系统的转运效率也有比较大的抑制作用 [61]。相反,过表达 *tatC* 时,却可以减轻系统的饱和度 [62]。只有当同时按比例过表达 *tatABC* 时, Tat 分泌系统的效率才显著增加 [63]。

Tat 分泌系统还有一些非必需组分。如一种具有 DNase 活性的胞质蛋白 TatD,它对于错误折叠的底物蛋白具有纠错能力,帮助维持最佳的分泌状态 [64,65]。TatE 迄今只在革兰氏阴性菌大肠杆菌中发现,并且 TatE 和 TatA 有部分功能重叠,二者的氨基酸序列相似性超过 60% [66]。Tat 分泌系统所需的能量来源于质子动势 [67,68]。一旦以前蛋白的形式被转运出细菌体后, Tat 分泌底物就会被一种 IV 型信号肽酶 LepB 切掉其信号肽 [69]。有人推测 Tat 的另一类底物脂蛋白的信号肽可能是被一种 II 型信号肽酶 LspA 切割 [70]。

2.3.2 Tat 分泌系统的底物

和 Sec 分泌系统类似, Tat 分泌系统的底物(简称 Tat 底物)也包含信号肽,其 N 端由三部分组成。不过 Tat 信号肽与 Sec 信号肽完全不同,前者在带正电荷的 N 端和中心疏水结构域之间包含一个共同基序(S/T)-R-R-x-F-L-K(或者更常见的可以表示为 R-R-x- \emptyset - \emptyset , \emptyset 表示一个不带电荷的氨基酸残基) [71]。Tat 分泌系统也是由信号肽中间两个并排的精氨酸而得名,缺失掉这两个精氨酸后,底物蛋白无法分泌出去 [72]。目前有几个生物信息学软件基于信号肽预测 Tat 底物,如 TatP、Tatfind、TatPred 和 PREDTAT [73,74,75,76]。人们也利用生物信息学软件预测结核杆菌中的 Tat 底物,但各个软件之间重复性很低,且假阳性结果很高 [55,77]。因此,结核杆菌的 Tat 底物需要进一步实验验证。

大肠杆菌中的 Tat 底物通常在细胞质中结合辅因子,分泌出去前需要折叠成天然构象。利用在耻垢分枝杆菌中构建 *tat* 缺失突变株的方法,研究人员鉴定出了一些分枝杆菌 Tat 底物,如两个 β -内酰胺酶 BlaS 和 BlaC。这些 *tat* 突变株对 β -内酰

胺类抗生素更加敏感 [37,55]。将 BlaC 的信号肽去掉或 RR 基序突变掉之后, 该蛋白无法分泌。研究显示 BlaC 不会与辅因子结合, 其信号肽也无法被 Sec 信号肽替换, 这说明该蛋白在细胞质中进行了部分折叠[37]。因此, 使用截断的 BlaC 和 β -内酰胺类抗性作为 Tat 分泌系统的报告基因, 研究人员通过构建随机基因组文库筛选到了 13 个新的结核杆菌 Tat 底物 [77]。有意思的是, 结核杆菌的一个 Tat 底物 PlcB 不能被耻垢分枝杆菌分泌。这说明结核杆菌中可能存在一个协助 Tat 分泌的未知的分子伴侣 [77]。

2.3.3 Tat 分泌系统在结核杆菌生理及致病性中的作用

结核杆菌中, Tat 分泌系统是必需的。除非有代偿机制 (如质粒过表达), 否则 *tatA*、*tatB* 和 *tatC* 都不能被敲除 [52]。Tat 分泌系统的必需性并不普遍; 目前为止, 只发现在另一种细菌苜蓿中华根瘤菌 (*Sinorhizobium meliloti*) 中该分泌系统是必需的 [78]。而且, 同属的耻垢分枝杆菌中的 Tat 分泌系统也是非必需的, 尽管单独敲除 *tatA*、*tatB* 和 *tatC* 使该菌体外生长变慢 [37,55]。Tat 分泌系统只在某些细菌 (如结核杆菌) 中是必需的, 个中原因仍有待探索。

Tat 分泌系统对分枝杆菌耐药有贡献。由于分枝杆菌属分泌 β -内酰胺酶, 因此该属细菌天然耐受 β -内酰胺类抗生素。结核杆菌和耻垢分枝杆菌的 β -内酰胺酶分别是 BlaC 和 BlaS, 都必需依赖 Tat 分泌系统分泌到胞外, 用以抵抗 β -内酰胺类抗生素 [37]。

此外, 结核杆菌的 Tat 分泌系统在致病性方面也有贡献, 因为一些 Tat 底物都是结核杆菌的毒力蛋白, 如 Ag85A [79]、Rv2525c [52]、磷酸酯酶 PlcB 和 PlcA [80]。鉴于哺乳动物细胞不编码 Tat 分泌系统及其在结核杆菌致病性方面的作用, 使得 Tat 分泌系统可以作为一个潜在的药物靶点 [81]。

2.4 ESX 分泌系统

2.4.1 简介

ESX 分泌系统, 又叫七型或 WXG100 分泌系统, 是首先发现于分枝杆菌属中的一类特异的蛋白转运系统 [82]。此类系统对致病性有重要贡献, 某些革兰氏阳性菌如金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 中也发现存在这类分泌系统 [83]。分枝杆菌的 ESX 分泌系统一共有五个成员, ESX-1~ESX-5, 目前的研究主要集中在 ESX-1、ESX-3 和 ESX-5, 人们对 ESX-2 和 ESX-4 几乎一无所知 [84]。结核杆菌中第一个被发现的是 ESX-1, 负责分泌 6kDa 早期分泌抗原 (early secreted antigenic target 6 kD, ESAT-6)。ESX 分泌系统的标志是它们分泌类 ESAT-6 蛋白, 这也是该类分泌系统取名为 ESX 的原因。所有类 ESAT-6 蛋白都是小分子蛋白

(~100 个氨基酸), 包含一个 WXG 氨基酸基序, 这些蛋白的信号肽与 Sec 或 Tat 信号肽完全不一样。结核杆菌中, 每个 ESX 分泌系统都是由基因组上 7-18 个基因组成的基因簇编码, 这些基因簇除了编码该类分泌系统的核心组件, 也编码一些类 ESAT-6 蛋白 [85]。下文将使用最新规范的 ESX 分泌系统命名法 [86]。限于篇幅, 下文将主要介绍各个分泌系统在结核杆菌生理和致病性方面的贡献。

2.4.2 ESX-1: 介导宿主-病原菌相互作用

结核杆菌中编码 ESX-1 组分的基因位于 RD1 区。该基因簇在疫苗菌株 BCG 以及一些结核杆菌复合体中毒力减弱的菌株如田鼠分枝杆菌 (*Mycobacterium microti*) 中是缺失的 [87]。越来越多的研究从不同角度证明 ESX-1 分泌系统能强有力地影响宿主-病原菌相互作用。致病性分枝杆菌以及表达完整 ESX-1 分泌系统的 BCG 能够从被感染的巨噬细胞和树突细胞的吞噬体转移到细胞质中, 而分枝杆菌 ESX-1 突变株即使在感染后期仍被困于吞噬体中, 且与野生型相比细胞毒性更弱 [88,89,90]。从分子水平来看, 该结果可能是 ESAT-6 作用于宿主细胞生物膜造成的 [91,92]。最新研究显示源于致病性和非致病性分枝杆菌的 ESAT-6 蛋白可能经历不同的蛋白折叠过程 [93], 暗示 ESAT-6 在进化过程中的变化对分枝杆菌致病性极其重要。

ESX-1 还影响分枝杆菌感染时期的其它关键特征 [79]。结核杆菌和 BCG 的基因组有 99.9% 的相似性 [94], 然而有无 ESX-1 仍然造成了二者之间的巨大差异。减毒疫苗菌株 BCG 在诸如细胞-细胞之间播散 [91,95]、凋亡 [96] 和自噬 [97,98] 方面都不如结核杆菌。结核杆菌和 BCG 在活化 NLRP3 炎症体 [99,100,101]、诱导 I 型干扰素 [102] 和 CD8 T 细胞应答 [103] 方面也有巨大差异。所有这些效应似乎与结核杆菌能释放分泌蛋白到宿主细胞质而 BCG 由于缺失 RD1 区 (编码 ESX-1) 而丧失了该能力有很大关系。人们利用质粒将 ESX-1 重新表达于 BCG 中, 发现重组 BCG 在细胞生物学实验方面有着与结核杆菌更加接近的表型, 如诱导宿主细胞死亡及在感染动物模型时表现出更强的毒性 [88,90]。不过, BCG 由于多次连续传代积累了大量其它弱化突变 [104], 导致重组 BCG 毒力仍不及结核杆菌 [105,106]。此外, 在 *M. marinum* 中的研究展现了 ESX-1 的另一个新功能, ESX-1 底物能招募巨噬细胞到新生肉芽肿周围, 从而促进肉芽肿的成熟和细菌的繁殖 [107]。

2.4.3 ESX-3: 不仅仅参与金属离子的代谢

全基因组转座子突变分析 ESX-3 分泌系统对于结核杆菌体外生长是必需的 [108], 这说明该系统在结核杆菌生理过程有重要作用。当发现整个 *esx-3* 基因簇受到锌离子摄取调节子 Zur 和铁离子依赖性转录抑制子 IdeR 调控时

[109,110,111,112], 人们猜测该系统参与金属离子的代谢。该假说被结核杆菌 ESX-3 条件敲除株证实是正确的: 该敲除株无法在正常培养基上生存, 但额外加入铁离子或锌离子使该敲除株恢复生长 [113]。目前鉴定出了 ESX-3 的第一批底物, WXG100 家族成员 EsxG/H [114,115]。对 EsxG/H 复合物结构进行解析发现一个锌离子结合位点 [116], 暗示该底物可能参与结核杆菌的锌离子摄取。

另有研究显示 ESX-3 在结核杆菌感染期间能刺激宿主产生保护性免疫。一个表达结核杆菌 *esx-3* 基因簇的耻垢分枝杆菌 *esx-3* 突变株 (名为 IKEPLUS) 在小鼠受到结核杆菌攻击时, 激发的保护性免疫甚至优于 BCG 疫苗 [117]。不过 ESX-3 在该新型潜在疫苗菌株中的作用有待进一步研究。

2.4.4 ESX-5: 分泌 PE/PPE 家族蛋白

ESX-5 只分布于慢生型分枝杆菌属中, 包含大部分的致病性分枝杆菌 [85], 这可能暗示该系统对分枝杆菌的缓慢生长和/或致病性有贡献。有意思的是在分枝杆菌基因组上 *esx-5* 基因簇之后都会出现大量的 *pe/ppe* 基因 [118]。实验也证实 PE/PPE 以及 PE_PGRS 蛋白主要是由 ESX-5 分泌到胞外 [119,120,121], 而这些蛋白的 PE 和 PPE 基序则被认为是分泌必需的 [122,123]。尽管有许多成员参与分枝杆菌各个感染阶段的致病性, 但大多数 PE/PPE 家族蛋白的功能未知 [124]。

利用结核杆菌或 *M. marinum* 的 *esx-5* 突变株进行的感染实验发现它们在感染巨噬细胞时, 毒力减弱了, 不过并不是突变 *esx-5* 的每一个组分都具有这样的效果 [119,121,125]。与 *esx-1* 突变株类似, *esx-5* 突变株也能影响巨噬细胞死亡, 但后者并不影响分枝杆菌从吞噬体逃逸至细胞质的过程 [125,126]。和这些感染实验大不一样的是, 同样的 *M. marinum* *esx-5* 突变株在成年斑马鱼模型中显示出了超毒力表型, 而这似乎与适应性免疫系统无关。该 *esx-5* 突变株在成年斑马鱼中显示出超常的生长优势, 暗示 ESX-5 底物可能参与在天然宿主中建立适合生存和潜伏感染的过程 [127]。在结核杆菌中删除 *esx-5* 基因簇的 *eccD5* 或 5 个 *pe/ppe* 基因后, 在正常小鼠和 SCID 小鼠 (一种免疫缺陷小鼠) 中都表现出毒力减弱的表型 [121,128]。结核杆菌和 *M. marinum* 有不一样的 ESX-5 底物, 特别是 PE_PGRS, 这似乎可以解释二者 *esx-5* 突变株在毒力上的表现不一致 [129], 但仍需实验验证。

2.5 小结

结核杆菌通过许多途径释放分泌蛋白到胞外。除了经典的 SecA1 和 Tat 分泌系统外, 结核杆菌还有其特异的 SecA2 和 ESX 分泌系统——当然还可能存在其它未知的分泌系统。目前所知的结核杆菌分泌系统都从不同方面对其生理或毒力起着重要作用。进一步探索分枝杆菌分泌系统, 对于理解其致病性乃至开发抗痨药物

都至关重要。

3 分泌蛋白介导的结核分枝杆菌操控宿主的主要策略

3.1 宿主与结核杆菌之间的“博弈”

结核杆菌经呼吸道吸入后进入肺泡，被肺泡巨噬细胞吞噬进入吞噬体，经加工处理后将抗原信息传递给 T 细胞诱导 Th，应答使之致敏。致敏的 T 细胞再次遇到结核杆菌时，便释放出一系列细胞因子，使巨噬细胞聚集在细菌周围，并激活巨噬细胞。激活的巨噬细胞通过释放活性氧代谢产物，自噬作用以及抗菌肽等杀灭结核杆菌；已吞噬结核杆菌的吞噬体也可以与溶酶体融合，通过溶酶体酶将被吞噬的细菌降解；此外有文献报道维生素 D 对于宿主的防御也有贡献 [130]。另一方面，结核杆菌亦能够逃避吞噬细胞的吞噬和杀灭作用。结核杆菌能否在体内繁殖并产生毒性取决于宿主和细菌之间的“博弈”，当这两种作用达到平衡时结核杆菌便以休眠状态存在于巨噬细胞中。本节我们重点关注巨噬细胞中吞噬溶酶体融合对结核杆菌的杀灭作用及结核杆菌分泌蛋白介导的逃避宿主杀灭作用的策略。因为结核杆菌的致病性主要是通过阻止吞噬体成熟而存活于巨噬细胞中表现出来的 [131]，所以深入了解病原菌和宿主之间的“博弈”能够帮助开发新的阻断和治疗结核病的策略 [130]。

3.2 宿主的重要杀菌手段——吞噬体与溶酶体的融合

结核杆菌被巨噬细胞吞噬之后，经过一系列的膜内陷、出芽以及融合事件导致吞噬体的形成 [132,133]。形成的吞噬体相继与早期内涵体（简称早内体）、晚期内涵体（晚内体）和溶酶体融合 [134]。经历早期、中期、晚期吞噬体，最后形成吞噬溶酶体。吞噬体的转变是通过其内腔组分的剧烈变化所完成的，这个成熟的吞噬体将变得具有酸性，氧化性及降解活性 [131]。从而更好地消化降解其中的微生物。

新形成的吞噬体快速的与早内体融合而获得许多后者的特征。这个时期的吞噬体倾向于与“分拣和回收”的内体融合，而不是溶酶体 [135,136]。此时吞噬体内腔呈轻度酸性（pH 6.1-6.5）及弱水解活性 [137]。早期吞噬体膜上的标记物是小 GTPase Rab5A 及其效应子 EEA1 [138]。Rab5 直接与 EEA1 结合，被认为是连接早内体和内吞小囊泡的纽带 [139]。Rab5A 也可以通过其他效应子起作用，比如 p150-hVPS34 复合体和可溶性 N-乙基顺丁希二酰亚胺敏感因子连接蛋白受体核心复合体（soluble NSF attachment protein receptor, SNARE）。丝/苏氨酸激酶 p150 促使 hVP34 的招募，而 hVP34 是 class 3 的一种磷脂酰肌醇-3-激酶（PI3K），在早期吞噬体膜上产生磷脂酰肌醇-3-磷酸（PI3P）。PI3P 通过 FYVE 和 PX 域为参与吞噬

体成熟的效应蛋白如 Hrs 和 EEA1 等提供结合位点[132]。另外 EEA1 与突触融合蛋白 13 (syntaxin 13) 接触 [140]，而 syntaxin 13 是一种膜融合需要的 SNARE 蛋白。因此 Rab5 和 EEA1 能够促进吞噬体成熟。

中期吞噬体是介于早期吞噬体和晚期吞噬体的过渡状态，主要的特点是保留 Rab5 但丧失 EEA1 [131]。一旦回收蛋白被移走，吞噬体就发展到晚期阶段。典型特征是通过质子泵 V-ATPase 获得的更低的 pH 值 (5.5-6.0) [134]以及介导吞噬体和晚内体或溶酶体融合的小 GTPase Rab7A 的富集。此外，晚期吞噬体也会更多地富集蛋白酶及溶酶体相关的膜蛋白 (LAMPs)，这可能是通过高尔基体输入或者是与晚内体的融合获得 [131]。此时的吞噬体就不能和早内体融合了 [141]。尽管目前还不知道 Rab7A 介到晚期吞噬体上的机制，但其作用却相当重要。Rab7A 招募 Rab-交联溶酶体蛋白 (Rab-interacting lysosomal protein, RILP) 作为纽带连接吞噬体膜和动力蛋白-动力蛋白激活蛋白马达复合体，后者再与微管蛋白连接，促进晚期吞噬体和溶酶体的轴心运动 [142]。VpsC-同型蛋白分选复合体 (VpsC-HOPS)，能够介导标记 Rab5A 的内体向标记 Rab7A 的内体转变 [143]，可能在吞噬体的成熟过程中与 Rab7A 起协同作用。它通过调节 SNARE 蛋白来促进小泡的停泊及膜的融合。其组分 VPS33B 能够与 t-SNARE 结合并且特异性地与 GTPases 作用，被认为是调节膜运输与融合的关键因子，抑制其活性可以阻止吞噬溶酶体的融合。以上表明吞噬体与晚内体或溶酶体的融合过程可以被 Rab7A 和 RILP 介导，也可以被 Rab7A 和 HOPS 介导。不过有研究表明，即使吞噬体招募了 Rab7A 和 RILP，磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K) 抑制剂仍然可以阻止其成熟过程 [144]；揭示 Rab7A 和 RILP 不是晚期吞噬体成熟的唯一介导因子，且此成熟过程必需依赖一个单独的、肌醇磷脂事件。

吞噬体成熟过程的终点是吞噬溶酶体的形成，后者是杀灭微生物的终极细胞器。吞噬溶酶体拥有完整的，复杂的“武器库”用以消化和降解微生物。吞噬溶酶体的分子特征是：LBPA [145]、甘露糖-6-磷酸受体的缺乏 [146]，富含 PI3P 的内膜 [147]以及高水平的成熟组织蛋白酶——这些都是区分于晚期吞噬体的特点。

3.3 结核杆菌的反击——参与抑制吞噬溶酶体融合的效应分子

结核杆菌通过多种方式操控巨噬细胞逃避杀灭并创造一个合适增殖的环境，其中抑制吞噬体成熟是其中研究最透彻的机制。此抑制作用囊括了吞噬体成熟的很多方面：如融合及裂变事件，H⁺-ATPase 的招募等等。结核杆菌的蛋白和糖脂在此抑制过程中都起到了很重要的作用 (图 1 和表 1)。致病分枝杆菌参与破坏糖脂和蛋白介导的这种调控机制，阻止内吞体与溶酶体的融合，从而逃避宿主的杀灭 [132]。下面我们详细介绍一些主要的效应分子。

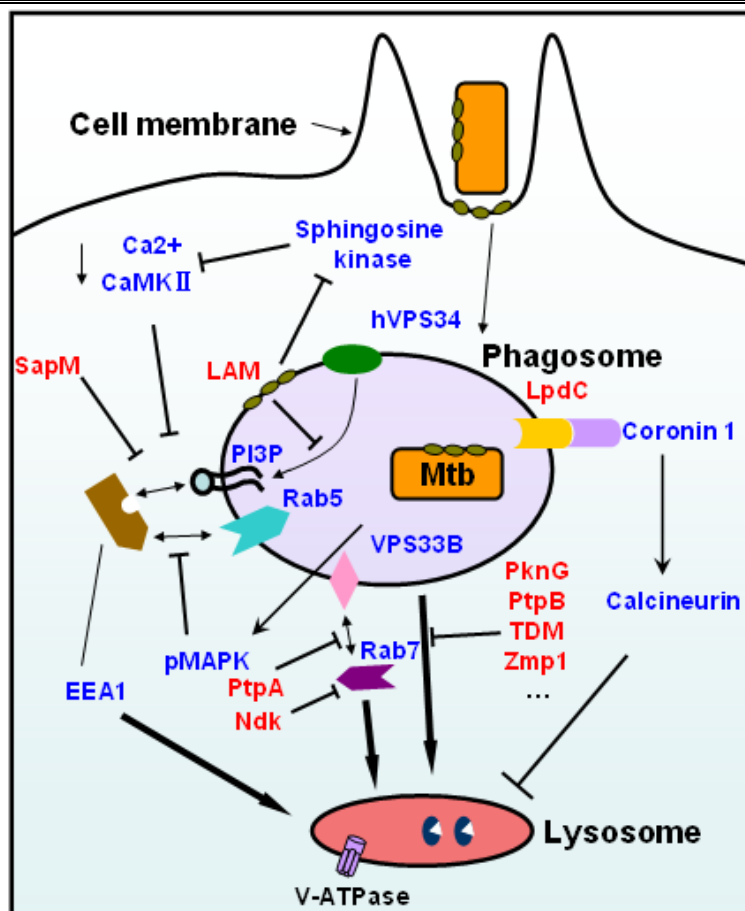


图 1. 调节吞噬体成熟的宿主-病原菌相互作用模型。结核杆菌效应分子用红色表示，宿主蛋白用蓝色表示。

Fig. 1. Modulation model of host-pathogen interactions of the phagosome maturation. *M. tuberculosis* effectors are depicted in red, whereas host factors are blue. Brown represents the Mtb effectors that have not identified host targets yet.

3.2.1 LAM

在将吞噬体阻断在早期的过程中，脂阿拉伯-甘露醇聚糖（LAM）发挥着关键作用。LAM 是分枝杆菌细胞壁上重要的糖脂，含量很丰富，在细菌进入细胞后会整合到巨噬细胞膜上 [148]。甘露糖帽子是 LAM 的关键结构，只存在于致病性分枝杆菌中 [149]，介导 LAM 与宿主细胞的甘露糖受体（MR）结合，且这一相互作用对于包含纯化的 LAM 的乳胶微粒抑制吞噬体成熟很重要 [150]。不过最近有研究提出了相反的观点 [151]。尽管 ManLAM 整合到巨噬细胞膜上的机制未知，但它能够通过破坏脂筏结构完全地阻止膜融合 [152]。

此外，ManLAM 可以抑制 EEA1 的招募。这一抑制过程是多方面的，一方面通过阻断胞质的 Ca^{2+} 离子流来抑制 EEA1 的招募，因为 EEA1 的运输必需依赖 calmodulin- and Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) [153,154]；而抑制钙

离子流是通过抑制巨噬细胞的翘鞍醇激酶来实现的 [153]。所以 ManLAM 通过抑制翘鞍醇激酶间接地抑制 EEA1 的招募。另一个机制是阻断 PI3P 在吞噬体膜上的积累，普遍认为是 ManLAM 抑制 PI3K hVPS34 的活性以及 SapM 去磷酸化 PI3P 来实现的 [155,156]。总之，以上事件的结果是 Rab5 功能受损及 EEA1 无法在吞噬体膜上聚集。使吞噬体无法和晚内体及溶酶体融合，同时也无法积累 H^+ -ATPase。从而将吞噬体阻断在 pH 相对中性的早期吞噬体阶段。

3.2.2 LpdC

在分析包含分枝杆菌的吞噬体的蛋白成分时，显示有一个蛋白只存在于包含活菌的吞噬体膜上，不与任何其它亚细胞结构作用。此蛋白之前被命名为 TACO (Tryptophan aspartate containing coat protein) 或者 P57，现在叫做 coronin 1。coronin 1 通过调控钙调蛋白依赖的信号途径阻止吞噬溶酶体融合 [132]，是一个重要的特定阻断溶酶体传递及避免巨噬细胞内分枝杆菌死亡的宿主分子。

Deghmane 等人鉴定了分枝杆菌中与 coronin1 结合的一个蛋白 Lipoamide dehydrogenase (LpdC) [157]。在结核杆菌和 BCG 中，LpdC 是丙酮酸脱氢酶复合物的 E3 组分，也是形成完整过(氧化)亚硝酸盐还原酶/过氧化物酶所必需的，报道称后者在分枝杆菌抗氧化压力中起关键作用 [158]。LpdC 结合 coronin 1 并将其滞留在 BCG 的吞噬体上，而且他们也证实这一结合过程依赖胆固醇。随后他们发现在巨噬细胞中表达 LRG-47 能够在很大程度上克服 BCG 的抑制作用使囊泡顺利酸化。而且 LRG-47 聚集在吞噬体膜上的同时，coronin 1 会从 LpdC 上解离并从 BCG 囊泡上脱落。不过 LRG-47 介导的 LpdC-coronin 1 复合物脱离吞噬体膜的具体机制仍有待研究。意外的是，一个存在于细菌代谢途径的硫辛酰胺脱氢酶居然能够在抑制吞噬体成熟方面发挥作用，目前不清楚两者之间有何联系。

3.2.3 PknG

PknG 是唯一一个在所有致病分枝杆菌中都存在的可溶性激酶，在结核杆菌感染巨噬细胞时发挥重要作用，体外生存是非必需的 [132]。PknG 是一个抑制吞噬体成熟的重要效应蛋白，在结核杆菌感染巨噬细胞过程中加入一个 PknG 的抑制剂后，包含结核杆菌的吞噬体能够迅速成熟并杀死其胞内致病菌 [159]。PknG 通过磷酸化一个调控吞噬体成熟的未知宿主蛋白起作用 [160]，然而不清楚 PknG 蛋白是如何进入宿主细胞质的机制。它可能是通过磷酸化巨噬细胞某些蛋白质，影响巨噬细胞内的信号转导而发挥作用的。

有意思的是，在耻垢分枝杆菌中表达 BCG 的 PknG 后，能够阻止重组耻垢分枝杆菌传递到溶酶体中；而且耻垢分枝杆菌的 PknG 也能够阻止 BCG 传递到溶酶

体中 [161]。另外,通过序列比对发现耻垢分枝杆菌中 *pknG* 基因与结核杆菌和 BCG 的同源基因的序列相似分别为 78% 和 87%。那么为什么 *pknG* 在非致病菌耻垢分枝杆菌中是无效的? Houben 等人使用 western blot 发现在耻垢分枝杆菌中,由于 *pknG* 操纵子上游区域有一个转录阻遏效应,导致 *pknG* 只能转录而不能翻译 [162]; 从而解释了耻垢分枝杆菌不能阻止吞噬溶酶体融合。然而,之前的研究结果却与之相悖:使用 PknG 的底物 GarA 作为诱饵能够在耻垢分枝杆菌的裂解液中共沉淀出 PknG 蛋白 [163]。所以有人提出观察到的 BCG 的 *pknG* 缺失株传递到溶酶体的现象,可能是由于 PknG 引起了细菌生理上的变化而不是直接干扰宿主的信号通路 [164]。

3.2.4 PtpA

PtpA 是一种低分子量的蛋白酪氨酸磷酸酶,结核杆菌基因组中缺少典型的蛋白酪氨酸激酶 (protein tyrosine kinase, PTK) 让人猜测 PtpA 可能修饰宿主的酪氨酸磷酸化蛋白。早期研究显示纯化的重组 PtpA 特异性作用于磷酸酪氨酸残基 [165]。随后的实验显示结核杆菌在进入巨噬细胞后 PtpA 的表达上调 [165], 而且 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* 感染人类巨噬细胞后可以分泌 PtpA [166], 说明 PtpA 在感染宿主时发挥作用。这些结果激起了人们探索 PtpA 的作用底物及其在巨噬细胞中的生理学功能的兴趣。PtpA 对于结核杆菌在体外的生长是非必需的,但在使用结核杆菌 *ptpA* 缺失株感染人巨噬细胞时却显示出关键作用 [167]。Bach 等人使用 substrate trap 技术发现了 PtpA 在宿主中的相互作用蛋白 VPS33B [167]。VPS33B 是膜转运和融合的关键调节子,失活此蛋白导致吞噬溶酶体无法融合。VPS33B 和其它 5 个组分一起构成 HOPS 复合体 [168]。HOPS 复合体调节 SNARE 蛋白的活性,进而促进小泡的锚定和膜的融合 [169]。因为 VPS33B 是 HOPS 的组分,能够结合 t-SNARE 并特异结合 GTPases [169]。所以 PtpA 干扰吞噬溶酶体融合的可能机制是: VPS33B 被 PtpA 去磷酸化后,不能与 GTPases 结合,从而阻断了膜与膜之间的锚定作用。然而,结核杆菌在小鼠感染模型中不需要 PtpA [170], 这也说明了小鼠模型并不是研究结核病的最理想模型。

3.2.5 PtpB

与 PtpA 不同, PtpB 在人体内没有同源序列, Koul 等人 [171] 证明 PtpB 能够分泌到培养基中,而且很多报道都认为它特异性作用于磷酸酪氨酸底物 [171,172]。不过最近的研究显示它也能够去磷酸化丝/苏氨酸磷酸化蛋白和磷酸肌醇,显示三重特异性 [173]。晶体结构分析也显示 PtpB 拥有两个不同的磷酸酪氨酸结合位点 [174]。基于这些结果,人们猜测 PtpB 可能阻断宿主的磷酸肌醇代谢及相关信号通

路，而这些通路在吞噬体成熟过程中起着重要作用，所以推测 PtpB 在结核杆菌干扰吞噬溶酶体融合中有贡献。在小鼠巨噬细胞中结核杆菌的 *ptpB* 缺失株活力下降，而且在被感染豚鼠的脾脏中其菌荷量下降 70 倍 [175]。PtpB 的特异性抑制剂能够损伤分枝杆菌在小鼠巨噬细胞中的存活力 [176]，这更进一步说明了 PtpB 在结核杆菌胞内存活的重要作用。不过，PtpB 在 TB 致病性中的作用仍需进一步的研究，尤其是对其底物的鉴定。

3.2.6 其它效应分子

在分析结核杆菌细胞壁成分时，发现 TDM（或索状因子）对于结核杆菌在巨噬细胞中存活及阻止结核杆菌向酸性环境运送有贡献 [177]。突变掉合成 TDM 的酶 [178]以及乳胶微粒模型 [177,179]都显示 TDM 能够延迟吞噬体成熟。目前还不清楚 TDM 在宿主中的相互作用蛋白及其具体机制，但有证据显示环丙烷修饰会影响 TDM 的免疫调制活性和细菌胞内存活 [180]。Ndk 也是一个抑制吞噬体成熟的效应蛋白 [181]。重组结核杆菌的 Ndk 对 Rab5 和 Rab7 显示出 GTPase 活化蛋白（GAP）活性。Ndk 的 BCG 敲除实验及乳胶微粒模型同样证明 Ndk 能够延迟吞噬体成熟及增强致病菌的胞内存活能力，且后者的作用与 Rab5 和 Rab7 的失活相关。Zmp1，预测为一个锌离子金属蛋白酶，通过抑制促炎症细胞因子 IL-1 β 的活性，抑制吞噬体成熟 [182]。而且 p38 MAPK 被结核杆菌的某些效应分子激活，导致 Rab5 活性降低从而减少吞噬体上 EEA1 的含量 [183]。结核杆菌和 *M. marinum* 的 Esx-1 敲除株显示 ESX-1 分泌系统能够抑制吞噬体成熟 [184,185]，但缺乏此基因簇的 BCG 却同样能干扰吞噬溶酶体的融合。这种差异目前还没有很好的解释。在结核杆菌中，已知的底物（ESAT-6, CFP-10 和 EspA）对于 ESX-1 抑制吞噬体成熟好像都不是必须的 [184]。虽然 EspB 的同系物 Mh3881c 是 *M. marinum* 阻断吞噬体成熟所必需的，但 EspB 可能不是真正的效应分子，所以应该还存在其他未鉴定的效应分子起作用 [186,187]。

Table 1. 参与抑制吞噬溶酶体融合的效应分子。

Table 1. Effectors that contribute to the survival of obligatory intracellular bacterial pathogens.

Effectors	Cellular target	Effector function	Refs
LAM	Unknown	Blocks cytosolic Ca ²⁺ fluxes, suppressing hVPS34 activation	[153,155]
SapM	PI3P	Hydrolyzes PI3P, inhibiting phagosome-late endosome fusion	[172]
PtpA	VPS33B	Dephosphorylates VPS33B, arresting phagolysosome fusion	[167]
LpdC	coronin-1	Retains coronin-1 on the phagosomal membrane, leading to arrest in phagosome maturation	[157]
Zmp1	Inflammasome	Prevents inflammasome and, therefore, IL-1 β activation	[188]

Ndk	Rab5 and Rab7	Inactivation of both Rab5 and Rab7, thereby inhibiting their respective effectors recruitment	[181]
PknG	Unknown	Acts by phosphorylating a host molecule, thereby preventing the activity of this host factor in carrying out phagosome-lysosome fusion	[132]
PtpB	Unknown	Might be capable of disrupting host phosphoinositide metabolism and its associated signaling pathways	[173]
TDM	Unknown	Mediates intracellular trafficking events, as well as influence macrophage production of pro-inflammatory molecules	[177]

3.4 对于新药物开发的启示

疫苗和化疗毫无争议地是生物医药研究领域促进公共卫生发展的最大动力。然而，新药开发出来的同时，病原菌的耐药性也随之产生了。这就需要对抗感染药物的持续性研究。以前的药物靶向关键酶，现在的方向是靶向调节宿主免疫应答的蛋白或脂质 [159]。参与操控宿主细胞途径的细菌蛋白和脂质提供了丰富的新药靶点库 [159]。开发这些分子的靶向药物的好处是不会破坏对宿主有益的共生菌而且副作用小。

以 PknG 为例，它作为分枝杆菌在巨噬细胞中生存的必需因子促使人们寻找特异的激酶抑制剂，因为激酶对于开发抑制化合物是一个有吸引力的靶点。目前大多数用于治疗 TB 的药物都是直接抑制分枝杆菌生理活动起作用的。相反，阻断 PknG 的活性使巨噬细胞通过将胞内驻留菌从吞噬体转移到溶酶体来执行其先天杀菌活性，从而诱导杀灭这些菌。此外，因为 PknG 是分泌蛋白，以 PknG 为药靶，抑制剂不需要穿过渗透性极差的分枝杆菌细胞壁。事实上，现在人们已经开展了高通量筛选 PknG 抑制剂的工作。尽管与真核生物的 PknG 高度同源，但细菌的 PknG 包含一个特异性的结构域。抑制剂可以特异地作用于这个结构域来显示其特异性 [132]。将阿拉伯糖残基加到其细胞壁前体 lipomannan (LM) 上的酶也是一个很重要的药物靶点，因为纯化的 LM 能够诱导宿主细胞凋亡和 IL-8、IL-12 及 TNF- α 的分泌 [189,190,191]。真核生物细胞不能表达 LAM，因此参与其生物合成的酶与真核细胞的酶有很大区别，可以作为药靶。以 ESX-1 核心蛋白为靶点的药物开发可以从几方面阻断结核杆菌毒力因子与宿主细胞的相互作用，从而增加这些药物的有效性。

总而言之，由于效应分子的特异性，研究效应分子的靶向药物比研究管家基因蛋白的靶向药物更具有优越性，同时不会扰乱宿主体内正常的菌群 [159]。而且可以克服结核细胞壁的不可穿透性，增加药物的有效浓度。不过由于众多效应分子的功能很多都是重叠的，这将导致单独用药可能无法产生足够的有效性。

3.5 小结

结核杆菌通过寄生在巨噬细胞内的吞噬体中，调节内体的发生和成熟，致使形成的吞噬体不能获得溶酶体性质。同时通过各种方式获得生长增殖所需要的铁等营养物质，而排除不利于自身发展的钙离子、氢离子-ATPase 等物质，使吞噬体膜上含有较高浓度的 Rab5、EEA-1、转铁蛋白受体等早内体标志物，避免获得 CD63、LAMP-1、LAMP-2、GTP-Rab7 等晚内体标志物。总而言之，其结果都是阻止吞噬溶酶体的成熟，从而为结核杆菌营造一个相对安全的胞内环境。随着研究的深入，结核杆菌分泌的能够干扰吞噬体成熟的蛋白被一一鉴定出来（图 1 和表 1）。人们相信结核杆菌逃避免疫杀伤的机制不是由某一种或某一条逃逸通路单独起作用，而更可能是一种组合调控或协同作用的结果。目前已经鉴定出一些协同作用的蛋白，如 SapM 可能与 ManLAM 一同阻断吞噬体对 PI(3)P 效应子 EEA1 的招募，PtpA 和一个 GAP 活性可能阻断 Rab7 的招募和激活等。随着技术的进步以及研究的深入，相信在不久的将来，人类一定可以完整地解析出结核杆菌的逃逸策略，从而开发出更加有效的药物战胜这一强大的敌人。

参考文献

1. Besra GS, Khoo KH, Mcneil MR, Dell A, Morris HR, et al. (1995) A New Interpretation of the Structure of the Mycolyl Arabinogalactan Complex of *Mycobacterium Tuberculosis* as Revealed through Characterization of Oligoglycosylalditol Fragments by Fast-Atom-Bombardment Mass-Spectrometry and H-1 Nuclear-Magnetic-Resonance Spectroscopy. *Biochemistry* 34: 4257-4266.
2. Daffe M, Brennan PJ, McNeil M (1990) Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of *Mycobacterium tuberculosis* as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by ¹H and ¹³C NMR analyses. *J Biol Chem* 265: 6734-6743.
3. Dover LG, Cerdeno-Tarraga AM, Pallen MJ, Parkhill J, Besra GS (2004) Comparative cell wall core biosynthesis in the mycolated pathogens, *Mycobacterium tuberculosis* and *Corynebacterium diphtheriae*. *FEMS Microbiol Rev* 28: 225-250.
4. McNeil M, Daffe M, Brennan PJ (1991) Location of the mycolyl ester substituents in the cell walls of mycobacteria. *J Biol Chem* 266: 13217-13223.
5. Mcneil M, Daffe M, Brennan PJ (1990) Evidence for the Nature of the Link between the Arabinogalactan and Peptidoglycan of Mycobacterial Cell-Walls. *Journal of Biological Chemistry* 265: 18200-18206.
6. Bhowruth V, Alderwick LJ, Brown AK, Bhatt A, Besra GS (2008) Tuberculosis: a balanced diet of lipids and carbohydrates. *Biochem Soc Trans* 36: 555-565.
7. Brennan PJ, Crick DC (2007) The cell-wall core of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of

- drug discovery. *Curr Top Med Chem* 7: 475-488.
8. Brennan PJ, Nikaido H (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem* 64: 29-63.
 9. Jarlier V, Nikaido H (1990) Permeability barrier to hydrophilic solutes in *Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol* 172: 1418-1423.
 10. Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, et al. (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4033-4038.
 11. DiGiuseppe Champion PA, Cox JS (2007) Protein secretion systems in Mycobacteria. *Cell Microbiol* 9: 1376-1384.
 12. Driessen AJ, Nouwen N (2008) Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane. *Annu Rev Biochem* 77: 643-667.
 13. Natale P, Brusler T, Driessen AJ (2008) Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1778: 1735-1756.
 14. 李武, 王洪海, 谢建平 (2010) 分枝杆菌分泌系统. *中国生物化学与分子生物学报* 8: 697-704.
 15. Mitchell C, Oliver D (1993) Two distinct ATP-binding domains are needed to promote protein export by *Escherichia coli* SecA ATPase. *Mol Microbiol* 10: 483-497.
 16. Braunstein M, Brown AM, Kurtz S, Jacobs WR, Jr. (2001) Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria. *J Bacteriol* 183: 6979-6990.
 17. Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol Microbiol* 48: 77-84.
 18. Guo XV, Monteleone M, Klotzsche M, Kamionka A, Hillen W, et al. (2007) Silencing *Mycobacterium smegmatis* by using tetracycline repressors. *J Bacteriol* 189: 4614-4623.
 19. Rigel NW, Braunstein M (2008) A new twist on an old pathway--accessory Sec systems. *Mol Microbiol* 69: 291-302.
 20. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, et al. (2007) Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 5: 883-891.
 21. Pohlschroder M, Prinz WA, Hartmann E, Beckwith J (1997) Protein translocation in the three domains of life: variations on a theme. *Cell* 91: 563-566.
 22. Economou A (1999) Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol* 7: 315-320.
 23. Scott JR, Barnett TC (2006) Surface proteins of gram-positive bacteria and how they get there. *Annual Review of Microbiology* 60: 397-423.
 24. Brundage L, Hendrick JP, Schiebel E, Driessen AJM, Wickner W (1990) The Purified *Escherichia-Coli* Integral Membrane-Protein Secy/E Is Sufficient for Reconstitution of Seca-Dependent Precursor Protein Translocation. *Cell* 62: 649-657.
 25. Economou A, Pogliano JA, Beckwith J, Oliver DB, Wickner W (1995) SecA membrane cycling

- at SecYEG is driven by distinct ATP binding and hydrolysis events and is regulated by SecD and SecF. *Cell* 83: 1171-1181.
26. Duong F, Wickner W (1997) The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J* 16: 4871-4879.
 27. Wiker HG, Wilson MA, Schoolnik GK (2000) Extracytoplasmic proteins of *Mycobacterium tuberculosis* - mature secreted proteins often start with aspartic acid and proline. *Microbiology* 146 (Pt 7): 1525-1533.
 28. Duong F, Eichler J, Price A, Leonard MR, Wickner W (1997) Biogenesis of the gram-negative bacterial envelope. *Cell* 91: 567-573.
 29. Randall LL, Topping TB, Smith VF, Diamond DL, Hardy SJ (1998) SecB: a chaperone from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 290: 444-459.
 30. Bochkareva ES, Solovieva ME, Girshovich AS (1998) Targeting of GroEL to SecA on the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 478-483.
 31. Miller A, Wang L, Kendall DA (1998) Synthetic signal peptides specifically recognize SecA and stimulate ATPase activity in the absence of preprotein. *J Biol Chem* 273: 11409-11412.
 32. Fekkes P, de Wit JG, van der Wolk JP, Kimsey HH, Kumamoto CA, et al. (1998) Preprotein transfer to the *Escherichia coli* translocase requires the co-operative binding of SecB and the signal sequence to SecA. *Mol Microbiol* 29: 1179-1190.
 33. Economou A, Wickner W (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* 78: 835-843.
 34. van der Wolk JP, de Wit JG, Driessen AJ (1997) The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J* 16: 7297-7304.
 35. Suzuki H, Nishiyama K, Tokuda H (1998) Coupled structure changes of SecA and SecE revealed by the synthetic lethality of the secAcsR11 and delta secE::kan double mutant. *Mol Microbiol* 29: 331-341.
 36. Paetzel M, Dalbey RE, Strynadka NCJ (1998) Crystal structure of a bacterial signal peptidase in complex with a beta-lactam inhibitor. *Nature* 396: 186-190.
 37. McDonough JA, Hacker KE, Flores AR, Pavelka MS, Jr., Braunstein M (2005) The twin-arginine translocation pathway of *Mycobacterium smegmatis* is functional and required for the export of mycobacterial beta-lactamases. *J Bacteriol* 187: 7667-7679.
 38. Lenz LL, Portnoy DA (2002) Identification of a second *Listeria* secA gene associated with protein secretion and the rough phenotype. *Mol Microbiol* 45: 1043-1056.
 39. Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR, Jr. (2003) SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 48: 453-464.
 40. Rigel NW, Gibbons HS, McCann JR, McDonough JA, Kurtz S, et al. (2009) The Accessory SecA2 System of Mycobacteria Requires ATP Binding and the Canonical SecA1. *J Biol Chem* 284: 9927-9936.

41. Gibbons HS, Wolschendorf F, Abshire M, Niederweis M, Braunstein M (2007) Identification of two *Mycobacterium smegmatis* lipoproteins exported by a SecA2-dependent pathway. *J Bacteriol* 189: 5090-5100.
42. Hinchey J, Lee S, Jeon BY, Basaraba RJ, Venkataswamy MM, et al. (2007) Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Invest* 117: 2279-2288.
43. Kurtz S, McKinnon KP, Runge MS, Ting JP, Braunstein M (2006) The SecA2 secretion factor of *Mycobacterium tuberculosis* promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. *Infect Immun* 74: 6855-6864.
44. Sullivan JT, Young EF, McCann JR, Braunstein M (2012) The *Mycobacterium tuberculosis* SecA2 system subverts phagosome maturation to promote growth in macrophages. *Infect Immun* 80: 996-1006.
45. Feltcher ME, Braunstein M (2012) Emerging themes in SecA2-mediated protein export. *Nat Rev Microbiol* 10: 779-789.
46. Lenz LL, Mohammadi S, Geissler A, Portnoy DA (2003) SecA2-dependent secretion of autolytic enzymes promotes *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12432-12437.
47. Bensing BA, Sullam PM (2002) An accessory sec locus of *Streptococcus gordonii* is required for export of the surface protein GspB and for normal levels of binding to human platelets. *Molecular Microbiology* 44: 1081-1094.
48. Bensing BA, Gibson BW, Sullam PM (2004) The *Streptococcus gordonii* platelet binding protein GspB undergoes glycosylation independently of export. *J Bacteriol* 186: 638-645.
49. Bensing BA, Takamatsu D, Sullam PM (2005) Determinants of the streptococcal surface glycoprotein GspB that facilitate export by the accessory Sec system. *Mol Microbiol* 58: 1468-1481.
50. Dilks K, Rose RW, Hartmann E, Pohlschroder M (2003) Prokaryotic utilization of the twin-arginine translocation pathway: a genomic survey. *J Bacteriol* 185: 1478-1483.
51. De Buck E, Lammertyn E, Anne J (2008) The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends Microbiol* 16: 442-453.
52. Saint-Joanis B, Demangel C, Jackson M, Brodin P, Marsollier L, et al. (2006) Inactivation of Rv2525c, a substrate of the twin arginine translocation (Tat) system of *Mycobacterium tuberculosis*, increases beta-lactam susceptibility and virulence. *J Bacteriol* 188: 6669-6679.
53. Robinson C, Matos CF, Beck D, Ren C, Lawrence J, et al. (2011) Transport and proofreading of proteins by the twin-arginine translocation (Tat) system in bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1808: 876-884.
54. Palmer T, Berks BC (2012) The twin-arginine translocation (Tat) protein export pathway. *Nature Reviews Microbiology* 10: 483-496.
55. Posey JE, Shinnick TM, Quinn FD (2006) Characterization of the twin-arginine translocase

- secretion system of *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* 188: 1332-1340.
56. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
 57. Behrendt J, Standar K, Lindenstrauss U, Bruser T (2004) Topological studies on the twin-arginine translocase component TatC. *FEMS Microbiol Lett* 234: 303-308.
 58. Tarry MJ, Schafer E, Chen S, Buchanan G, Greene NP, et al. (2009) Structural analysis of substrate binding by the TatBC component of the twin-arginine protein transport system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 13284-13289.
 59. Alami M, Luke I, Deitermann S, Eisner G, Koch HG, et al. (2003) Differential interactions between a twin-arginine signal peptide and its translocase in *Escherichia coli*. *Molecular Cell* 12: 937-946.
 60. Gohlke U, Pullan L, McDevitt CA, Porcelli I, de Leeuw E, et al. (2005) The TatA component of the twin-arginine protein transport system forms channel complexes of variable diameter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10482-10486.
 61. Sargent F, Stanley NR, Berks BC, Palmer T (1999) Sec-independent protein translocation in *Escherichia coli*. A distinct and pivotal role for the TatB protein. *J Biol Chem* 274: 36073-36082.
 62. DeLisa MP, Lee P, Palmer T, Georgiou G (2004) Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. *J Bacteriol* 186: 366-373.
 63. Alami M, Trescher D, Wu LF, Muller M (2002) Separate analysis of twin-arginine translocation (Tat)-specific membrane binding and translocation in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 277: 20499-20503.
 64. Wexler M, Sargent F, Jack RL, Stanley NR, Bogsch EG, et al. (2000) TatD is a cytoplasmic protein with DNase activity - No requirement for TatD family proteins in Sec-independent protein export. *Journal of Biological Chemistry* 275: 16717-16722.
 65. Matos CF, Di Cola A, Robinson C (2009) TatD is a central component of a Tat translocon-initiated quality control system for exported FeS proteins in *Escherichia coli*. *EMBO Rep* 10: 474-479.
 66. journal club Berks BC, Sargent F, Palmer T (2000) The Tat protein export pathway. *Mol Microbiol* 35: 260-274.
 67. Bageshwar UK, Musser SM (2007) Two electrical potential-dependent steps are required for transport by the *Escherichia coli* Tat machinery. *J Cell Biol* 179: 87-99.
 68. Berks BC (2014) The Twin-Arginine Protein Translocation Pathway. *Annu Rev Biochem*.
 69. Luke I, Handford JI, Palmer T, Sargent F (2009) Proteolytic processing of *Escherichia coli* twin-arginine signal peptides by LepB. *Arch Microbiol* 191: 919-925.
 70. Gimenez MI, Dilks K, Pohlschroder M (2007) *Haloferax volcanii* twin-arginine translocation substrates include secreted soluble, C-terminally anchored and lipoproteins. *Mol Microbiol* 66: 1597-1606.

71. De Leeuw E, Porcelli I, Sargent F, Palmer T, Berks BC (2001) Membrane interactions and self-association of the TatA and TatB components of the twin-arginine translocation pathway. *FEBS Lett* 506: 143-148.
72. Stanley NR, Palmer T, Berks BC (2000) The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 275: 11591-11596.
73. Rose RW, Bruser T, Kissinger JC, Pohlschroder M (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* 45: 943-950.
74. Bendtsen JD, Nielsen H, Widdick D, Palmer T, Brunak S (2005) Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics* 6: 167.
75. Taylor PD, Toseland CP, Attwood TK, Flower DR (2006) TATPred: a Bayesian method for the identification of twin arginine translocation pathway signal sequences. *Bioinformatics* 1: 184-187.
76. Bagos PG, Nikolaou EP, Liakopoulos TD, Tsirigos KD (2010) Combined prediction of Tat and Sec signal peptides with hidden Markov models. *Bioinformatics* 26: 2811-2817.
77. McDonough JA, McCann JR, Tekippe EM, Silverman JS, Rigel NW, et al. (2008) Identification of functional Tat signal sequences in *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *J Bacteriol* 190: 6428-6438.
78. Pickering BS, Oresnik IJ (2010) The twin arginine transport system appears to be essential for viability in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 192: 5173-5180.
79. Ligon LS, Hayden JD, Braunstein M (2012) The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* protein export. *Tuberculosis (Edinb)* 92: 121-132.
80. Raynaud C, Guillhot C, Rauzier J, Bordat Y, Pelicic V, et al. (2002) Phospholipases C are involved in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 45: 203-217.
81. Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M (2010) Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development? *Future Microbiol* 5: 1581-1597.
82. Simeone R, Bottai D, Frigui W, Majlessi L, Brosch R (2015) ESX/type VII secretion systems of mycobacteria: Insights into evolution, pathogenicity and protection. *Tuberculosis (Edinb)*.
83. Burts ML, Williams WA, DeBord K, Missiakas DM (2005) EsxA and EsxB are secreted by an ESAT-6-like system that is required for the pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 1169-1174.
84. Houben EN, Korotkov KV, Bitter W (2014) Take five - Type VII secretion systems of Mycobacteria. *Biochim Biophys Acta* 1843: 1707-1716.
85. Gey Van Pittius NC, Gamielidien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, et al. (2001) The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. *Genome Biol* 2: RESEARCH0044.

86. Bitter W, Houben EN, Bottai D, Brodin P, Brown EJ, et al. (2009) Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. *PLoS Pathog* 5: e1000507.
87. Simeone R, Bottai D, Brosch R (2009) ESX/type VII secretion systems and their role in host-pathogen interaction. *Curr Opin Microbiol* 12: 4-10.
88. Simeone R, Bobard A, Lippmann J, Bitter W, Majlessi L, et al. (2012) Phagosomal Rupture by *Mycobacterium tuberculosis* Results in Toxicity and Host Cell Death. *PLoS Pathog* 8: e1002507.
89. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluittsma D, van Zon M, et al. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129: 1287-1298.
90. Houben D, Demangel C, van Ingen J, Perez J, Baldeon L, et al. (2012) ESX-1-mediated translocation to the cytosol controls virulence of mycobacteria. *Cell Microbiol* 14: 1287-1298.
91. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, et al. (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12420-12425.
92. de Jonge MI, Pehau-Arnaudet G, Fretz MM, Romain F, Bottai D, et al. (2007) ESAT-6 from *Mycobacterium tuberculosis* dissociates from its putative chaperone CFP-10 under acidic conditions and exhibits membrane-lysing activity. *J Bacteriol* 189: 6028-6034.
93. De Leon J, Jiang GZ, Ma Y, Rubin E, Fortune S, et al. (2012) *Mycobacterium tuberculosis* ESAT-6 Exhibits a Unique Membrane-interacting Activity That Is Not Found in Its Ortholog from Non-pathogenic *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Biological Chemistry* 287: 44184-44191.
94. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, et al. (2007) Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 5596-5601.
95. Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, et al. (2004) Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 51: 359-370.
96. Aguilo JI, Alonso H, Uranga S, Marinova D, Arbues A, et al. (2013) ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol* 15: 1994-2005.
97. Watson Robert O, Manzanillo Paolo S, Cox Jeffery S (2012) Extracellular *M. tuberculosis* DNA Targets Bacteria for Autophagy by Activating the Host DNA-Sensing Pathway. *Cell* 150: 803-815.
98. Romagnoli A, Etna MP, Giacomini E, Pardini M, Remoli ME, et al. (2012) ESX-1 dependent impairment of autophagic flux by *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *Autophagy* 8: 1357-1370.
99. Mishra BB, Moura-Alves P, Sonawane A, Hacohen N, Griffiths G, et al. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* protein ESAT-6 is a potent activator of the NLRP3/ASC inflammasome. *Cellular*

- Microbiology 12: 1046-1063.
100. Wong KW, Jacobs WR, Jr. (2011) Critical role for NLRP3 in necrotic death triggered by *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Microbiol 13: 1371-1384.
 101. Dorhoi A, Nouailles G, Jorg S, Hagens K, Heinemann E, et al. (2012) Activation of the NLRP3 inflammasome by *Mycobacterium tuberculosis* is uncoupled from susceptibility to active tuberculosis. European Journal of Immunology 42: 374-384.
 102. Stanley SA, Johndrow JE, Manzanillo P, Cox JS (2007) The Type I IFN response to infection with *Mycobacterium tuberculosis* requires ESX-1-mediated secretion and contributes to pathogenesis. J Immunol 178: 3143-3152.
 103. Ryan AA, Nambiar JK, Wozniak TM, Roediger B, Shklovskaya E, et al. (2009) Antigen load governs the differential priming of CD8 T cells in response to the bacille Calmette Guerin vaccine or *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Immunol 182: 7172-7177.
 104. Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, et al. (2007) Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104: 5596-5601.
 105. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. Mol Microbiol 46: 709-717.
 106. Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, de Jonge MI, Bottai D, et al. (2006) Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. Infect Immun 74: 88-98.
 107. Volkman HE, Pozos TC, Zheng J, Davis JM, Rawls JF, et al. (2010) Tuberculous granuloma induction via interaction of a bacterial secreted protein with host epithelium. Science 327: 466-469.
 108. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, et al. (2011) High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. PLoS Pathog 7: e1002251.
 109. Rodriguez GM, Voskuil MI, Gold B, Schoolnik GK, Smith I (2002) *ideR*, An essential gene in *mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. Infect Immun 70: 3371-3381.
 110. Maciag A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Proveddi R, et al. (2007) Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. J Bacteriol 189: 730-740.
 111. Maciag A, Piazza A, Riccardi G, Milano A (2009) Transcriptional analysis of ESAT-6 cluster 3 in *Mycobacterium smegmatis*. BMC Microbiol 9: 48.
 112. Li W, He J, Xie L, Chen T, Xie J (2013) Comparative Genomic Insights Into the Biosynthesis and Regulation of Mycobacterial Siderophores. Cell Physiol Biochem 31: 1-13.
 113. Serafini A, Boldrin F, Palu G, Manganeli R (2009) Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc. J Bacteriol

- 191: 6340-6344.
114. Siegrist MS, Unnikrishnan M, McConnell MJ, Borowsky M, Cheng TY, et al. (2009) Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 18792-18797.
115. Rosenberger T, Brulle JK, Sander P (2012) A beta-Lactamase based reporter system for ESX dependent protein translocation in mycobacteria. *PLoS One* 7: e35453.
116. Ilghari D, Lightbody KL, Veverka V, Waters LC, Muskett FW, et al. (2011) Solution Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* EsxG:EsxH Complex FUNCTIONAL IMPLICATIONS AND COMPARISONS WITH OTHER M. TUBERCULOSIS Esx FAMILY COMPLEXES. *Journal of Biological Chemistry* 286: 29993-30002.
117. Sweeney KA, Dao DN, Goldberg MF, Hsu T, Venkataswamy MM, et al. (2011) A recombinant *Mycobacterium smegmatis* induces potent bactericidal immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* 17: 1261-1268.
118. Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, et al. (2006) Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. *BMC Evol Biol* 6: 95.
119. Abdallah AM, Verboom T, Hannes F, Safi M, Strong M, et al. (2006) A specific secretion system mediates PPE41 transport in pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* 62: 667-679.
120. Abdallah AM, Verboom T, Weerdenburg EM, Gey van Pittius NC, Mahasha PW, et al. (2009) PPE and PE_PGRS proteins of *Mycobacterium marinum* are transported via the type VII secretion system ESX-5. *Mol Microbiol* 73: 329-340.
121. Bottai D, Di Luca M, Majlessi L, Frigui W, Simeone R, et al. (2012) Disruption of the ESX-5 system of *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of PPE protein secretion, reduction of cell wall integrity and strong attenuation. *Mol Microbiol* 83: 1195-1209.
122. Neyrolles O, Cascioferro A, Daleke MH, Ventura M, Donà V, et al. (2011) Functional Dissection of the PE Domain Responsible for Translocation of PE_PGRS33 across the Mycobacterial Cell Wall. *PLoS One* 6: e27713.
123. Daleke MH, Cascioferro A, de Punder K, Ummels R, Abdallah AM, et al. (2011) Conserved PE and PPE protein domains target LipY lipases of pathogenic mycobacteria to the cell surface via ESX-5. *Journal of Biological Chemistry*.
124. Sampson SL (2011) Mycobacterial PE/PPE proteins at the host-pathogen interface. *Clin Dev Immunol* 2011: 497203.
125. Abdallah AM, Bestebroer J, Savage ND, de Punder K, van Zon M, et al. (2011) Mycobacterial secretion systems ESX-1 and ESX-5 play distinct roles in host cell death and inflammasome activation. *J Immunol* 187: 4744-4753.
126. Abdallah AM, Savage ND, van Zon M, Wilson L, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. (2008) The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J*

- Immunol 181: 7166-7175.
127. Weerdenburg EM, Abdallah AM, Mitra S, de Punder K, van der Wel NN, et al. (2012) ESX-5-deficient *Mycobacterium marinum* is hypervirulent in adult zebrafish. *Cellular Microbiology* 14: 728-739.
 128. Sayes F, Sun L, Di Luca M, Simeone R, Degaiffier N, et al. (2012) Strong Immunogenicity and Cross-Reactivity of *Mycobacterium tuberculosis* ESX-5 Type VII Secretion -Encoded PE-PPE Proteins Predicts Vaccine Potential. *Cell Host Microbe* 11: 352-363.
 129. Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, et al. (2008) Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res* 18: 729-741.
 130. Liu PT, Modlin RL (2008) Human macrophage host defense against *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 20: 371-376.
 131. Flanagan RS, Cosio G, Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7: 355-366.
 132. Pieters J (2008) *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe* 3: 399-407.
 133. Aderem A, Underhill DM (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.
 134. Desjardins M, Huber LA, Parton RG, Griffiths G (1994) Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus. *J Cell Biol* 124: 677-688.
 135. Mayorga LS, Bertini F, Stahl PD (1991) Fusion of newly formed phagosomes with endosomes in intact cells and in a cell-free system. *J Biol Chem* 266: 6511-6517.
 136. Desjardins M, Nzala NN, Corsini R, Rondeau C (1997) Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion properties and size-selective acquisition of solute materials from endosomes. *J Cell Sci* 110 (Pt 18): 2303-2314.
 137. Mukherjee S, Ghosh RN, Maxfield FR (1997) Endocytosis. *Physiol Rev* 77: 759-803.
 138. Progida C, Cogli L, Piro F, De Luca A, Bakke O, et al. (2010) Rab7b controls trafficking from endosomes to the TGN. *J Cell Sci* 123: 1480-1491.
 139. Callaghan J, Nixon S, Bucci C, Toh BH, Stenmark H (1999) Direct interaction of EEA1 with Rab5b. *Eur J Biochem* 265: 361-366.
 140. McBride HM, Rybin V, Murphy C, Giner A, Teasdale R, et al. (1999) Oligomeric complexes link Rab5 effectors with NSF and drive membrane fusion via interactions between EEA1 and syntaxin 13. *Cell* 98: 377-386.
 141. de Chastellier C, Thilo L (1997) Phagosome maturation and fusion with lysosomes in relation to surface property and size of the phagocytic particle. *Eur J Cell Biol* 74: 49-62.
 142. Harrison RE, Bucci C, Vieira OV, Schroer TA, Grinstein S (2003) Phagosomes fuse with late endosomes and/or lysosomes by extension of membrane protrusions along microtubules: role

- of Rab7 and RILP. *Mol Cell Biol* 23: 6494-6506.
143. Rink J, Ghigo E, Kalaidzidis Y, Zerial M (2005) Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell* 122: 735-749.
144. Vieira OV, Bucci C, Harrison RE, Trimble WS, Lanzetti L, et al. (2003) Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 23: 2501-2514.
145. Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, et al. (1998) A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 392: 193-197.
146. Griffiths G, Hoflack B, Simons K, Mellman I, Kornfeld S (1988) The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. *Cell* 52: 329-341.
147. Gillooly DJ, Morrow IC, Lindsay M, Gould R, Bryant NJ, et al. (2000) Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *EMBO J* 19: 4577-4588.
148. Shabaana AK, Kulangara K, Semac I, Parel Y, Ilangumaran S, et al. (2005) Mycobacterial lipoarabinomannans modulate cytokine production in human T helper cells by interfering with raft/microdomain signalling. *Cell Mol Life Sci* 62: 179-187.
149. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L (2004) Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 53: 391-403.
150. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, et al. (2005) The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 202: 987-999.
151. Appelmek BJ, den Dunnen J, Driessen NN, Ummels R, Pak M, et al. (2008) The mannose cap of mycobacterial lipoarabinomannan does not dominate the Mycobacterium-host interaction. *Cell Microbiol* 10: 930-944.
152. Hayakawa E, Tokumasu F, Nardone GA, Jin AJ, Hackley VA, et al. (2007) A *Mycobacterium tuberculosis*-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains. *Biophys J* 93: 4018-4030.
153. Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, Porter B, Iyer SS, et al. (2003) Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol* 170: 2811-2815.
154. Vergne I, Chua J, Deretic V (2003) Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. *Journal of Experimental Medicine* 198: 653-659.
155. Vergne I, Chua J, Deretic V (2003) *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest: selective targeting of PI3P-dependent membrane trafficking. *Traffic* 4: 600-606.
156. Vergne I, Chua J, Singh SB, Deretic V (2004) Cell biology of *mycobacterium tuberculosis*

- phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 367-394.
157. Deghmane AE, Soualhine H, Bach H, Sendide K, Itoh S, et al. (2007) Lipoamide dehydrogenase mediates retention of coronin-1 on BCG vacuoles, leading to arrest in phagosome maturation. *J Cell Sci* 120: 2796-2806.
158. Rhee KY, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Nathan CF (2005) S-nitroso proteome of *Mycobacterium tuberculosis*: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 467-472.
159. Briken V (2008) Molecular mechanisms of host-pathogen interactions and their potential for the discovery of new drug targets. *Curr Drug Targets* 9: 150-157.
160. Rohde K, Yates RM, Purdy GE, Russell DG (2007) *Mycobacterium tuberculosis* and the environment within the phagosome. *Immunol Rev* 219: 37-54.
161. Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, et al. (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304: 1800-1804.
162. Houben EN, Walburger A, Ferrari G, Nguyen L, Thompson CJ, et al. (2009) Differential expression of a virulence factor in pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. *Mol Microbiol* 72: 41-52.
163. O'Hare HM, Duran R, Cervenansky C, Bellinzoni M, Wehenkel AM, et al. (2008) Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in mycobacteria. *Mol Microbiol* 70: 1408-1423.
164. Chao J, Wong D, Zheng X, Poirier V, Bach H, et al. (2010) Protein kinase and phosphatase signaling in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1804: 620-627.
165. Cowley SC, Babakaiff R, Av-Gay Y (2002) Expression and localization of the *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpA. *Res Microbiol* 153: 233-241.
166. Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y (2006) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* PtpA is an endogenous tyrosine phosphatase secreted during infection. *Infect Immun* 74: 6540-6546.
167. Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z, Av-Gay Y (2008) *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe* 3: 316-322.
168. Seals DF, Eitzen G, Margolis N, Wickner WT, Price A (2000) A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9402-9407.
169. Yang B, Steegmaier M, Gonzalez LC, Jr., Scheller RH (2000) nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J Cell Biol* 148: 247-252.
170. Grundner C, Cox JS, Alber T (2008) Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for *Mycobacterium tuberculosis* growth in mice. *FEMS Microbiol Lett* 287: 181-184.
171. Koul A, Choidas A, Treder M, Tyagi AK, Drlica K, et al. (2000) Cloning and characterization of

- secretory tyrosine phosphatases of *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 182: 5425-5432.
172. Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, et al. (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 102: 4033-4038.
173. Beresford N, Patel S, Armstrong J, Szoor B, Fordham-Skelton AP, et al. (2007) MptpB, a virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis*, exhibits triple-specificity phosphatase activity. Biochem J 406: 13-18.
174. Grundner C, Perrin D, Hooft van Huijsduijnen R, Swinnen D, Gonzalez J, et al. (2007) Structural basis for selective inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase PtpB. Structure 15: 499-509.
175. Singh R, Rao V, Shakila H, Gupta R, Khera A, et al. (2003) Disruption of mptpB impairs the ability of *Mycobacterium tuberculosis* to survive in guinea pigs. Mol Microbiol 50: 751-762.
176. Beresford NJ, Mulhearn D, Szczepankiewicz B, Liu G, Johnson ME, et al. (2009) Inhibition of MptpB phosphatase from *Mycobacterium tuberculosis* impairs mycobacterial survival in macrophages. J Antimicrob Chemother 63: 928-936.
177. Indrigo J, Hunter RL, Jr., Actor JK (2003) Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. Microbiology 149: 2049-2059.
178. Katti MK, Dai G, Armitage LY, Rivera Marrero C, Daniel S, et al. (2008) The Delta fbpA mutant derived from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv has an enhanced susceptibility to intracellular antimicrobial oxidative mechanisms, undergoes limited phagosome maturation and activates macrophages and dendritic cells. Cell Microbiol 10: 1286-1303.
179. Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, Schlegel B, Brinkmann V, et al. (2008) Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide. Cell Microbiol 10: 1530-1545.
180. Rao V, Gao F, Chen B, Jacobs WR, Jr., Glickman MS (2006) Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses *Mycobacterium tuberculosis* -induced inflammation and virulence. J Clin Invest 116: 1660-1667.
181. Sun J, Wang X, Lau A, Liao TY, Bucci C, et al. (2010) Mycobacterial nucleoside diphosphate kinase blocks phagosome maturation in murine RAW 264.7 macrophages. PLoS One 5: e8769.
182. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, et al. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. Cell Host Microbe 3: 224-232.
183. Fratti RA, Chua J, Deretic V (2003) Induction of p38 mitogen-activated protein kinase reduces early endosome autoantigen 1 (EEA1) recruitment to phagosomal membranes. J Biol Chem 278: 46961-46967.
184. MacGurn JA, Cox JS (2007) A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion

- system. *Infect Immun* 75: 2668-2678.
185. Tan T, Lee WL, Alexander DC, Grinstein S, Liu J (2006) The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol* 8: 1417-1429.
186. McLaughlin B, Chon JS, MacGurn JA, Carlsson F, Cheng TL, et al. (2007) A mycobacterium ESX-1-secreted virulence factor with unique requirements for export. *PLoS Pathog* 3: e105.
187. Xu J, Laine O, Masciocchi M, Manoranjan J, Smith J, et al. (2007) A unique *Mycobacterium* ESX-1 protein co-secretes with CFP-10/ESAT-6 and is necessary for inhibiting phagosome maturation. *Mol Microbiol* 66: 787-800.
188. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, et al. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe* 3: 224-232.
189. Vignal C, Guerardel Y, Kremer L, Masson M, Legrand D, et al. (2003) Lipomannans, but not lipoarabinomannans, purified from *Mycobacterium chelonae* and *Mycobacterium kansasii* induce TNF-alpha and IL-8 secretion by a CD14-toll-like receptor 2-dependent mechanism. *J Immunol* 171: 2014-2023.
190. Dao DN, Kremer L, Guerardel Y, Molano A, Jacobs WR, Jr., et al. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* lipomannan induces apoptosis and interleukin-12 production in macrophages. *Infect Immun* 72: 2067-2074.
191. Quesniaux VJ, Nicolle DM, Torres D, Kremer L, Guerardel Y, et al. (2004) Toll-like receptor 2 (TLR2)-dependent-positive and TLR2-independent-negative regulation of proinflammatory cytokines by mycobacterial lipomannans. *J Immunol* 172: 4425-4434.

第 2 章 绪论

1 选题依据、研究目的与意义

从 WHO 宣布结核病进入全球紧急状态 15 年以来，尽管花费巨大，但是结核病仍然导致了世界范围内的高发病率和高死亡率。MDR 和 XDR 结核病的出现使得这个“可治愈”的疾病又回到了前抗生素时代无药可用的尴尬境地。近 40 年来没有新药的开发使得结核病的治疗雪上加霜，因此药靶及新药的开发仍然是结核病研究的焦点。而分枝杆菌的致病性主要是通过其分泌性效应分子干扰宿主正常杀菌途径表现出来的，因此筛选鉴定关键的结核杆菌分泌性效应分子并解析其具体功能对于开发新的阻断和治疗结核病的策略有着十分重大的意义。

可以预见，在巨噬细胞中抑制结核杆菌相关的效应分子，可以恢复被病原菌扰乱的宿主免疫应答，从而可以阻止结核杆菌在宿主细胞内的繁殖。开发分泌性效应分子的抑制剂能够为药物治疗结核病（包括 MDR-TB 和 XDR-TB）提供新思路。而揭示分泌蛋白通过何种信号通路起作用能够为药物靶标的发现及新药的开发奠定坚实的基础。总而言之，开发出新的药物来抑制分泌蛋白的释放或活性将有利于人类战胜结核病。

2 科学问题

本研究拟探讨以下三个科学问题：

- (1) 结合已有的文献数据和生物信息学方法试图预测结核杆菌中关键的分泌性效应蛋白；
- (2) 具体探讨 1-2 个分泌性效应蛋白在宿主-病原菌相互作用中的所扮演的角色；
- (3) 探索分泌性效应蛋白在结核杆菌中的信号传递及调控网络。

3 研究内容与技术路线

本文主要从事结核分枝杆菌分泌性效应分子的鉴定、功能与信号传递研究。围绕这几个问题，我们完成了如下几个方面的工作。

- (1) 基于已有的文献数据，利用数据挖掘和聚类分析方法预测了一批结核杆菌关键的分泌性效应蛋白，并探讨这些蛋白作为药物靶点的可行性和重要性。
- (2) 以耻垢分枝杆菌作为模式生物，详细研究了结核杆菌蛋白 Rv3402c 在宿主-病原菌相互作用中的功能，确定了 Rv3402c 作为结核杆菌分泌性效应蛋白的事实。
- (3) 以结核杆菌的明星效应蛋白 PtpA 的调控蛋白 PtkA 为例，我们发现了 PtkA

的上游抑制蛋白，鉴定出 PtkA 新的底物 TrxB2 并详细探讨了 PtkA 对 TrxB2 及结核杆菌生理过程的影响。

本研究的技术路线如图 1 所示。

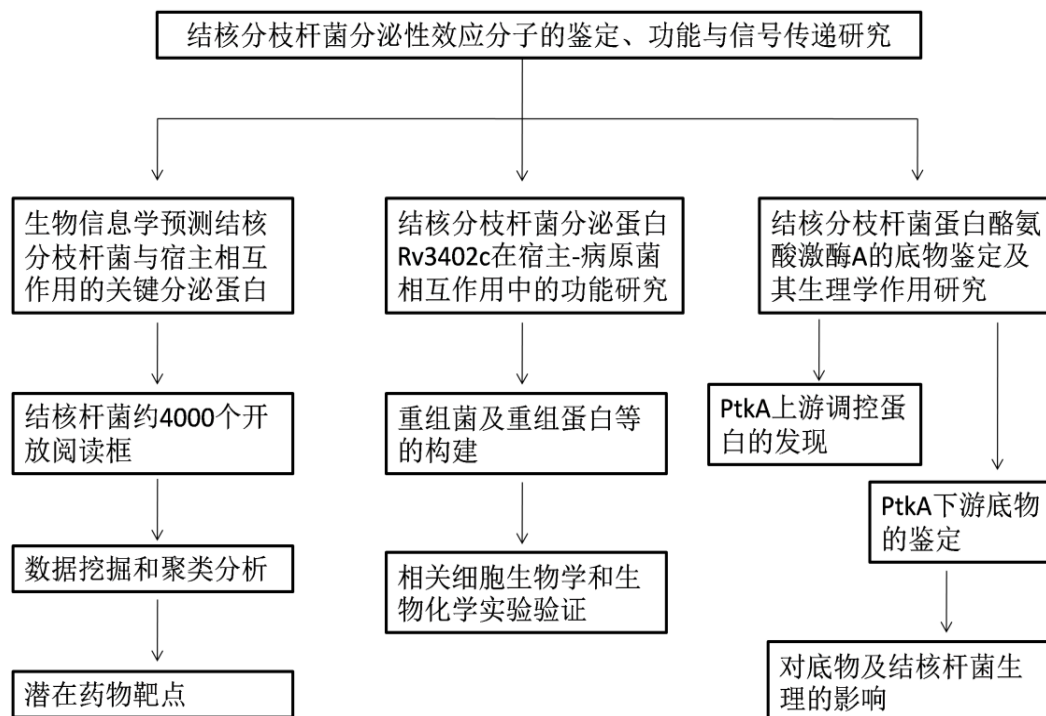


图 1. 本研究技术路线图

Fig. 1. The workflow of this study.

4 本文创新点

本文的创新之处有几点。(1)首次利用基于文献数据的数据挖掘和聚类分析方法鉴定出 54 个能与宿主相互作用的结核分枝杆菌药物靶标；而且该方法也为预测其它致病菌的药物靶标提供了蓝本。(2)首次证明 Rv3402c 蛋白是结核分枝杆菌的一个分泌性效应蛋白，它能增强重组耻垢分枝杆菌的胞内存活能力且能加速宿主巨噬细胞的裂解死亡。(3)首次发现效应蛋白 PtpA 的调控蛋白 PtkA 上游也存在一个抑制其活性的调控蛋白，这也窥见了结核分枝杆菌胞内复杂的网络调控机制；而且本文首次鉴定 TrxB2 是 PtkA 的酪氨酸激酶底物，且其分泌也受到 PtkA 的调控。

5 本文不足之处

囿于时间和精力有限，本文存在以下几点不足。(1)没有利用实验来更多地验证 54 个潜在药物靶点的可行性。(2)所有关于 Rv3402c 的研究都是在分枝杆菌模式

生物耻垢分枝杆菌中进行的，尽管在该模式生物中获得的数据可信，但接下来应该在结核分枝杆菌中进一步验证 Rv3402c 的各项功能。(3)没能鉴定出 Rv3402c 与宿主相互作用的蛋白质，这也是后续研究的重点。(4)没能鉴定出 PtkA 上游的抑制蛋白，而且 PtkA 调控 TrxB2 释放到细菌胞外与该菌在感染过程中的具体功能之间的联系还有待探索。

第 3 章 生物信息学预测结核分枝杆菌与宿主 相互作用的关键胞外蛋白

1 引言

由结核杆菌导致的结核病仍然是全球健康的主要威胁。WHO 的数据显示，2013 年全球约有 900 万新发病例和 150 万死亡病例。目前亟需开发新药及新药靶来控制结核病。

结核杆菌已经进化出许多机制来侵染宿主，并能在宿主体内获得营养并逃避宿主免疫防御机制 [1,2]。这些逃避机制主要是结核杆菌分泌的效应分子和宿主细胞之间相互作用的结果。因此，深入探索结核杆菌的这些参与宿主-病原菌之间相互作用的效应分子对于理解其致病性和开发新的药物靶点是非常重要的。一个理想的药物靶点应该具备两个特征：(1)是结核杆菌胞内生存的必需因子，(2)是病原菌特异的从而避免药物作用于宿主细胞成分。研究参与宿主-病原菌相互作用的传统的湿实验 (wet-lab experiment) 方法不仅工作量巨大，而且耗费大量资金和时间。而生物信息学方法 (或者叫干实验, dry-lab experiment) 不仅能够大大缩小药物靶点的寻找范围，而且能够显著提高药靶开发的速度。目前已经有大量基于生物信息学方法寻找结核杆菌胞内药靶的研究 [3,4]。此外研究人员已经开发出一些生物信息学方法来预测参与结核杆菌-宿主相互作用的蛋白质，这些方法基于同源基因比对，相互作用结构域或者机器学习等 [5]。不过这些努力在日渐增长的多重耐药和广泛耐药结核杆菌以及与 HIV 共感染的合力围剿下，仍然显得杯水车薪。因此，开发新的方法和鉴定新的药靶势在必行。

本章开发了一种综合性的新型生物信息学方法预测参与宿主-病原菌相互作用的结核杆菌蛋白质。(1)利用聚类分析方法按以下标准大量收集数据：(a) 攻击巨噬细胞后结核杆菌的基因表达和 DNA 芯片数据；(b) 利用全基因组插入诱变技术鉴定不同条件下基因的必需性数据；(c) 攻击动物模型后结核杆菌基因表达数据；(d) 结核病人体内结核杆菌基因表达数据；(e) 临床菌株丢失的基因数据；(f) 蛋白质亚细胞定位数据；(g) 结核杆菌与宿主及宿主肠道菌群蛋白质组的非同源性分析数据。(2)按照不同标准进行全基因组计分、排序将不同数据集的数据整合起来。(3)我们鉴定出 54 个候选蛋白质，这些都是宿主-病原菌相互作用的关键蛋白质，能够为药物靶点的开发提供启发。

2 实验材料及方法

2.1 疾病模型中表达上调基因

搜集在巨噬细胞、动物模型及结核病人条件下结核杆菌表达的芯片数据，各个文献及其描述等信息见表 1。按照表达水平由高到低排列，参照 Murphy 等人开发的计分方法计分 [6]。针对每个单独的文献数据，计分系统为 0-10 分，间隔为 0.01 分，表达最高的算 10，第二高为 9.99，第三高为 9.98....以此类推。这样可以取每一个独立芯片数据集的前 1000 个基因，即结核杆菌所有基因的 25%。如果某个文献数据有多个时间点，则各个时间点分别算分，然后取最高的那个作为此数据集中某个基因的最终得分。最后将单个基因在不同文献数据里的得分相加，然后汇总所有基因及其得分，制成 Dataset 1（附录 1，Table S1）。

表 1. 本研究所使用的文献数据

Table 1. Gene Sets Analyzed.

Category		Reference	Description	
Expression profile	Macrophage model	[7]	<i>M. bovis</i> BCG protein increased expression inside THP-1 (2-DE, MS)	
		[8]	Mtb H37Rv genes induced during infection of THP-1 (promoter trap, mbRT-PCR)	
		[9]	The intraphagosomal transcriptome of genes of Mtb clinical strain in the mouse macrophages (microarray, RT-PCR)	
		[10]	The gene expression profile of H37Rv in human macrophages was analyzed at the whole genome level (microarray, RT-PCR)	
		[11]	The protein patterns of intraphagosomally growth of H37Rv in mouse macrophages (2-DE, MS)	
		[12]	Transcriptional response of CDC1551 to mouse macrophage interactions (microarray)	
		[13]	Global transcriptional profile of H37Rv during THP-1 human macrophage infection (microarray)	
		[14]	Universally induced genes of 17 MTC strains in resting and activated mouse macrophages (microarray)	
		[15]	The global protein expression profile of intraphagosomally growth of drug resistant and sensitive Mtb clinical isolates (2-DE, MS)	
		[16]	Temporal gene expression profiles of CDC1551 during infection of mouse macrophages (microarray)	
		Animal models	[17]	Hollow fiber subcutaneous implant in mice (microarray, RT-PCR)
			[18]	The expression profile of H37Rv growth in lungs of BALB/c or SCID mice (microarray, RT-PCR)

	[19]	The H37Rv genes preferentially expressed in the mouse lung (promoter trap, RT-PCR)
	[20]	The mycobacterial transcriptional profiles during chronic and reactivation phases of murine tuberculosis (<i>in vivo</i> microarray analysis)
	[21]	The <i>in vivo</i> proteomics of the H37Rv in the guinea pig model (Mass spectrometry)
TB patients	[22]	Genes upregulated in tuberculous granulomas in lung tissue sections from tuberculosis patients (RNA-RNA in situ hybridization)
	[23]	Genes actively expressed during pulmonary tuberculosis (microarray)
	[24]	Genes induced expression in the specimens obtained from TB patients (IVIAT, qRT-PCR)
Growth/ Survival	[25]	Genes required for <i>in vivo</i> survival in mouse lungs (signature-tagged mutagenesis)
	[26]	C57B/c mice were infected with TraSH mutated libraries of H37Rv (TraSH, microarray)
	[27]	Genes required for arresting the maturation of Mtb phagosomes (transposon mutagenesis, ligation-mediated PCR)
	[28]	Genes essential for survival of Mtb in mouse lungs (transposon mutagenesis, microarray)
	[29]	Genes required for H37Rv adaptation and survival in primary murine macrophages (TraSH, microarray)
	[30]	Genes required for intracellular survival of BCG or inhibiting phagosome acidification (transposon mutagenesis, microarray)
	[31]	Genes essential for Mtb survival in guinea pigs and mice (transposon mutagenesis, microarray)
	[32]	Genes involved in the parasitism of human macrophages (transposon mutagenesis, ligation-mediated PCR)
	[33]	Genes required for invasion or survival in the central nervous system of mouse (transposon mutagenesis, real-time PCR)
	[34]	Genes required for survival and growth in nonhuman primate lungs (transposon mutagenesis, microarray)
Deleted in clinical isolates	[35]	Genes were found to be partially or completely deleted in 100 clinical isolates (DNA microarrays and sequencing)
Secreted protein	[36]	Identification of genes encoding exported Mtb proteins using a <i>in vitro</i> method (Tn552' <i>phoA</i> <i>in vitro</i> transposition system)
	[37]	Identification of secreted proteins of Mtb (bioinformatics and <i>phoA'</i> fusion technology)

	[38]	Proteins detected in the cell wall fraction and the membrane fraction (high-throughput proteomics and bioinformatics)
	[39]	Identification of the secreted proteins in the culture filtrates of Mtb H37Rv (2-DE, LC coupled MS/MS)
	[40]	Identification of outer membrane proteins of Mtb (multi-step bioinformatics approach, secondary structure analysis)
	[41]	Identification of exported proteins from whole bacteria using Triton X-114 extraction (Triton X-114 phase-separation)
	[42]	The proteomic screening of identified peptides in culture filtrate and membrane fraction of Mtb (Gel electrophoresis, Mass spectrometry)
Essential gene for <i>in vitro</i> growth	[43]	TraSH mutated libraries grown on solid media (TraSH)
	[44]	Identification of the genes that are essential for Mtb to grow <i>in vitro</i> (high-density mutagenesis and deep-sequencing)

2.2 胞内存活必需基因

在感染过程中，结核杆菌必需面对宿主产生的一系列压力，如活性氧和活性氮中间产物、酸性环境、低氧、营养和必需元素饥饿 [45,46]以及宿主免疫反应等 [1]。结核杆菌能够选择性地上调某些基因或操纵子来介导其逃避宿主的杀灭作用，从而在宿主体内生存并伺机致病 [47,48]。在此过程中一般有两方面的基因起作用：一是维持菌体本身生存的基因，另一个是结核杆菌分泌到细胞内干扰宿主杀菌功能的基因。一般将这两种基因统称为“胞内存活必需基因”。目前已经有大量研究通过结核杆菌突变库感染鼠源巨噬细胞 [27,29,30]、人源巨噬细胞 [32]、小鼠 [25,26,28]、豚鼠 [31]、中枢神经系统 [33]以及非人灵长类动物 [34] 等模型筛选鉴定这一类基因。鉴于后一类基因即是结核杆菌与宿主相互作用的关键基因，因此我们搜集所有结核杆菌突变库感染各类物模型后引起结核杆菌存活率下降的基因，取并集，制成 Dataset 2（附录 1，Table S2）。相关文献资料见表 1。

2.3 结核杆菌蛋白质亚细胞定位分析

细菌蛋白质能够与宿主相互作用的前提是能够达到菌体外，因此只有胞外蛋白——包括细菌细胞表面蛋白和分泌蛋白 [49]——才有机会与宿主相互作用。而由于胞外蛋白对结核杆菌致病性至关重要且容易被药物作用，已经有许多结核杆菌胞外蛋白被列为候选药物靶点 [50]。基于此，我们利用生物信息学和数据挖掘

方法尽可能多地搜集结核杆菌的胞外蛋白。结核杆菌标准株 H37Rv 的蛋白质序列下载自 Tuberculist 网站 (版本为 R27-March 2013) [51]。首先我们使用生物信息学方法预测结核杆菌的胞外蛋白: 使用 SignalP 软件预测 SecA 途径的分泌蛋白 [52], 我们选取分数大于 0.4 (软件的默认值是 0.35) 的蛋白作为分泌蛋白; 使用 TATfind 软件预测 TAT 途径的分泌蛋白 [53], 然后将二者取并集, 我们将预测的分泌蛋白作为一个独立的集合。然后搜索文献报道的实验验证或生物信息学预测的所有胞外蛋白, 每个实验得到的胞外蛋白作为一个独立的集合。为提高其可信度, 我们选取至少出现在两个或两个以上集合的蛋白作为本研究的胞外蛋白集合, 即为 Dataset 3 (附录 1, Table S3)。

2.4 临床菌株丢失基因

从病人体内分离出来的临床菌株所缺失的基因, 一般认为不是结核杆菌胞内存活所必须的基因 [35]。基于此, 我们从文献数据中搜集任一临床菌株所丢失的基因, 取并集, 制成 Dataset 4 (附录 1, Table S4)。

2.5 胞外生存必需基因

一般认为胞外生存必需基因编码的蛋白质为细菌的生理结构和代谢所必需 [43]。因此, 那些既能导致胞内存活受损也能导致胞外生存受损的结核杆菌突变基因被认为是影响结核杆菌结构或代谢过程, 而不是参与宿主-病原菌相互作用。目前鉴定结核分枝杆菌胞外存活基因的方法主要是转座子突变技术。主要步骤为: 首先通过转座子随机插入结核杆菌基因组, 将其基因随机打断产生生长缺陷菌株; 然后通过基因探针竞争性杂交方法鉴定出不能在完全培养基上生长或生长缺陷的突变株的插入位点。目前有两篇文献利用该技术鉴定出了大量结核杆菌胞外生存必需基因。Sasseti 等人于 2003 年鉴定出 656 个胞外生存必需基因 [43], 而 Griffin 等人于 2011 年鉴定出 773 个胞外必需基因 [44]。本研究对这两个数据集取并集, 得到 Dataset 5 (附录 1, Table S5)。

2.6 结核杆菌与宿主及宿主肠道菌群蛋白质组的同源分析

理想的药物靶点必须是病原菌特异的, 以避免不必要的宿主分子-药物之间的相互作用。因此, 在很多基于生物信息学方法鉴定药靶的研究中, 剔除与人类蛋白质组类似的病原菌蛋白质是其首要考虑的 [54,55]。将从前面步骤得到的结核杆菌目标蛋白提交到 NCBI 与人类基因组 (taxid: 9606) 进行 BLASTp 分析 [56]。我们将蛋白之间同一性 (identity) 小于 35% 以及 E 值 (E-value) 大于 0.005 的结核杆菌蛋白视为与宿主无同源性的结核杆菌蛋白 [57]。

在一个健康人的肠道中大约栖息着 10^{14} 个微生物 [58]。这些与人类共进化的肠道共生菌以各种方式对人类健康起着重要作用 [59]。随意抑制肠道菌群蛋白质可能破坏其稳态从而对人体产生副作用 [60]。人们认为药物非特异性地作用于肠道菌群也是某些药物产生毒性及其生物利用度降低的原因 [61,62]。因此，结核杆菌的药物靶点与肠道菌群蛋白质越相似，将越有可能影响药物的治疗效果。为避免产生这一影响，我们将上一步产生的与宿主蛋白无同源性的结核杆菌蛋白与 81 个典型的人类肠道菌群蛋白质组 [63]（附录 1，Table S6）进行同源比对。BLASTp 分析时，我们将 E 值大于 0.0001 的蛋白认定为与人类肠道菌群蛋白无同源性的结核杆菌蛋白 [59]。综合以上两步，我们得到了与宿主或宿主肠道菌群没有同源性的结核杆菌目标蛋白。

3 结果与讨论

3.1 一个基于大量文献的复杂数据集的建立

首先我们在分析大量以组学为主的实验数据的基础上，归纳总结了可能的胞内存活必需的胞外蛋白。接着综合利用数据挖掘以及生物信息学的方法，预测出了结核杆菌-宿主相互作用关键基因中的潜在药物靶点。图 1 为本研究所使用方法的流程图。表 1 所示为本研究使用的所有文献数据出处及其简要介绍。

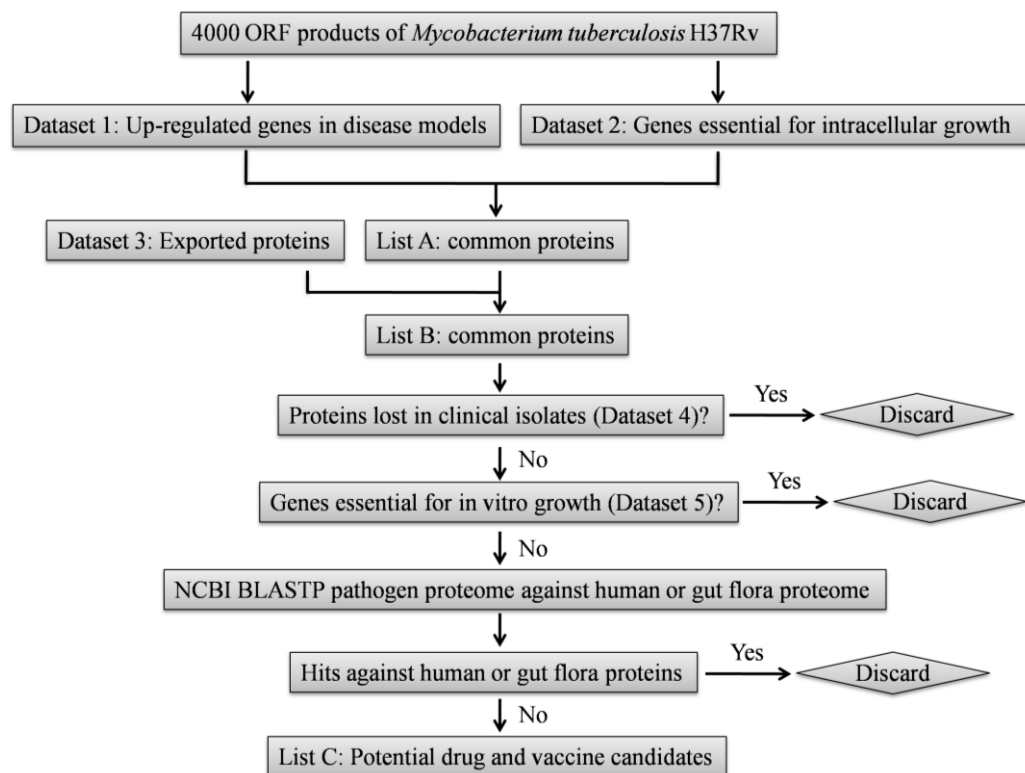


图 1. 本研究所使用方法的流程图。

Fig. 1. Flowchart of the process used to generate the prioritized list of tractable drug.

3.1.1 上调表达基因

基因表达研究一般是利用基因芯片等组学技术检测基因表达的改变（被激活或被抑制），这种改变被认为在反映该基因在应对环境改变时具有重要作用。因此，研究感染时期结核杆菌的基因表达谱能够帮助我们了解结核杆菌的致病性：在鉴定参与粘附宿主细胞，介导宿主细胞吞噬作用，抑制吞噬体成熟过程，抵抗巨噬细胞内各种杀菌物质以及干扰宿主信号途径等等的基因时具有重要意义。目前有大量文献报道感染巨噬细胞、动物模型甚至肺结核病人人体内结核杆菌的基因表达谱数据（表1）。理论上，一个基因的表达上调在不同疾病模型中报道的次数越多，那么其在真实条件下感染人体时期表达上调的可信度就越高，同时也越有可能在结核杆菌适应胞内生存环境中起到重要作用。因此我们运用一个0-10分的打分系统将不同文献中的表达谱数据综合起来考察 [6]，以达到最大限度地模拟真实感染环境下结核杆菌蛋白质的表达情况。在结核杆菌大约4000个开放阅读框中，有3485个ORF被赋予了分值。为了增加可信度且最大限度地搜集在结核杆菌-宿主相互作用中可能有贡献的上调表达基因，我们取5.0分以上的所有基因组成Dataset 1（3047个基因）。

3.1.2 胞内存活基因

在结核杆菌对抗宿主的免疫反应时，一个重要的机制就是分泌众多的胞外蛋白质抵抗宿主的防御机制或者干扰宿主的免疫系统。找到这些胞内存活必需基因或许可以为新药靶及疫苗的开发提供新的线索。因此我们以前文所述转座子突变技术的文献为基础，搜集每一篇文献中鉴定出来的结核杆菌胞内存活必需基因，取并集，一共得到760个基因（Dataset 2）。

Murphy 等人的研究显示结核杆菌中那些表达下调的基因往往与代谢减弱及滞留感染相关。而且，在感染阶段，结核杆菌的管家基因常常是组成型表达，而毒力相关基因或环境应答相关基因表现为诱导性表达 [6]。本研究的目标是鉴定参与宿主-病原菌相互作用的蛋白。基于此，我们认为文献鉴定出来的在感染时期表达上调且对结核杆菌胞内存活必需的基因符合本章的研究范畴。我们收集 Dataset 1 和 Dataset 2 的共同基因组成 List A（附录1，Table S7），一共包含580个基因。

3.1.3 胞外蛋白

具备和宿主相互作用的细菌胞外蛋白在维持结核杆菌在巨噬细胞内滞留和增殖方面十分关键 [64]。被巨噬细胞吞噬的灭活结核杆菌无法阻止吞噬体成熟的这一事实 [65]，强有力地证明了这些胞外蛋白在结核杆菌致病性中的作用。我们同时使用数据挖掘和生物信息学方法搜集了可信度较高的结核杆菌胞外蛋白数据

集，一共 908 个，命名为 Dataset 3。我们将 List 1 和 Dataset 3 取交集，得到结核杆菌胞内存活必需的胞外蛋白，即 List B（附录 1，Table S8），一共有 155 个基因。

3.1.4 临床菌株丢失基因

我们发现 Dataset 4 和 List B 之间没有共同的基因。这一结果符合我们预期结果，因为胞内存活所必需的基因也应该是结核杆菌临床菌株感染时必不可少的基因，因此不能被轻易丢失，否则该临床菌株就会立马被宿主清除掉而无法致病。

3.1.5 胞外生存必需基因

我们将两篇文献报道的胞外生存必需基因取并集，即为 Dataset 5（965 个）。我们剔除掉凡是 Dataset 5 和上一步骤基因集合中同时出现的基因，一共 32 个基因，余下基因集合进入下一步操作。

3.1.6 宿主或宿主肠道菌群的同源基因

与宿主或者宿主肠道菌群的蛋白没有相似性的结核杆菌蛋白可以作为理想的药物靶标 [57]。为了最小化药物与宿主或宿主肠道菌群的蛋白产生相互作用，我们将上一步骤中的结核杆菌蛋白与宿主或宿主肠道菌群的蛋白进行同源性比对 [55]，凡是与宿主或宿主肠道菌群的蛋白具有较高同源性的结核杆菌蛋白都被剔除。同源性比对分两步：首先将上一步骤的 123 个结核杆菌蛋白与 *H. sapiens*（宿主）进行 BLASTp 比对，将 e 值小于 0.005 且同源性大于 35% 的结核杆菌蛋白剔除 [57]；然后将余下的结核杆菌蛋白与每个宿主肠道细菌的所有蛋白质进行 BLASTp 比对，将 e 值小于 0.0001 的所有结核杆菌蛋白剔除。最后剩余的 54 个蛋白与宿主或宿主肠道菌群没有任何同源性，作为 List C（Table 2）。

表 2 本研究预测的 54 个候选蛋白。

Table 2. 54 selected proteins.

Category	Rv #	Gene	Length (aa)	Annotation
(4)	Rv0010c		141	Probable conserved membrane protein
	Rv0093c		282	Probable conserved membrane protein
	Rv0173	<i>mce1E</i>	390	Mce-family lipoprotein Mce1E
	Rv0175		213	Probable conserved Mce associated membrane protein
	Rv0179c	<i>lprO</i>	369	Possible lipoprotein LprO
	Rv0218		442	Probable conserved transmembrane protein
	Rv0426c		147	Possible transmembrane protein
	Rv0677c	<i>mmpS5</i>	142	Possible conserved membrane protein MmpS5
	Rv0954		303	Possible transmembrane protein
	Rv1016c	<i>lpqT</i>	226	Probable conserved lipoprotein LpqT

第 3 章 生物信息学预测结核分枝杆菌与宿主相互作用的关键胞外蛋白

	Rv1184c		359	Possible exported protein
	Rv1411c	<i>lprG</i>	236	Conserved lipoprotein LprG
	Rv1418	<i>lprH</i>	228	Probable lipoprotein LprH
	Rv1749c		185	Possible integral membrane protein
	Rv1974		125	Predicted to be an outer membrane protein
	Rv2046	<i>lppI</i>	218	Probable lipoprotein LppI
	Rv2091c		244	Probable membrane protein
	Rv2171	<i>LppM</i>	227	Probable conserved lipoprotein LppM
	Rv2301	<i>Cut2</i>	230	Probable cutinase Cut2
	Rv2330c	<i>lppP</i>	175	Probable lipoprotein LppP
	Rv2346c	<i>esxO</i>	94	Putative ESAT-6 like protein EsxO (ESAT-6 like protein 6)
	Rv2597		206	Predicted to be an outer membrane protein
	Rv2937	<i>drrB</i>	289	Daunorubicin-dim-transport integral membrane protein ABC transporter DrrB
	Rv2938	<i>drrC</i>	276	Probable daunorubicin-dim-transport integral membrane protein ABC transporter DrrC
	Rv2942	<i>mmpL7</i>	920	Conserved transmembrane transport protein MmpL7
	Rv2945c	<i>lppX</i>	233	Probable conserved lipoprotein LppX
	Rv3576	<i>lppH</i>	237	Possible conserved lipoprotein LppH
	Rv3723		254	Probable conserved transmembrane protein
	Rv1489		118	Conserved protein
	Rv3882c	<i>eccE1</i>	462	ESX conserved component EccE1. ESX-1 type VII secretion system protein.
(7)	Rv0177		184	Probable conserved Mce associated protein
	Rv0580c		163	Conserved protein
	Rv1978		282	Conserved protein
	Rv0360c		145	Conserved protein
	Rv1804c		108	Conserved protein
	Rv1924c		126	Conserved protein
	Rv2387		417	Conserved protein
	Rv2529		463	Conserved protein
(5)	Rv2396	<i>PE_PG</i> <i>RS41</i>	361	Conserved protein
	Rv2741	<i>PE_PG</i> <i>RS47</i>	525	Predicted to be an outer membrane protein (See Song et al., 2008)
	Rv3159c	<i>PPE53</i>	590	Predicted to be an outer membrane protein (See Song et al., 2008).

	Rv3872	<i>PE35</i>	99	PE family-related protein PE35
	Rv3873	<i>PPE68</i>	368	PPE family protein PPE6
(1)	Rv0169	<i>mce1A</i>	454	Mce-family protein Mce1A
	Rv0171	<i>mce1C</i>	515	Mce-family protein Mce1C
	Rv0172	<i>mce1D</i>	530	Mce-family protein Mce1D
	Rv0174	<i>mce1F</i>	515	Mce-family protein Mce1F
	Rv1242	<i>vapC33</i>	143	Possible toxin VapC33. Contains PIN domain.
	Rv3494c	<i>mce4F</i>	564	Mce-family protein Mce4F
(6)	Rv3033		182	Predicted to be an outer membrane protein
	Rv3369		144	Conserved protein
	Rv0464c		190	Conserved protein
	Rv2240c		196	Unknown protein
	Rv2728c		231	Conserved alanine rich protein

3.2 所选基因的功能分类

本研究所选结核杆菌蛋白的功能分类是基于 Tuberculist 网站 (<http://tuberculist.epfl.ch/index.html>) [51]。图 2 展示的是 54 个候选蛋白与结核杆菌所有 ORF 的功能分类分布图。本研究讨论的候选蛋白是基于以下六个标准：(i) 结核杆菌感染期间表达上调，(ii) 结核杆菌胞内生长所必需，(iii) 在临床菌株中保守，(iv) 结核杆菌胞外蛋白，(v) 非结核杆菌胞外生长必需，(vi) 在宿主和肠道菌群中无同源蛋白。与结核杆菌所有 ORF 的功能分类相比，我们所选 54 个候选蛋白的功能分类中属于“中间代谢和呼吸”(Intermediary metabolism and respiration) 和“保守蛋白”(Conserved hypothetical proteins) 的两类蛋白在全蛋白所占比例下降，而参与“PE/PPE”、“细胞壁和细胞过程”(Cell wall and cell processes) 和“毒力、解毒和适应”(Virulence, detoxification, adaptation) 的这三类蛋白在全蛋白中所占的比例升高。而与以上五类蛋白不同，在 54 个候选蛋白质中完全不包括参与“脂质代谢”(Lipid metabolism) 和“调控、插入和噬菌体序列及信号通路”(Regulatory proteins, insertion sequences and phages, information pathway) 的蛋白。

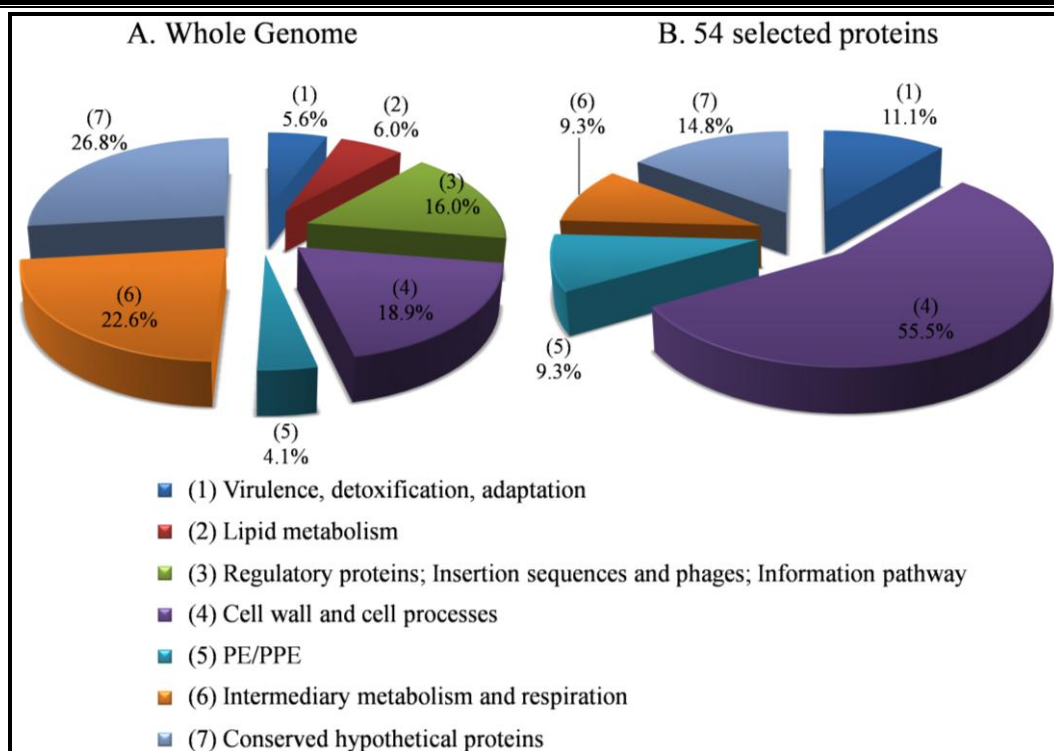


图 2. 本研究预测的 54 个基因与全基因组功能分布图。

Fig. 2. Distribution of Mtb genes according to functional categories. The percentage of genes in each of the functional categories is provided, as retrieved from Tuberculist website for the whole genome (A) [51], and calculated for this study 54 selected proteins (B).

3.2.1 参与“细胞壁及细胞过程”的蛋白质

在 54 个候选蛋白质中，参与“细胞壁和细胞过程”的蛋白有 30 个，占到了 55.5%。限于篇幅，本节重点讨论其中的两个亚类。

3.2.1.1 脂蛋白

文献报道脂蛋白可以直接或间接地参与结核杆菌和宿主之间的相互作用。生物信息学预测结核杆菌基因组中包含 48-99 个编码脂蛋白的基因 [66,67]，在本研究的 54 个候选蛋白中占到 9 个。

LppX (Rv2945)在被注释为一个大小为 22 kDa 的分枝杆菌抗原蛋白，在能合成 phthiocerol dimycocerosates (PDIM)的分枝杆菌属如结核杆菌或者 *M. leprae* 等中有同源基因，而在 PDIM 缺失的分枝杆菌属如耻垢分枝杆菌或 *M. avium* 等中则没有同源基因 [66,68]。

有研究显示该蛋白既能定位于分枝杆菌细胞表面，又能释放到培养液上清中，但在细胞质中无法检测到该蛋白的存在 [69]。*lppX* 基因定位于参与 PDIM 代谢的基因群中间，其编码产物是结核杆菌的 PDIM 转运到外膜所必需的 [70]。*lppX* 基因突变的结核杆菌在感染小鼠模型时毒力减弱 [26,71]。文献数据[71]显示，该结

核杆菌突变株的毒力减弱和该突变株无法将 PDIM 释放到培养基滤液中有关, 而和 PDIM 合成的减少没有关系。

LprG (Rv1411c)是一个在细菌细胞表面表达的功能保守脂蛋白, 是 *M. bovis* 和结核杆菌重要的抗原蛋白 [72,73]。在结核杆菌感染小鼠的同时, 将结核杆菌的 LprG 刺激小鼠, 后者能诱导出强有力的 Th1 型免疫应答, 这能破坏宿主的保护作用并加重感染 [73,74]; 这些结果显示 LprG 通过诱导宿主免疫应答的进一步抑制作用在结核杆菌感染中扮演着重要的角色 [70]。将结核杆菌的 *lprG* 或者其操纵子 (*lprG* 和 *Rv1410c* 位于同一操纵子中) 敲除会导致其在小鼠或巨噬细胞中的胞内存活能力降低 [26,75,76]。最近有研究显示, *lprG* 的突变导致结核杆菌在进入巨噬细胞和抑制吞噬体-溶酶体融合的效率降低, 在巨噬细胞内的存活能力受限, 并能在小鼠肺脏内被适应性免疫杀灭 [77]。目前对于 LprG 在结核杆菌毒力中发挥如此重要的机制大体有两种解释。我们知道, LAM 是结核杆菌的一个关键效应分子 [78,79,80,81,82]。体外实验证实, 纯化的 LAM 能够结合巨噬细胞的甘露糖受体, 从而有利于结核杆菌进入巨噬细胞内, 抑制吞噬体-溶酶体融合并调控宿主先天免疫应答, 最终促使结核杆菌胞内存活及滞留感染 [83,84,85,86]。而 Drage 及其同事发现 LprG 通过一个疏水口袋和三酰化的糖脂结合 [87], Gaur 等人进一步证实该脂蛋白对于 LAM 正常表达于结核杆菌表面是必需的 [77]。基于此, 我们可以认为 LprG 是通过影响 LAM 的表达来发挥如此重要的作用。此外, 有研究显示 LprG 可以作为人类 Toll 样受体 2 (TLR2) [87,88]和 dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) 的受体 [89]。TLR2 是宿主先天免疫系统识别结核杆菌的一个重要分子 [90,91], 而 C 类凝集素受体 DC-SIGN 在调节分枝杆菌属如结核杆菌和 *M. bovis* BCG 等粘附并存活于人类树突细胞和巨噬细胞中起着重要作用。因此, LprG 也可能通过参与宿主-结核杆菌之间的相互作用来发挥其毒力作用。进一步的研究重点应该是揭示 LprG 与 TLR2 和 DC-SIGN 结合后宿主的具体应答机制。

3.2.1.2 ESX

结核杆菌基因组包含 5 个七型分泌系统 (type seven secretion systems, T7SSs), 分别由独立的基因簇 *esx-1* 至 *esx-5* 编码 [92,93]。有研究显示 ESX-1 和 ESX-5 对结核杆菌和 *M. marinum* 的致病性有贡献 [94,95,96]。*esx-1* 基因簇是五个七型分泌系统中研究的最透彻的, 定位于致病性分枝杆菌基因组上的 RD1 (region of difference 1) 区域, 在疫苗菌株 BCG 的基因组上缺失。ESAT-6 (the 6-kD early secreted antigenic target) 是 T7SSs 中第一个被鉴定出来的底物蛋白质 [97]。ESAT-6 及其搭档蛋白 CFP-10 (the 10-kD culture filtrate protein) 形成 1:1 的蛋白复合体由 ESX-1 系统分泌到胞外参与 MTBC 的毒力作用 [98,99]。研究结核杆菌和 *M.*

marinum 时发现 ESX-1 的分泌底物或结构组成成分对于分枝杆菌胞内生存 [100]、抑制吞噬体成熟 [101,102]、促进宿主细胞裂解及分枝杆菌在宿主细胞间的播散 [103,104]、细菌释放入宿主细胞质 [105]及启动肉芽肿形成 [106]等都是必需的。ESX-5 参与许多 PPE 和 PE_PGRS 蛋白质的分泌过程 [107]，且结核杆菌的 *esx-5* 突变菌株无法操控巨噬细胞细胞因子应答 [95,108]。最近，Abdallah 等人推测 ESX-1 介导分枝杆菌进入宿主细胞质中，接着 ESX-5 分泌系统分泌大量效应蛋白进入宿主细胞质中触发宿主细胞毒性作用及炎症反应的激活 [96]。这些发现强有力地证明 ESX-1 和 ESX-5 分泌的底物能够到达宿主细胞质中。此外，Pathak 等人发现 ESX-1 的底物 ESAT-6 通过直接和 TLR2 结合来抑制 NF- κ B 信号通路的激活 [109]。本研究鉴定出的 54 个候选靶标中有两个属于 ESX 组分 (Rv2346c 和 Rv3882c)。有趣的是，Rv2346c (EsxO)是一个类似于 ESAT-6 的功能保守蛋白，因此其很可能在宿主-病原菌相互作用中起着重要作用。

3.2.1.3 其它蛋白

rv2301 (*cut2* 或 *culp2*)编码产物属于丝氨酸酯酶家族中的一员，有研究显示 Rv2301 蛋白存在于结核杆菌培养液滤液 [110]和细菌表面 [111]。在感染结核杆菌的小鼠及结核病病人中，Rv2301 能够诱导 IFN- γ 的高表达 [112]，且能为结核病病人提供保护性免疫 [112,113]。有研究显示 Rv2301 在 BCG 中的同源基因能够抑制吞噬体的酸化作用 [30]。Ocampo 等人报道源自 Rv2301 的某些肽段参与结核杆菌入侵人类上皮细胞及巨噬细胞 [111]。这些结果暗示 Rv2301 参与结核杆菌的致病性有可能是通过参与宿主-病原菌相互作用来实现的。

Rv3723 可能是一个跨膜蛋白 [114]，参与结核杆菌在小鼠肺中的持留感染 [115]。该蛋白对于结核杆菌的毒力有贡献，因为缺失掉该基因后结核杆菌在巨噬细胞和小鼠体内生长都表现出毒力降低 [26,29]。此外，Rv3723 在 *M. avium* 中的同源基因能够增强耻垢分枝杆菌感染肠道上皮细胞的能力 [116]。

Rv1489 是一个功能未知的保守蛋白，其序列与 *M. paratuberculosis* 的一个参与宿主入侵的蛋白同源性较高 (<http://tuberculist.epfl.ch/index.html>)。在人造小鼠肉芽肿模型及厌氧环境下的持留状态时，Rv1489 的表达上调 [117] [17]。而且结核杆菌的 *rv1489* 突变株在感染非人灵长类动物时毒力减弱 [34]。以上结果暗示 Rv1489 在结核杆菌的致病性中起着重要作用。

3.2.2 PE/PPE

越来越多的证据表明分枝杆菌属特有的 PE/PPE 家族蛋白质是重要的效应分子，尽管该家族成员的具体功能还有待进一步研究 [70,118,119,120,121]。绝大多数 PE/PPE 蛋白都定位于细菌细胞表面或胞外，广泛地存在于致病性分枝杆菌中

[108,122]。PE/PPE 家族成员占到结核杆菌基因组编码产物的 4.1% [51]，在本研究的 54 个候选蛋白中更是占到了 9.3%。

有研究证明 PE35(Rv3872)是分泌蛋白，而 PPE68(Rv3873)是膜整合蛋白 [42]。最近有研究显示 PE35-PPE68 这对基因在结核杆菌中是共转录的，且各自的基因产物能够相互作用 [123]。作者进一步发现 PE35 和 PPE68 能够协同作用，如诱导 THP-1 巨噬细胞中 IL-10 和 MCP-1 的分泌同时抑制 IL-12p70 的表达水平 [123]。与 TraSH 分析结果 [26]不同的是，分别将 PE35 或 PPE68 或 PE35-PPE68 表达于耻垢分枝杆菌中不能增强后者巨噬细胞内的存活能力 [123]。这些结果提示我们耻垢分枝杆菌并不是研究这两个基因的理想模式生物，直接利用结核杆菌的突变菌株对于解析 PE35 和 PPE68 在感染时的功能是必需的。

PPE53 蛋白由 *rv3159c* 基因编码，预测是一个功能未知的外膜蛋白 [40]。PPE53 在结核杆菌感染非人灵长类动物模型时有重要作用 [34]。有意思的是，PPE53 在 *M. marinum* 中的同源基因也是一个重要的效应分子，它对 *M. marinum* 的巨噬细胞内存活及宿主-病原菌相互作用起着调控作用 [124,125]。基于 PPE53 在感染时的作用，对其进一步的研究十分有必要。

3.2.3 Mce

结核杆菌基因组中包含 4 个 *mce* 操纵子 (*mce1-4*)，各个操纵子内基因的排列大体一致 [114]。每个 *mce* 操纵子包含两个 *yrbE* 基因 (A 和 B) 和六个 *mce* 基因 (A-F) [126]。Mce 家族成员一般定位于细菌细胞外，绝大多数成员的功能未知。结核杆菌的 *mce2*、*mce3* 或 *mce4* 突变菌株在感染小鼠动物模型时表现出毒力降低 [127,128,129]。然而 *mce1* 在结核杆菌的致病性中的作用仍然存在争议。转座子诱变研究显示 *mce1* 基因是结核杆菌在巨噬细胞和小鼠模型中生存所必需的 [26,29,30]。当利用气管内接种结核杆菌时，*mce1* 突变株表现出毒力减弱的表型 [127]；而当利用静脉注射或腹腔注射接种时，*mce1* 突变株却表现出毒力增强的表型 [127,130]。越来越多的证据表明 Mce1 家族成员对于结核杆菌的毒力贡献依赖于其作为脂质转运体这一功能 [131,132,133,134]。不过本研究的结果支持 Mce1 家族成员参与宿主-病原菌相互作用。表达 *mce1A* 基因 (Mce1 家族成员之一) 的重组大肠杆菌及包被该蛋白的乳胶微粒都能够侵入 HeLa 细胞 [135,136]，且和野生型大肠杆菌相比，重组大肠杆菌在细胞内的存活时间更长 [135]，这表明 Mce1A 在结核杆菌入侵宿主及胞内存活中起着重要作用。此外，有研究显示 Mce1 的一个 72 个氨基酸片段参与细菌对 HeLa 细胞的内化作用 [130]。而且破坏掉 BCG 菌株的 *mce1* 基因导致其侵染 HeLa 细胞的能力降低 [137]。最近 Stavrum 等人发现 Mce1 蛋白能够调控小鼠巨噬细胞内的转录过程及炎症应答 [138]。考虑到 Mce1 蛋白主

要是定位于细菌细胞表面 [40,134,136], 并综合以上结果, 我们有理由相信 Mce1 极有可能在宿主-病原菌相互作用时发挥作用。不过首要任务是鉴定出 Mce1 在宿主细胞内的相互作用蛋白。

3.2.4 功能未知的保守蛋白质

在结核杆菌全基因组中, 有接近 26.8% 的基因编码产物功能未知, 这些功能未知的蛋白被归类为“功能未知的保守蛋白质” [51]。本研究的 54 个候选蛋白清单中, “功能未知的保守蛋白质”所占的比例减少到了 14.8%, 即有 8 个蛋白的功能未知。这 54 个候选蛋白中有些蛋白的功能被文献[139]重新赋予了功能, 因此没有归到“功能未知的保守蛋白质”这一类。

Rv1978 是一个功能未知的膜蛋白, 与一些保守蛋白和甲基转移酶有同源性 [38,42,140,141]。尽管其功能未知, 但小鼠巨噬细胞模型中的 TraSH 分析证明了 Rv1978 对于结核杆菌的毒力有贡献 [29]。此外, 结核杆菌的 *rv1978* 转座子插入突变株在非人灵长类动物模型的肺中生存能力降低 [34]。和活动性 TB 结核病人相比, Rv1978 能够在潜伏感染 TB 患者中诱导更高水平的 IFN- γ 反应, 这暗示该基因很大程度上和 TB 的潜伏感染相关 [142]。

Rv2387 是一个膜相关蛋白质 [42], 预测包含十个跨膜结构域 [51]。TraSH 分析发现功能未知的 Rv2387 蛋白在结核杆菌感染小鼠模型时是必须的 [26]。而且, 结核杆菌的 *rv2387* 突变株被证明在感染非人灵长类动物模型时毒力减弱 [34]。ChIP-chip 分析显示 SigC 能结合到 *mbtI-rv2387* 基因簇的上游区域 [143], 不过 SigC 能否直接控制 *rv2387* 的表达还需进一步实验验证。由于 SigC 调控大量毒力相关基因如 *hspX*, *senX3* 和 *mtrA* 等的表达 [144], 因此 Rv2387 可以作为一个毒力因子进行深入研究。

3.3 与其它生物信息学结果比较

目前已经有几篇文章报道利用生物信息学方法来寻找抗结核药物靶点 [54,63,145,146,147]。因此, 我们将本研究获得的 54 个候选蛋白清单与这几篇文章鉴定出来的候选蛋白清单做了一个比较, 详细比较过程见 Table S9-S13, 结果见 Table 3。和这几篇文献相比, 本研究具有以下特性: (i) 对大量相关的文献数据库进行了严格的聚类分析和数据挖掘, 进行了更加复杂的系统生物学分析; (ii) 本研究的重点是鉴定参与宿主-病原菌相互作用的结核杆菌胞外蛋白作为药靶的可能性, 这不同于以上研究将焦点放在结核杆菌的胞内蛋白; (iii) 本研究剔除了结核杆菌胞外生存所必须的基因, 因为这样的基因一般参与营养摄取或结构必须而不是参与结核杆菌-宿主的相互作用。此外, 我们也(iv)剔除了所有和宿主或宿主肠道

菌群蛋白质组同源的结核杆菌蛋白，这能(v)最大限度地减少后期开发药物时所遇到的宿主或宿主肠道副作用的发生。

由比较结果可知，本研究的候选蛋白（List C）中有 12 蛋白被 Hasan 等人预测到，有三个和 targetTB 的 H-list 清单中一样，分别有一个蛋白被 Anishetty 等人、Kinnings 等人及 Mulder 等人预测到。综合可知，本研究的 List C 中一共有 15 个蛋白被其它生物信息学方法预测为药物靶点（表 3）。而我们的结果显示其它候选蛋白可能作为新的药物靶点对药物开发研究提供一些依据。

表 3 本研究预测的药物靶点和其它生物信息学结果比较表。

Table 3. Targets identified in this study compared with earlier computational studies.

	List A (580 genes)	List B (155 genes)	List C (54 genes)
[54], 180 genes	22	5	1
[145] Metabolic list, 500 genes	54	15	3
Persistence list, 500 genes	90	21	6
Actinobacteria specific list, 500 genes	69	19	3
[63], 451 genes (H-list)	64	21	3
[146], 12 genes	1	1	1
[147], 67 genes	8	2	1

4 结论

本研究以 DNA 芯片及全基因组转座子诱变等文献数据为基础，利用聚类分析及数据挖掘方法鉴定出 54 个结核杆菌候选药物靶点。这些蛋白质符合以下特征：在结核杆菌感染过程中上调表达，结核杆菌胞内存活而非胞外存活所必需，在临床菌株中保守存在，定位于细菌胞外，与宿主及宿主肠道菌群蛋白质组没有同源物。我们期望这 54 个候选药物靶点能够促进新的抗结核药物的开发。

参考文献

1. Ehrt S, Schnappinger D (2009) Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. *Cell Microbiol* 11: 1170-1178.
2. Li W, Xie J (2011) Role of mycobacteria effectors in phagosome maturation blockage and new drug targets discovery. *J Cell Biochem* 112: 2688-2693.
3. Mazandu GK, Mulder NJ (2011) Generation and Analysis of Large-Scale Data-Driven *Mycobacterium tuberculosis* Functional Networks for Drug Target Identification. *Adv Bioinformatics* 2011: 801478.
4. Asif SM, Asad A, Faizan A, Anjali MS, Arvind A, et al. (2009) Dataset of potential targets for *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv through comparative genome analysis. *Bioinformation* 4:

- 245-248.
5. Zhou H, Jin J, Wong L (2013) Progress in computational studies of host-pathogen interactions. *J Bioinform Comput Biol* 11: 1230001.
 6. Murphy DJ, Brown JR (2007) Identification of gene targets against dormant phase *Mycobacterium tuberculosis* infections. *BMC Infect Dis* 7: 84.
 7. Monahan IM, Betts J, Banerjee DK, Butcher PD (2001) Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages. *Microbiology* 147: 459-471.
 8. Dubnau E, Fontan P, Manganelli R, Soares-Appel S, Smith I (2002) *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages. *Infect Immun* 70: 2787-2795.
 9. Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, et al. (2003) Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: Insights into the phagosomal environment. *Journal of Experimental Medicine* 198: 693-704.
 10. Cappelli G, Volpe E, Grassi M, Liseo B, Colizzi V, et al. (2006) Profiling of *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during human macrophage infection: upregulation of the alternative sigma factor G, a group of transcriptional regulators, and proteins with unknown function. *Res Microbiol* 157: 445-455.
 11. Mattow J, Siejak F, Hagens K, Becher D, Albrecht D, et al. (2006) Proteins unique to intraphagosomally grown *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 6: 2485-2494.
 12. Rohde KH, Abramovitch RB, Russell DG (2007) *Mycobacterium tuberculosis* invasion of macrophages: linking bacterial gene expression to environmental cues. *Cell Host Microbe* 2: 352-364.
 13. Fontan P, Aris V, Ghanny S, Soteropoulos P, Smith I (2008) Global transcriptional profile of *Mycobacterium tuberculosis* during THP-1 human macrophage infection. *Infect Immun* 76: 717-725.
 14. Homolka S, Niemann S, Russell DG, Rohde KH (2010) Functional Genetic Diversity among *Mycobacterium tuberculosis* Complex Clinical Isolates: Delineation of Conserved Core and Lineage-Specific Transcriptomes during Intracellular Survival. *PLoS Pathogens* 6: e1000988.
 15. Singhal N, Sharma P, Kumar M, Joshi B, Bisht D (2012) Analysis of intracellular expressed proteins of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Proteome Sci* 10: 14.
 16. Rohde KH, Veiga DF, Caldwell S, Balazsi G, Russell DG (2012) Linking the transcriptional profiles and the physiological states of *Mycobacterium tuberculosis* during an extended intracellular infection. *PLoS Pathog* 8: e1002769.
 17. Karakousis PC (2004) Dormancy Phenotype Displayed by Extracellular *Mycobacterium tuberculosis* within Artificial Granulomas in Mice. *Journal of Experimental Medicine* 200: 647-657.
 18. Talaat AM, Lyons R, Howard ST, Johnston SA (2004) The temporal expression profile of *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 4602-4607.
 19. Dubnau E, Chan J, Mohan VP, Smith I (2005) Responses of *mycobacterium tuberculosis* to

- growth in the mouse lung. *Infect Immun* 73: 3754-3757.
20. Talaat AM, Ward SK, Wu CW, Rondon E, Tavano C, et al. (2007) Mycobacterial bacilli are metabolically active during chronic tuberculosis in murine lungs: insights from genome-wide transcriptional profiling. *J Bacteriol* 189: 4265-4274.
 21. Kruh NA, Troudt J, Izzo A, Prenni J, Dobos KM (2010) Portrait of a pathogen: the *Mycobacterium tuberculosis* proteome in vivo. *PLoS One* 5: e13938.
 22. Fenhalls G, Stevens L, Moses L, Bezuidenhout J, Betts JC, et al. (2002) In situ detection of *Mycobacterium tuberculosis* transcripts in human lung granulomas reveals differential gene expression in necrotic lesions. *Infect Immun* 70: 6330-6338.
 23. Rachman H, Strong M, Ulrichs T, Grode L, Schuchhardt J, et al. (2006) Unique transcriptome signature of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary tuberculosis. *Infect Immun* 74: 1233-1242.
 24. Kumar M, Khan FG, Sharma S, Kumar R, Faujdar J, et al. (2011) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* genes preferentially expressed during human infection. *Microbial Pathogenesis* 50: 31-38.
 25. Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C (1999) Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol* 34: 257-267.
 26. Sasseti CM, Rubin EJ (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12989-12994.
 27. Pethe K, Swenson DL, Alonso S, Anderson J, Wang C, et al. (2004) Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective in the arrest of phagosome maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 13642-13647.
 28. Lamichhane G, Tyagi S, Bishai WR (2005) Designer arrays for defined mutant analysis to detect genes essential for survival of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lungs. *Infect Immun* 73: 2533-2540.
 29. Rengarajan J, Bloom BR, Rubin EJ (2005) Genome-wide requirements for *Mycobacterium tuberculosis* adaptation and survival in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 8327-8332.
 30. Stewart GR, Patel J, Robertson BD, Rae A, Young DB (2005) Mycobacterial mutants with defective control of phagosomal acidification. *PLoS Pathog* 1: 269-278.
 31. Jain SK, Hernandez-Abanto SM, Cheng QJ, Singh P, Ly LH, et al. (2007) Accelerated detection of *Mycobacterium tuberculosis* genes essential for bacterial survival in guinea pigs, compared with mice. *Journal of Infectious Diseases* 195: 1634-1642.
 32. Rosas-Magallanes V, Stadthagen-Gomez G, Rauzier J, Barreiro LB, Tailleux L, et al. (2007) Signature-tagged transposon mutagenesis identifies novel *Mycobacterium tuberculosis* genes involved in the parasitism of human macrophages. *Infect Immun* 75: 504-507.
 33. Be NA, Lamichhane G, Grosset J, Tyagi S, Cheng QJ, et al. (2008) Murine model to study the

- invasion and survival of *Mycobacterium tuberculosis* in the central nervous system. J Infect Dis 198: 1520-1528.
34. Dutta NK, Mehra S, Didier PJ, Roy CJ, Doyle LA, et al. (2010) Genetic requirements for the survival of tubercle bacilli in primates. J Infect Dis 201: 1743-1752.
 35. Tsolaki AG, Hirsh AE, DeRiemer K, Enciso JA, Wong MZ, et al. (2004) Functional and evolutionary genomics of *Mycobacterium tuberculosis*: insights from genomic deletions in 100 strains. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 4865-4870.
 36. Braunstein M, Griffin TJ, Kriakov JI, Friedman ST, Grindley NDF, et al. (2000) Identification of genes encoding exported *Mycobacterium tuberculosis* proteins using a Tn552 'phoA' in vitro transposition system. Journal of Bacteriology 182: 2732-2740.
 37. Gomez M, Johnson S, Gennaro ML (2000) Identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis* by a bioinformatic approach. Infect Immun 68: 2323-2327.
 38. Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, et al. (2005) *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. Mol Biol Cell 16: 396-404.
 39. Malen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG (2007) Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Proteomics 7: 1702-1718.
 40. Song H, Sandie R, Wang Y, Andrade-Navarro MA, Niederweis M (2008) Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb) 88: 526-544.
 41. Malen H, Pathak S, Softeland T, de Souza GA, Wiker HG (2010) Definition of novel cell envelope associated proteins in Triton X-114 extracts of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. BMC Microbiol 10: 132.
 42. de Souza GA, Leversen NA, Malen H, Wiker HG (2011) Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. J Proteomics 75: 502-510.
 43. Sassetti CM, Boyd DH, Rubin EJ (2003) Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol 48: 77-84.
 44. Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, Ioerger TR, Akerley BJ, et al. (2011) High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism. PLoS Pathog 7: e1002251.
 45. Smith I (2003) *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 16: 463-496.
 46. Voskuil MI, Bartek IL, Visconti K, Schoolnik GK (2011) The response of *mycobacterium tuberculosis* to reactive oxygen and nitrogen species. Front Microbiol 2: 105.
 47. Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. Nat Rev Microbiol 7: 355-366.
 48. Li W, He J, Xie L, Chen T, Xie J (2013) Comparative Genomic Insights Into the Biosynthesis and Regulation of Mycobacterial Siderophores. Cell Physiol Biochem 31: 1-13.
 49. Ligon LS, Hayden JD, Braunstein M (2012) The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis*

- protein export. *Tuberculosis* (Edinb) 92: 121-132.
50. Feltcher ME, Sullivan JT, Braunstein M (2010) Protein export systems of *Mycobacterium tuberculosis*: novel targets for drug development? *Future Microbiol* 5: 1581-1597.
 51. Lew JM, Kapopoulou A, Jones LM, Cole ST (2011) TubercuList--10 years after. *Tuberculosis* (Edinb) 91: 1-7.
 52. Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2011) SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat Methods* 8: 785-786.
 53. Rose RW, Bruser T, Kissinger JC, Pohlschroder M (2002) Adaptation of protein secretion to extremely high-salt conditions by extensive use of the twin-arginine translocation pathway. *Mol Microbiol* 45: 943-950.
 54. Anishetty S, Pulimi M, Pennathur G (2005) Potential drug targets in *Mycobacterium tuberculosis* through metabolic pathway analysis. *Computational Biology and Chemistry* 29: 368-378.
 55. Sarkar M, Maganti L, Ghoshal N, Dutta C (2012) In silico quest for putative drug targets in *Helicobacter pylori* HPAG1: molecular modeling of candidate enzymes from lipopolysaccharide biosynthesis pathway. *J Mol Model* 18: 1855-1866.
 56. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, et al. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402.
 57. Carlow CK, Butt AM, Nasrullah I, Tahir S, Tong Y (2012) Comparative Genomics Analysis of *Mycobacterium ulcerans* for the Identification of Putative Essential Genes and Therapeutic Candidates. *PLoS One* 7: e43080.
 58. Fujimura KE, Slusher NA, Cabana MD, Lynch SV (2010) Role of the gut microbiota in defining human health. *Expert Rev Anti Infect Ther* 8: 435-454.
 59. Shanmugham B, Pan A (2013) Identification and characterization of potential therapeutic candidates in emerging human pathogen *Mycobacterium abscessus*: a novel hierarchical in silico approach. *PLoS One* 8: e59126.
 60. Levy J (2000) The effects of antibiotic use on gastrointestinal function. *American Journal of Gastroenterology* 95: S8-S10.
 61. Nicholson JK, Wilson ID (2003) Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat Rev Drug Discov* 2: 668-676.
 62. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID (2005) Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Microbiol* 3: 431-438.
 63. Raman K, Yeturu K, Chandra N (2008) targetTB: a target identification pipeline for *Mycobacterium tuberculosis* through an interactome, reactome and genome-scale structural analysis. *BMC Syst Biol* 2: 109.
 64. Scherr N, Jayachandran R, Mueller P, Pieters J (2009) Interference of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophage responses. *Indian J Exp Biol* 47: 401-406.
 65. Beatty WL, Russell DG (2000) Identification of mycobacterial surface proteins released into

- subcellular compartments of infected macrophages. *Infect Immun* 68: 6997-7002.
66. Rezwan M, Grau T, Tschumi A, Sander P (2007) Lipoprotein synthesis in mycobacteria. *Microbiology* 153: 652-658.
67. Sutcliffe IC, Harrington DJ (2004) Lipoproteins of *Mycobacterium tuberculosis*: an abundant and functionally diverse class of cell envelope components. *FEMS Microbiol Rev* 28: 645-659.
68. Oftung F, Wiker HG, Deggerdal A, Mustafa AS (1997) A novel mycobacterial antigen relevant to cellular immunity belongs to a family of secreted lipoproteins. *Scandinavian Journal of Immunology* 46: 445-451.
69. Lefevre P, Denis O, De Wit L, Tanghe A, Vandenbussche P, et al. (2000) Cloning of the gene encoding a 22-kilodalton cell surface antigen of *Mycobacterium bovis* BCG and analysis of its potential for DNA vaccination against tuberculosis. *Infection and Immunity* 68: 1040-1047.
70. Forrellad MA, Klepp LI, Gioffre A, Sabio y Garcia J, Morbidoni HR, et al. (2013) Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* 4: 3-66.
71. Sulzenbacher G, Canaan S, Bordat Y, Neyrolles O, Stadthagen G, et al. (2006) LppX is a lipoprotein required for the translocation of phthiocerol dimycocerosates to the surface of *Mycobacterium tuberculosis*. *Embo Journal* 25: 1436-1444.
72. Bigi F, Espitia C, Alito A, Zumarraga M, Romano MI, et al. (1997) A novel 27 kDa lipoprotein antigen from *Mycobacterium bovis*. *Microbiology* 143 (Pt 11): 3599-3605.
73. Hovav AH, Mullerad J, Davidovitch L, Fishman Y, Bigi F, et al. (2003) The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection. *Infect Immun* 71: 3146-3154.
74. Hovav AH, Mullerad J, Maly A, Davidovitch L, Fishman Y, et al. (2006) Aggravated infection in mice co-administered with *Mycobacterium tuberculosis* and the 27-kDa lipoprotein. *Microbes Infect* 8: 1750-1757.
75. Bianco MV, Blanco FC, Forrellad MA, Aguilar D, Campos E, et al. (2011) Knockout mutation of p27-p55 operon severely reduces replication of *Mycobacterium bovis* in a macrophagic cell line and survival in a mouse model of infection. *Virulence* 2: 233-237.
76. Bigi F, Gioffre A, Klepp L, Santangelo MP, Alito A, et al. (2004) The knockout of the lprG-Rv1410 operon produces strong attenuation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes Infect* 6: 182-187.
77. Gaur RL, Ren K, Blumenthal A, Bhamidi S, Gibbs S, et al. (2014) LprG-Mediated Surface Expression of Lipoarabinomannan Is Essential for Virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Pathog* 10: e1004376.
78. Sani M, Houben EN, Geurtsen J, Pierson J, de Punder K, et al. (2010) Direct Visualization by Cryo-EM of the Mycobacterial Capsular Layer: A Labile Structure Containing ESX-1-Secreted Proteins. *PLoS Pathog* 6: e1000794.
79. Mishra AK, Driessen NN, Appelmelk BJ, Besra GS (2011) Lipoarabinomannan and related

- glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. *FEMS Microbiol Rev* 35: 1126-1157.
80. Briken V, Porcelli SA, Besra GS, Kremer L (2004) Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol Microbiol* 53: 391-403.
 81. Hunter SW, Brennan PJ (1990) Evidence for the presence of a phosphatidylinositol anchor on the lipoarabinomannan and lipomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 265: 9272-9279.
 82. Strohmeier GR, Fenton MJ (1999) Roles of lipoarabinomannan in the pathogenesis of tuberculosis. *Microbes Infect* 1: 709-717.
 83. Chua J, Vergne I, Master S, Deretic V (2004) A tale of two lipids: *Mycobacterium tuberculosis* phagosome maturation arrest. *Curr Opin Microbiol* 7: 71-77.
 84. Hmama Z (2004) Quantitative analysis of phagolysosome fusion in intact cells: inhibition by mycobacterial lipoarabinomannan and rescue by an 1,25-dihydroxyvitamin D3-phosphoinositide 3-kinase pathway. *Journal of Cell Science* 117: 2131-2140.
 85. Kang PB, Azad AK, Torrelles JB, Kaufman TM, Beharka A, et al. (2005) The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis. *Journal of Experimental Medicine* 202: 987-999.
 86. Villeneuve C, Gilleron M, Maridonneau-Parini I, Daffe M, Astarie-Dequeker C, et al. (2005) Mycobacteria use their surface-exposed glycolipids to infect human macrophages through a receptor-dependent process. *Journal of Lipid Research* 46: 475-483.
 87. Drage MG, Tsai HC, Pecora ND, Cheng TY, Arida AR, et al. (2010) *Mycobacterium tuberculosis* lipoprotein LprG (Rv1411c) binds triacylated glycolipid agonists of Toll-like receptor 2. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1088-1095.
 88. Gehring AJ, Dobos KM, Belisle OT, Harding CV, Boom WH (2004) *Mycobacterium tuberculosis* LprG (Rv1411c): A novel TLR-2 ligand that inhibits human macrophage class II MHC antigen processing. *Journal of Immunology* 173: 2660-2668.
 89. Carroll MV, Sim RB, Bigi F, Jakel A, Antrobus R, et al. (2010) Identification of four novel DC-SIGN ligands on *Mycobacterium bovis* BCG. *Protein Cell* 1: 859-870.
 90. Bhatt K, Salgame P (2007) Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Immunol* 27: 347-362.
 91. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, et al. (1999) Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science* 285: 732-736.
 92. Abdallah AM, Gey van Pittius NC, Champion PA, Cox J, Luirink J, et al. (2007) Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* 5: 883-891.
 93. Bitter W, Houben EN, Bottai D, Brodin P, Brown EJ, et al. (2009) Systematic genetic nomenclature for type VII secretion systems. *PLoS Pathog* 5: e1000507.

94. Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST (2002) Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 46: 709-717.
95. Abdallah AM, Savage ND, van Zon M, Wilson L, Vandenbroucke-Grauls CM, et al. (2008) The ESX-5 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates the macrophage response. *J Immunol* 181: 7166-7175.
96. Abdallah AM, Bestebroer J, Savage ND, de Punder K, van Zon M, et al. (2011) Mycobacterial Secretion Systems ESX-1 and ESX-5 Play Distinct Roles in Host Cell Death and Inflammasome Activation. *J Immunol*.
97. Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB (1995) Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 63: 1710-1717.
98. Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B (1998) A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiology* 144 (Pt 11): 3195-3203.
99. Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, Gordon SV, Hewinson RG, et al. (2002) Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10, and the ESAT-6*CFP-10 complex. Implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem* 277: 21598-21603.
100. Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, et al. (2003) Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette-Guerin attenuation. *J Infect Dis* 187: 117-123.
101. Tan T, Lee WL, Alexander DC, Grinstein S, Liu J (2006) The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol* 8: 1417-1429.
102. MacGurn JA, Cox JS (2007) A genetic screen for *Mycobacterium tuberculosis* mutants defective for phagosome maturation arrest identifies components of the ESX-1 secretion system. *Infect Immun* 75: 2668-2678.
103. Gao LY, Guo S, McLaughlin B, Morisaki H, Engel JN, et al. (2004) A mycobacterial virulence gene cluster extending RD1 is required for cytolysis, bacterial spreading and ESAT-6 secretion. *Mol Microbiol* 53: 1677-1693.
104. Hsu T, Hingley-Wilson SM, Chen B, Chen M, Dai AZ, et al. (2003) The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 12420-12425.
105. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluittsma D, van Zon M, et al. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129: 1287-1298.

106. Volkman HE, Clay H, Beery D, Chang JCW, Sherman DR, et al. (2004) Tuberculous granuloma formation is enhanced by a *Mycobacterium* virulence determinant. *Plos Biology* 2: 1946-1956.
107. Neyrolles O, Cascioferro A, Daleke MH, Ventura M, Donà V, et al. (2011) Functional Dissection of the PE Domain Responsible for Translocation of PE_PGRS33 across the *Mycobacterial* Cell Wall. *PLoS One* 6: e27713.
108. Abdallah AM, Verboom T, Weerdenburg EM, Gey van Pittius NC, Mahasha PW, et al. (2009) PPE and PE_PGRS proteins of *Mycobacterium marinum* are transported via the type VII secretion system ESX-5. *Mol Microbiol* 73: 329-340.
109. Pathak SK, Basu S, Basu KK, Banerjee A, Pathak S, et al. (2007) Direct extracellular interaction between the early secreted antigen ESAT-6 of *Mycobacterium tuberculosis* and TLR2 inhibits TLR signaling in macrophages. *Nature Immunology* 8: 610-618.
110. Weldingh K, Rosenkrands I, Jacobsen S, Rasmussen PB, Elhay MJ, et al. (1998) Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. *Infect Immun* 66: 3492-3500.
111. Ocampo M, Rodriguez DM, Curtidor H, Vanegas M, Patarroyo MA, et al. (2012) Peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis* Rv2301 protein are involved in invasion to human epithelial cells and macrophages. *Amino Acids* 42: 2067-2077.
112. West NP, Wozniak TM, Valenzuela J, Feng CG, Sher A, et al. (2008) Immunological diversity within a family of cutinase-like proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 26: 3853-3859.
113. Sable SB, Verma I, Khuller GK (2005) Multicomponent antituberculous subunit vaccine based on immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 23: 4175-4184.
114. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
115. Dutta NK, Bandyopadhyay N, Veeramani B, Lamichhane G, Karakousis PC, et al. (2014) Systems biology-based identification of *Mycobacterium tuberculosis* persistence genes in mouse lungs. *mBio* 5.
116. Miltner E, Daroogheh K, Mehta PK, Cirillo SLG, Cirillo JD, et al. (2005) Identification of *Mycobacterium avium* genes that affect invasion of the intestinal epithelium. *Infection and Immunity* 73: 4214-4221.
117. Saxena A, Srivastava V, Srivastava R, Srivastava BS (2008) Identification of genes of *Mycobacterium tuberculosis* upregulated during anaerobic persistence by fluorescence and kanamycin resistance selection. *Tuberculosis* 88: 518-525.
118. Thi EP, Hong CJ, Sanghera G, Reiner NE (2013) Identification of the *Mycobacterium tuberculosis* protein PE-PGRS62 as a novel effector that functions to block phagosome maturation and inhibit iNOS expression. *Cell Microbiol* 15: 795-808.
119. Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, et al. (2006) Evolution and

- expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (esx) gene cluster regions. BMC Evol Biol 6: 95.
120. Dong D, Wang D, Li M, Wang H, Yu J, et al. (2012) PPE38 modulates the innate immune response and is required for *Mycobacterium marinum* virulence. Infect Immun 80: 43-54.
121. Iantomasi R, Sali M, Cascioferro A, Palucci I, Zumbo A, et al. (2011) PE_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Cell Microbiol.
122. Bottai D, Brosch R (2009) Mycobacterial PE, PPE and ESX clusters: novel insights into the secretion of these most unusual protein families. Mol Microbiol 73: 325-328.
123. Tiwari B, Soory A, Raghunand TR (2014) An immunomodulatory role for the *Mycobacterium tuberculosis* region of difference 1 locus proteins PE35 (Rv3872) and PPE68 (Rv3873). FEBS J 281: 1556-1570.
124. Ruley KM, Ansede JH, Pritchett CL, Talaat AM, Reimschuessel R, et al. (2004) Identification of *Mycobacterium marinum* virulence genes using signature-tagged mutagenesis and the goldfish model of mycobacterial pathogenesis. FEMS Microbiol Lett 232: 75-81.
125. Mehta PK, Pandey AK, Subbian S, El-Etr SH, Cirillo SL, et al. (2006) Identification of *Mycobacterium marinum* macrophage infection mutants. Microb Pathog 40: 139-151.
126. Zhang F, Xie JP (2011) Mammalian cell entry gene family of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell Biochem 352: 1-10.
127. Gioffre A, Infante E, Aguilar D, Santangelo MP, Klepp L, et al. (2005) Mutation in mce operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Microbes Infect 7: 325-334.
128. Marjanovic O, Miyata T, Goodridge A, Kendall LV, Riley LW (2010) Mce2 operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis* is attenuated in C57BL/6 mice. Tuberculosis 90: 50-56.
129. Senaratne RH, Sidders B, Sequeira P, Saunders G, Dunphy K, et al. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* strains disrupted in mce3 and mce4 operons are attenuated in mice. J Med Microbiol 57: 164-170.
130. Shimono N, Morici L, Casali N, Cantrell S, Sidders B, et al. (2003) Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the mce1 operon. Proc Natl Acad Sci U S A 100: 15918-15923.
131. Casali N, Riley LW (2007) A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. BMC Genomics 8: 60.
132. Joshi SM, Pandey AK, Capite N, Fortune SM, Rubin EJ, et al. (2006) Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103: 11760-11765.
133. Cantrell SA, Leavell MD, Marjanovic O, Iavarone AT, Leary JA, et al. (2013) Free mycolic acid accumulation in the cell wall of the mce1 operon mutant strain of *Mycobacterium tuberculosis*. J Microbiol 51: 619-626.

134. Forrellad MA, McNeil M, Santangelo Mde L, Blanco FC, Garcia E, et al. (2014) Role of the Mce1 transporter in the lipid homeostasis of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 94: 170-177.
135. Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW (1993) Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science* 261: 1454-1457.
136. Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, et al. (2001) Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cell Microbiol* 3: 247-254.
137. Flesselles B, Anand NN, Remani J, Loosmore SM, Klein MH (1999) Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 177: 237-242.
138. Stavrum R, Stavrum AK, Valvatne H, Riley LW, Ulvestad E, et al. (2011) Modulation of transcriptional and inflammatory responses in murine macrophages by the *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry (Mce) 1 complex. *PLoS One* 6: e26295.
139. Mazandu GK, Mulder NJ (2012) Function Prediction and Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* Hypothetical Proteins. *Int J Mol Sci* 13: 7283-7302.
140. Gu S, Chen J, Dobos KM, Bradbury EM, Belisle JT, et al. (2003) Comprehensive proteomic profiling of the membrane constituents of a *Mycobacterium tuberculosis* strain. *Mol Cell Proteomics* 2: 1284-1296.
141. Xiong Y, Chalmers MJ, Gao FP, Cross TA, Marshall AG (2005) Identification of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv integral membrane proteins by one-dimensional gel electrophoresis and liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Proteome Res* 4: 855-861.
142. Chen J, Su X, Zhang Y, Wang S, Shao L, et al. (2009) Novel recombinant RD2- and RD11-encoded *Mycobacterium tuberculosis* antigens are potential candidates for diagnosis of tuberculosis infections in BCG-vaccinated individuals. *Microbes and Infection* 11: 876-885.
143. Rodrigue S, Brodeur J, Jacques PE, Gervais AL, Brzezinski R, et al. (2007) Identification of mycobacterial sigma factor binding sites by chromatin immunoprecipitation assays. *J Bacteriol* 189: 1505-1513.
144. Sun R, Converse PJ, Ko C, Tyagi S, Morrison NE, et al. (2004) *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigC is required for lethality in mice and for the conditional expression of a defined gene set. *Mol Microbiol* 52: 25-38.
145. Hasan S, Schreiber M, Daugelat S, Rao P.S S (2005) Prioritizing genomic drug targets in pathogens: Application to *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS Computational Biology* preprint: e61.
146. Kinnings SL, Xie L, Fung KH, Jackson RM, Xie L, et al. (2010) The *Mycobacterium*

tuberculosis Drugome and Its Polypharmacological Implications. PLoS Computational Biology 6.

147. Mulder NJ, Mazandu GK, Rapano HA (2013) Using Host-Pathogen Functional Interactions for Filtering Potential Drug Targets in *Mycobacterium tuberculosis*. Mycobacterial Diseases 03.

第 4 章 结核分枝杆菌 Rv3402c 蛋白在宿主-病原菌

相互作用中的功能研究

1 引言

结核病由胞内致病菌结核杆菌引起，仍然造成世界范围内的高发病率和高死亡率。尽管花费了大量人力物力研究、诊断、治疗结核病，但 WHO 2013 年的调查显示结核病仍然在 2012 年造成全球约 130 万人死亡以及约 860 万例新发或复发病人 (World Health Organization Tuberculosis Data and Statistics, 2013)。此外，耐药 (包括多重耐药和广泛耐药) 菌株以及与 HIV 共感染的出现也向世人敲响警钟，亟需深入探索结核杆菌的致病性以及在此基础上开发新的疫苗或新的治疗药物。

由呼吸道进入肺泡巨噬细胞后，结核杆菌将会被巨噬细胞膜内陷形成的结构包围，形成吞噬体 (phagosome)。吞噬体先后与晚期内吞体 (endosome) 及溶酶体 (lysosome) 融合，吸收溶酶体内的蛋白酶同时伴随着 pH 值降低，造成一个对入侵结核杆菌的杀菌环境：如酸性条件、活性氧中间物及活性氮中间物、抗菌肽 [1]、溶菌酶以及低浓度的铁离子 [2] 等等。然而结核杆菌也进化出了一系列逃避巨噬细胞杀伤机制的手段，并能潜伏于肉芽肿中，等待宿主免疫力降低伺机卷土重来 [3]。结核杆菌能逃避巨噬细胞的杀灭作用并潜伏感染主要归因于其分泌的效应蛋白：尽管已经鉴定出了一部分，但似乎仍有大量的效应蛋白待发掘。目前鉴定出来的效应蛋白主要可以分为三类：第一类能增强结核杆菌抵抗宿主产生的杀菌复合物，如 KatG [4]、SodC [5,6] 和 AhpC [7,8]；第二类能阻断吞噬体成熟过程，如 PtpA [9,10]、PknG [11,12] 和 SapM [13,14]；第三类能抑制宿主细胞的凋亡，如 NuoG [15,16,17] 和 SodA [18,19]。但这些效应蛋白还无法完全解析结核杆菌的致病性，因此鉴定新的效应蛋白仍旧是当前工作的重点。

胞内摄铁能力的强弱是病原菌在巨噬细胞中增殖及致病的关键 [20]。结核杆菌的开放阅读框 (ORF) *rv3402c* 是一个受 IdeR 或铁离子调控的基因，在结核杆菌生长于限铁环境下能够高水平表达 [21]。此外，有文献报道结核杆菌感染人巨噬细胞 THP-1 [21] 或鼠巨噬细胞 [22] 时 *rv3402c* 的表达水平显著升高。

尽管该蛋白没能落入第一章中我们预测的最终集合中 (Table 2)，但以上所述暗示 Rv3402c 可能在结核杆菌适应胞内生境中发挥着重要作用。基于此，我们以耻垢分枝杆菌作为模式生物，详细研究了结核杆菌蛋白 Rv3402c 在宿主-病原菌相互作用中的功能，以期证实 Rv3402c 作为结核杆菌分泌性效应蛋白的假设。

2 实验材料

2.1 实验质粒、菌株与细胞系

pMD19-T 购自 Takara 公司。其它表达质粒购自 Invitrogen 公司。分枝杆菌表达质粒由 Christopher M. Sasseti 教授友情赠送 [23]。为方便进行 Western blot, 本实验室对此质粒进行了改造, 即在目的蛋白的 C 末端添加一个 Myc 标签, 命名为 pNIT-Myc。

热灭活的结核分枝杆菌标准株 (*M. tuberculosis* H37Rv) 由重庆市肺科医院提供, 本实验室利用 CTBA 法抽提基因组 DNA。耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis* mc²155 ATCC 700084) 为本实验室保存。大肠杆菌工程菌株如 DH5a 和 BL21(DE3) 等为本实验室保存。大肠杆菌工程菌株培养于 LB 培养基中, 用于基因克隆表达。耻垢分枝杆菌 mc²155 在 37 °C 环境下培养于 Middlebrook (MB) 7H9 液体培养基或 MB 7H10 固体培养基上, 培养基中添加 0.2% (w/v) 葡萄糖、0.5% (v/v) 甘油以及 0.05% (v/v) Tween 80。必要时, 添加终浓度为 20 µg/ml 的卡那霉素或 50µg/ml 的潮霉素 B。

人白血病单核细胞性淋巴瘤细胞系 U-937 购自武汉大学, 小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 RAW264.7 由第三军医大学张志仁教授友情赠送 [24]。

2.2 主要试剂

Difco™ Middlebrook 7H9 和 7H10 Broth 购自 BD 公司;

限制性内切酶 (EcoRI、BamHI 等)、T4 DNA 连接酶、LA Taq DNA 聚合酶等均购自 Takara 公司;

Tween 80, Tween 20, 佛波酯 (Phorbol-12-myristate-13-acetate, PMA), 去内毒素试剂盒 E-TOXATE™ Kit, 异戊腈 (isovaleronitrile, IVN), 细胞因子抑制剂 TPCCK、PD 98,059、和 SB 202190 等均购自 Sigma-aldrich 公司;

卡那霉素 (kanamycin)、甘油、H₂O₂ 购自上海生物工程公司;

潮霉素 B (hygromycin B)、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Roche 公司;

己内酰胺 (ϵ -caprolactam)、2' 2'-联吡啶购自阿拉丁公司;

ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司;

DNase、RNase、LDH 检测试剂盒 CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit 为 Promega 公司产品;

焦碳酸二乙酯 (DEPC) 和 Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;

RNA 抽提试剂盒 RNeasy Pure Cell/Bacteria Kit、RNA 纯化试剂盒 RNAClean

kit、一步法 RT-PCR 试剂盒、鼠抗 Myc 抗体（一抗）和羊抗鼠 IgG-HRP 抗体（二抗）等均购自天根公司；

蛋白酶 K 与胰蛋白酶敏感性分析在 Yossf Av-Gay 实验室完成，主要试剂有：热启动 Q5 DNA 聚合酶、限制性内切酶均购自 NEB 公司；蛋白酶 K 和胰蛋白酶购自 Sigma-aldrich 公司；鼠源 Anti-His 一抗抗体购自 Abm Inc；鼠源 Anti-GFP 一抗抗体购自 Boehringer Mannheim Corp.；羊抗鼠二抗抗体 Alexa Fluor 660 Goat Anti-Mouse IgG 购自 Life technologies Corp.。

2.3 主要溶液与培养基配制

2.3.1 蛋白纯化试剂

Buffer A (no imidazole): pH 8.0, 1L

50mM NaH ₂ PO ₄	7.8g	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O(MW 156g/mol)
300mM NaCl	20.424g	NaCl(MW68.08g/mol)

Buffer B (1 M imidazole): pH 8.0, 250 ml

50mM NaH ₂ PO ₄	1.95g	NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O(MW 156g/mol)
300mM NaCl	5.106g	NaCl(MW68.08g/mol)
1 M imidazole	17.2g	Imidazole (MW68.8g/mol)

To prepare 50ml solution:

Lysis Buffer (NPI-10, 10mM imidazole):	49.5ml Buffer A + 0.5ml Buffer B
Wash Buffer(NPI-20, 20mM imidazole) :	49 ml Buffer A + 1ml Buffer B
Elution Buffer (NPI-250, 250mM imidazole) :	37.5ml Buffer A + 12.5ml Buffer B

2.3.2 Western blot 试剂

1. 转移电泳缓冲液（Towbin 液），pH 8.3

48 mM Tris, 39mM 甘氨酸, 20%(V/V)甲醇, 0.037%(W/V)SDS (SDS 妨碍蛋白与膜的结合, 特别是对小蛋白更是如此, 蛋白小于 80KDa 时, 不加)

5.8g Tris + 2.9g Gly + 0.37g SDS (不加) + 200ml 甲醇, 用 dH₂O 溶解并定容至 1L。

2. TBS 缓冲液(pH=7.6)

20mM Tris-HCl, 150mM NaCl

8.8g NaCl + 2.423g Tris, 用 dH₂O 溶解并定容至 1L。

3. TTBS Buffer (一次需要 500ml)

TBS 缓冲液+0.1%(V/V)Tween 20

4. 封闭液: TTBS + 2%(W/V) BSA(或者 5%的脱脂牛奶)。混匀后过滤, 如不过滤会导致使膜污染上细微黑颗粒。

5. 2%的丽春红贮备液(20ml): 2%丽春红(0.4 克)溶于 30%三氯乙酸(6 克)和 30%磺基水杨酸(6 克)。

丽春红染色工作液: 2%的丽春红贮备液 1: 10 稀释, 即加 9 倍的 ddH₂O

6. 一抗: 用封闭液稀释。按抗体说明书建议的稀释倍数, 用 TBST 稀释一抗, 如果说明书没有建议的稀释倍数, 则参照一般推荐的稀释倍数(1:100-1:3000), 一抗浓度过高会导致产生非特异性条带。

7. 二抗: 封闭液稀释。按说明书推荐的倍数稀释二抗, 如果说明书没有标出稀释倍数, 则按常规的倍数稀释 (1:1000- 1:20,000) 预试, 二抗的浓度过高也会导致非特异性条带。

2.3.3 细胞实验相关试剂

1. 0.025% (w/v) SDS: 称取 0.25g SDS 溶解于 1L 超纯水中。

2. IVN (异戊腈): 26ul IVN 加到 1ml DMSO 中, 配成 250uM 的母液; 加 1ul 到 1ml 细胞培养液中, 终浓度为 250nM。

2.4 主要仪器

PCR 扩增仪 (Bio-Rad), 电转仪 (Bio-Rad), 电泳仪 DYYU-8C (北京六一仪器厂), 电泳槽 DYCP-31D, 酶标仪 (Molecular Devices), 核酸蛋白浓度测定仪 NanoDrop spectrophotometer (Thermo), 凝胶图象分析系统 (Bio-Rad/uvitec), 全波长扫描仪 SpectraMax190 (Molecular Device), 湿法 western blot 电转槽 (Bio-Rad), 超纯水处理系统 (Millipore), 低温冷冻离心机 (湘仪仪器厂), 荧光倒置显微镜 (重庆澳浦光电技术有限公司), 低温超速冷冻离心机 (optinaa max-XD, Beckman), 紫外分光光度计 (普析通用仪器有限公司), CO₂ 细胞培养箱 (Thermo), 超声波破碎仪 HD2070 (BANDELIN, 德国), 水平脱色摇床 (TS-92 万向脱色摇床), 恒温水浴锅(上海齐欣科学仪器有限公司), 7890A 型 GC-MS 质谱检测仪(美国 Agilent)。

3 实验方法

3.1 基因克隆

本实验所使用引物序列参见表 1。从结核杆菌 H37Rv 基因组 DNA 上克隆的 *rv3402c* 基因的全长序列通过限制性内切酶 *EcoRI* 和 *BamHI* 连接到 pNIT-Myc 质粒上, 构建为重组质粒 pNIT-Myc-Rv3402c。使用相同方法构建重组质粒

pALACE-Rv3402c (保存于加拿大英属哥伦比亚大学医学系 Yossef Av-Gay 实验室)。使用限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Cl*aI 将绿色荧光蛋白基因 *gfp* 从 pSC301 [25] 切下, 连接到 pALACE 质粒上即为重组质粒 pALACE-GFP (保存于 Yossef Av-Gay 实验室)。使用分枝杆菌标准的电转方法 [26] 将以上质粒转化 *M. smegmatis* mc² 155。利用含卡那霉素 (筛选 pNIT-Myc 质粒) 或潮霉素 (筛选 pALACE 质粒) 的 MB 7H10 固体培养基筛选重组耻垢分枝杆菌。利用菌液 PCR 筛选阳性重组分枝杆菌, 保存于 -70 °C 备用。

表 1 本实验所用引物

Table 1 Primers used in this study.

	Sequence
<i>Cloning primers</i>	
pNIT-Rv3402c-For	CGCGGAATTCATGAAGATCCGAAC
pNIT-Rv3402c-Rev	AATGGATCCTTACCGCGCACCT-3
pALACE-Rv3402c-For	GAGGGATCCATGAAGATCCGAACGTT
pALACE-Rv3402c-Rev	ACACATATGTCATTCACCGCGCACC
pET-28-Rv3402c-For	CGCTGGATCCATGAAGATCCGAAC
pET-28-Rv3402c-Rev	GAGAAGCTTTTCATTCACCGCGCAC
<i>RT-PCR primers</i>	
pNIT-Rv3402c-For	ACCGCTACCTGCTGATG
pNIT-Rv3402c-Rev	GGATGGACTCGCGTGTTTG
16 S rRNA-For	GTAGGGGAAAGCTTTTGCGGTGTGG
16 S rRNA-Rev	TCGTCTGTGCTGAAAGAGGTTTACA
TNF- α -For	CGCTCCCAAGAAGACAG
TNF- α -Rev	TGAAGAGGACCTGGGAGT
IL-1 β -For	GATGGCTTATTACAGTGGC
IL-1 β -Rev	GACCAGACATCACCAAGC
β -actin-For	CGGCTCCGGCATGTGCAA
β -actin-Rev	ATGTCACGCACGATTTC

3.2 蛋白表达与纯化

将含有 pNIT-Myc-Rv3402c 的 *M. smegmatis* mc² 155 重组菌株 (MS_Rv3402c) 和空载菌株 (MS_Vec) 常规培养至对数期 (OD₆₀₀ 0.6–0.8)。添加终浓度为 28 mM 的己内酰胺诱导约 16 小时后, 收集菌体, 一分为二。一份菌体使用 RNeasy Pure Cell/Bacteria Kit 抽提总 RNA。分别使用 *rv3402c* 及分枝杆菌 16 S rRNA (*rrsB*) 的特异性 RT-PCR 引物对相同质量的总 RNA 进行半定量 RT-PCR (两步法)。使用 1%

的琼脂糖凝胶对 RT-PCR 产物进行电泳并拍照。余下一份菌体超声破碎后进行 SDS-PAGE 电泳, 蛋白转移到硝酸纤维素膜上, 最终使用抗 Myc 的鼠源抗体检测 Rv3402c 的表达。

重组 Rv3402c (rRv3402c) 蛋白依照文献 [27] 的方法进行表达和纯化。简言之, 将 *rv3402c* 基因连接到表达质粒 pET-28a(+) 上, 转入表达菌株 BL21(DE3) 中, 使用 IPTG 诱导蛋白表达, 最后使用 Ni²⁺ 柱纯化。纯化好的 rRv3402c 在 PBS (pH 7.2) 中透析过夜, 过滤除菌, 使用 E-TOXATE™ Kit 去除内毒素, 冻存于 -70 °C 备用。

3.3 重组耻垢分枝杆菌亚细胞结构的分离与鉴定

重组耻垢分枝杆菌亚细胞结构的分离方法基本参照文献 [28] 进行, 略有改动。200 ml 耻垢分枝杆菌菌液培养到 OD₆₀₀ 为 0.8 左右, 添加终浓度为 28 mM 的己内酰胺诱导 16 小时。离心收集细菌菌体, 重悬于 9 ml 裂解缓冲液 (PBS 中含终浓度为 1 mM 的 PMSF, 终浓度为 0.6 mg/ml 的 DNase 和 RNase) 中, 超声破碎细菌。细菌裂解液在 3,000 g 条件下离心 30 min, 上清即为全细胞裂解液 (whole cell lysates, WCL), 收集少许备用。余下 WCL 在 27,000 g 条件下离心 30 min, 沉淀即为细胞壁组分 (cell wall pellet, CW)。将上清继续使用 100,000 g 离心力离心 2 小时, 沉淀即为细胞膜组分 (cell membrane fraction, CM), 上清即为可溶解的细胞质组分 (soluble fraction, SOL)。使用裂解缓冲液分别洗涤细胞壁组分和细胞膜组分一次, 100,000 g 再次离心 2 小时, 分别重悬于 0.5 ml 裂解缓冲液中。所有离心步骤均在 4 °C 下进行。

将上述亚细胞结构组分进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 各组分的蛋白浓度比值为 WCL : CW : CM : SOL = 1 : 0.36 : 0.71 : 0.91。电泳结束, 将蛋白转移到醋酸纤维素膜上进行免疫印迹实验。使用鼠源的 Anti-Myc 一抗抗体检测携带 Myc 标签的 Rv3402c 蛋白。由于耻垢分枝杆菌内源的 GroEL2 蛋白本身含有一段组氨酸序列 [29], 所以我们将其作为内参蛋白, 使用鼠源的 Anti-His 一抗抗体检测其表达。二抗抗体使用偶联辣根过氧化物酶的羊抗鼠抗体。使用化学发光法 Western Lighting ECL 收集免疫印迹信号。

3.4 蛋白酶 K 与胰蛋白酶敏感性分析

对重组耻垢分枝杆菌的蛋白酶 K 与胰蛋白酶敏感性分析实验方法参照文献 [30] 进行, 略有改动。使用终浓度为 0.2% (w/v) 的乙酰胺分别诱导携带 pALACE, pALACE-Rv3402c 或 pALACE-GFP 质粒的重组耻垢分枝杆菌 10 小时后, 收集菌体。使用 PBS 洗涤菌体两次后, 加入终浓度为 100 μg/ml 的蛋白酶 K 或胰蛋白酶, 37 °C 孵育一段时间。加入终浓度为 100 nM 的 PMSF 终止反应。加入 SDS 上样缓

冲液后进行免疫印迹实验。使用鼠源的 Anti-His 一抗抗体 (Abm Inc.) 检测携带 His 标签的 Rv3402c 蛋白。使用鼠源的 Anti-GFP 一抗抗体 (Boehringer Mannheim Corp.) 检测 GFP 蛋白, 后者作为胞内蛋白的对照。二抗抗体使用 Alexa Fluor 660 Goat Anti-Mouse IgG (Life technologies Corp.)。使用 Odyssey CLx Infrared Imaging System 收集免疫印迹信号。

3.5 重组耻垢分枝杆菌菌落形态及脂肪酸组成的分析

3.5.1 菌落形态比较

将 MS_Rv3402c 和 MS_Vec 培养于 MB 7H10 上, 必要时添加 0.05% (v/v) Tween 80 或 28 mM 己内酰胺。37℃ 培养 5 天后, 拍照。

3.5.2 脂肪酸 GC-MS 分析

配制脂肪酸提取相关试剂:

试剂 1 (皂化反应): 45g NaOH, 150ml 甲醇, 150ml 蒸馏水。现配现用。

试剂 2 (甲基化): 325ml 6.0N 盐酸和 275ml 甲醇。调 pH 值于 1.5 以下, 使脂肪酸甲基化。脂肪酸甲基酯在亲水性条件下是难溶的。

试剂 3 (萃取): 200ml 己烷, 200ml 甲基叔丁醚。以便将脂肪酸甲酯提取至有机相中, 用于气相色谱分析

试剂 4 (样品纯化): 10.8g NaOH 溶于 900ml 水中。该过程可减少样品入口, 柱子和检测器的污染。

菌体以 PBS 清洗菌体, 依据文献进行脂肪酸提取:

(1) 收集菌体 接种 7H9 液体培养基, 放入 37℃、200r/min 的摇床中, 培养至生长对数中期 (0.8-1.0), 6000 r/min 下离心 6min, 弃去上清液, 用蒸馏水或 PBS 缓冲液洗涤, 离心收集细胞。

(2) 皂化反应 将收集的 100mg 细菌加入 1.0ml 试剂 1, 将管子用密封很好的盖子封起来, 轻微震荡 5-10s, 100℃ 沸水浴 5min, 剧烈涡旋 5-10s, 再放回沸水浴中煮沸 25min。

(3) 甲基化 将冷却后的试管打开, 加入 2ml 试剂 2 轻微涡旋, 80℃ 加热 10min。
(该步骤中时间和温度至关重要, 一定要准确)

(4) 萃取 加入 1.25ml 试剂 3 到冷却后的试管中, 重新盖好盖子, 温和地翻转 10min, 试管打开, 用吸管将水相 (试管底层) 移除。

(5) 产物清洗 大约 3ml 试剂 4 加入试管有机相中, 盖上盖子翻转 5min。打开盖子, 用吸管吸取有机相的 2/3 到新玻璃管中用于后期分析。

3.6 重组耻垢分枝杆菌巨噬细胞内存活分析

将悬浮培养的 U-937 细胞均匀铺在 12 孔板中, 每孔约 1×10^6 个细胞, 取三复孔。加入终浓度为 100 ng/ml 的 PMA (Sigma, USA), 在 37°C 和 5% CO₂ 浓度下孵育 48 小时, 此时 U-937 细胞分化成贴壁状态的巨噬细胞。将已经诱导表达 16 小时的重组耻垢分枝杆菌制备成均匀的单细胞悬液, 然后以 MOI=10: 1 (细菌: 巨噬细胞) 感染已经分化好的 U-937 细胞。在第 4 小时时间点, 使用 37°C 温浴的 RPMI-1640 洗涤 U-937 细胞 3 次, 彻底除去胞外细菌。每孔加入 1ml 含有 250nM 异戊腈 (isovaleronitrile, IVN) (Sigma, USA) 和 100 μ g/ml 潮霉素 B (Roche, USA) 的 RPMI 1640-10% FBS 完全培养基。在第 6 小时时间点重新洗涤细胞 2 次, 加入不含潮霉素的完全培养基继续培养。在第 6 和 72 小时时间点分别收集细胞培养上清, 冻存于 -70°C, 用于 ELISA 实验。然后将贴壁生长的 U-937 细胞洗涤 2 次后, 加入终浓度为 0.025% (w/v) 的 SDS 溶液裂解细胞释放耻垢分枝杆菌。将每孔细胞裂解液做十倍梯度稀释后, 取 10 μ l 滴到含卡那霉素的 MB 7H10 平板上。37°C 培养 3-4 天后, 计数平板上的菌落数, 计算菌落形成单位 (CFU), 即可以比较重组耻垢分枝杆菌在 U-937 细胞胞内存活能力。同样地, 采取类似的方法来比较重组耻垢分枝杆菌在 RAW264.7 细胞胞内存活能力。不同之处是, 在 12 孔板上每孔均匀地铺上 5×10^5 个 RAW264.7 细胞, 不加 PMA 培养 24 小时后, 使用重组耻垢分枝杆菌感染巨噬细胞。

3.7 重组耻垢分枝杆菌胞外生长及应力分析

重组耻垢分枝杆菌的生长曲线: 接种重组耻垢分枝杆菌, 初始 OD₆₀₀ 约为 0.02, 置于 37°C 摇瓶培养至 OD₆₀₀ 约为 0.8。加入终浓度为 28 mM 的诱导剂己内酰胺, 每隔 3 小时测一次 OD₆₀₀, 一共测 36 个小时。以记录的数据绘制重组耻垢分枝杆菌的生长曲线。

重组耻垢分枝杆菌在缺铁条件下的生长曲线: 将重组耻垢分枝杆菌培养在含终浓度为 100 μ M 2', 2'-联吡啶的 7H9 培养基中 [31]。操作同测生长曲线, 每隔 3 小时测量一次 OD₆₀₀, 一共测 50 个小时。以记录的数据绘制重组耻垢分枝杆菌在缺铁条件下的生长曲线。

测量重组耻垢分枝杆菌在酸性条件下的生长状况的方法参考文献 [32]。具体步骤如下: 离心收集对数期的重组耻垢分枝杆菌菌液, 使用 pH 3 或 5 的 7H9 培养基洗涤细菌。将细菌重悬于 5ml 的 pH 为 3 或 5 的 7H9 培养基中, 最终 OD₆₀₀ 值控制在 0.5。在此酸性条件下摇床培养细菌, 在第 0、3、6 等时间点分别取 100 μ l 菌液做十倍浓度梯度稀释。将稀释好的细菌点种在含卡那霉素的 7H10 平板上, 37°C 培养 3-4 天, 计数菌落数, 算出菌落形成单位 (CFU), 最后作图。

测量重组耻垢分枝杆菌在氧化压力下的存活率：离心收集对数期的重组耻垢分枝杆菌菌液，使用 pH 为 5 的 7H9 培养基洗涤细菌一次，然后重悬在相同培养基中。使用 pH 为 5 的 7H9 培养基将菌液稀释到 OD₆₀₀ 为 0.5，取 5ml，加入终浓度为 5 mM 的 H₂O₂。摇床培养到第 0 和 6 小时时间点，分别取 100 μl 菌液做十倍浓度梯度稀释。将稀释好的细菌点种在含卡那霉素的 7H10 平板上，37℃ 培养 3-4 天，计算 CFU。最后按照存活率作图。

以上实验均取三复孔，同时重复三次。

3.8 巨噬细胞存活实验

本研究采用检测巨噬细胞释放乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 的量来衡量细胞裂解的程度 [33]。在重组耻垢分枝杆菌感染 U-937 细胞系后 6、24、48 和 72 小时时间点收集细胞培养基上清。使用商业试剂盒 CytoTox96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, USA) 来检测培养基上清中 LDH 的含量。具体步骤参照试剂盒说明书。实验数据的计算方法如下：

1、将所有实验孔、靶细胞自发 LDH 释放孔和效应细胞自发 LDH 释放孔的吸光值减去培养基背景吸光值的均值。

2、将靶细胞最大 LDH 释放对照的吸光值减去体积校正对照吸光值的均值。

3、将步骤 1 和 2 中获得的经过校正的值带入下面公式，计算每个效靶比所产生的细胞毒性百分比。 $\% \text{细胞毒性} = (\text{实验孔 LDH 释放量} - \text{靶细胞自发 LDH 释放量}) / (\text{靶细胞最大 LDH 释放量} - \text{靶细胞自发 LDH 释放量}) \times 100$ 。

3.9 利用 semi-RT-PCR 和 ELISA 对细胞因子表达的分析

将方法 3.6 中收集的感染后 6 和 72 小时时间点的 U-937 细胞上清液用于 ELISA 实验。使用商业化的检测 TNF- α 和 IL-1 β 含量的 ELISA 试剂盒 (eBioscience, USA) 来测定细胞上清中的细胞因子浓度，所有步骤严格按照说明书操作。

重组耻垢分枝杆菌感染类巨噬细胞 U-937 细胞系 12 小时后，收集细胞，利用 RNAprep Pure Cell/Bacteria Kit 进行 RNA 抽提。使用 DNAase 除掉 RNA 中的 DNA，然后取 1 μ g 作为模板，使用随机六聚体引物和 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 将 1 μ g DNAase 处理后的 RNA 转录成 cDNA。然后使用表 1 中的 TNF- α 、IL-1 β 和 β -actin (作为内参对照) 特异引物进行 PCR 扩增，即半定量 RT-PCR。将所得 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳，拍照记录。

3.10 生物信息学与统计学分析

(1) 蛋白质跨膜结构域预测网站：

(<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/nph-webface?jobid=TMHMM2,4D65C17807B3C9A1&opt=none>), 输入 Rv3402c 的蛋白序列预测该蛋白的亚细胞定位情况。

(2) 蛋白质同源性分析:

从 NCBI 中下载 *rv3402c* 基因序列及相应的同源序列, 利用软件 Vector 11 分析其同源性。

(3) 本研究数据采用 Student's two-tailed t-test 法分析。P 值小于 0.05 时我们认为差异是显著的。误差棒表示标准偏差 (standard deviation, SD)。

4 结果与分析

4.1 Rv3402c 的基本特性

通过蛋白质跨膜结构域预测, 我们发现 Rv3402c 蛋白有两个区域很可能是跨膜区域 (图 1A); 因此, 该蛋白很可能是一个跨膜蛋白。有意思的是, 通过蛋白质同源性分析, 我们发现 *rv3402c* 基因在疫苗菌株 BCG 中的同源基因是一个截断了大约 186 个碱基 (61 个氨基酸) 的基因 BCG3472c; 而在非致病菌耻垢分枝杆菌中完全没有同源基因 (图 1B)。众所周知, 疫苗菌株 BCG 是一个经过基因累积突变而得到的一个弱毒牛结核分枝杆菌; 而耻垢分枝杆菌是腐生型的无毒菌株。基于 *rv3402c* 基因在不同毒性的分枝杆菌中的分布, 并结合已有的研究, 我们猜测该基因在结核杆菌的致病性中发挥了一定的作用。

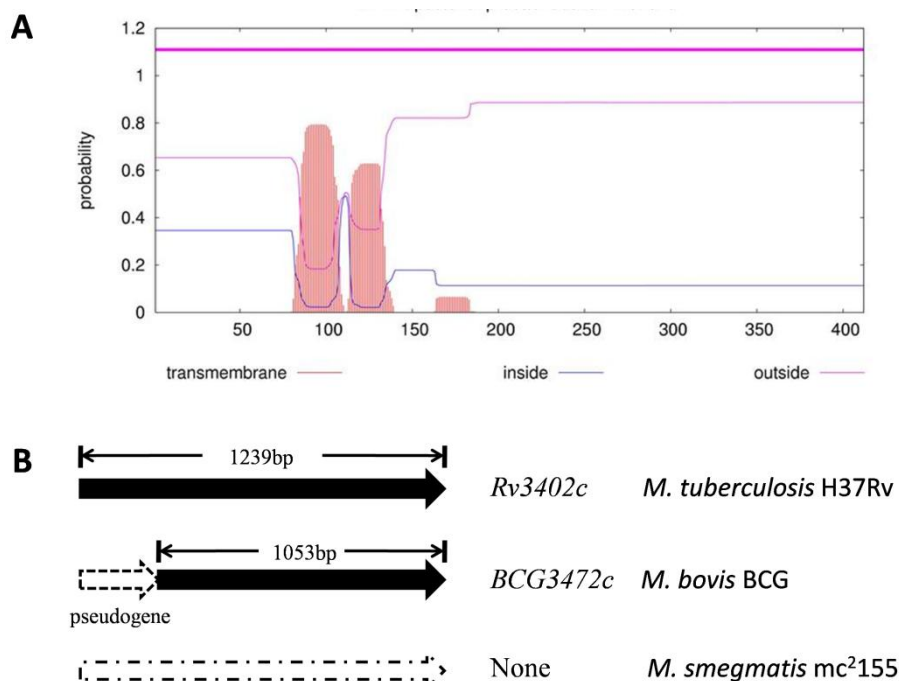


图 1. Rv3402c 的生物信息学特性。

Fig. 1. Bioinformatics properties of Rv3402c protein. (A). TMHMM posterior probabilities for Rv3402c. (B). The distribution of Rv3402c in different mycobacteria.

4.2 Rv3402c 成功表达于模式菌株耻垢分枝杆菌

结核分枝杆菌的 ORF *rv3402c* 大约 1.2 kb，所编码蛋白质大小约为 45 kDa。本研究中，我们构建了两株耻垢分枝杆菌重组菌株用于研究 Rv3402c 与宿主巨噬细胞之间的相互作用。重组菌株 MS_Rv3402c 能够表达携带 Myc 标签的 Rv3402c 蛋白；而重组菌株 MS_Vec 包含 pNIT-Myc 载体，作为阴性对照菌株。

MS_Rv3402c 和 MS_Vec 都能够表达 *aph* 基因，所以都能生长于含卡那霉素的培养基上 [34]。半定量 RT-PCR 结果显示，只有 MS_Rv3402c 才能够转录 *rv3402c* 基因(图 2A)。Western blot 实验进一步证实了 MS_Rv3402c 能够表达一个约 50 kDa 大小的 Myc 融合蛋白，而阴性对照菌株 MS_Vec 没有检测到 *rv3402c* 基因的表达(图 2B)。以上实验结果显示 Rv3402c 成功表达于耻垢分枝杆菌中。

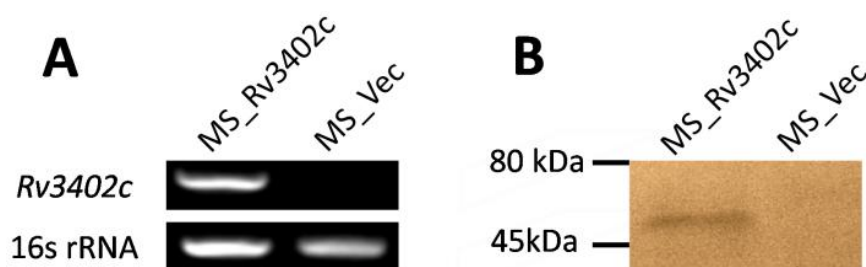


图 2. Rv3402c 成功表达于模式菌株耻垢分枝杆菌。

Fig. 2 Expression of Rv3402c in recombinant *M. smegmatis*. (A). Ms_Rv3402c and Ms_Vec were grown at 37 °C in MB 7H9 liquid medium to an OD₆₀₀ of 0.6–1.0. Total bacterial RNA was isolated after 16 h induction and subjected to RT-PCR to detect expression of the *rv3402c* and *rrsB* genes. (B). Lysates were prepared from bacterial cells that were cultured as in (A) and subjected to Western blot analysis to detect Myc-tagged Rv3402c protein using mouse anti-Myc antibody.

4.3 Rv3402c 增强重组耻垢分枝杆菌在巨噬细胞内的存活率

我们对 *rv3402c* 进行比较基因组学分析发现，在其它非致病性分枝杆菌属细菌如耻垢分枝杆菌, *M. gilvum* 和 *M. vanbaalenii* 等中不存在同源基因。有意思的是，在减毒疫苗 BCG (BCG Pasteur) 菌株中 *rv3402c* 的同源基因也断裂成了两个片段。*rv3402c* 在结核杆菌攻击巨噬细胞时表达上调，能够暴露于细菌细胞表面，且在减毒或无毒分枝杆菌中受损或缺失；这些似乎暗示该基因在病原菌-宿主相互作用之间扮演着某种角色。为此，我们利用感染系数为 10:1（即细菌：巨噬细胞=10:1）的重组耻垢分枝杆菌分别攻击人源类巨噬细胞 U-937 和鼠源巨噬细胞 RAW264.7，考察该基因对于非致病菌胞内存活的影响。图 3A 显示，感染 U-937 细胞系 48 小时和 72 小时后，重组菌 MS_Rv3402c 的存活率明显比空载对照菌 MS_Vec 的存活率高，而感染 RAW264.7 细胞系时，这一明显的胞内存活率差异只发生在 72 小时(图 3B)。尽管重组菌在两种不同细胞系之间存在差异，但我们的数据仍显示

Rv3402c 能够增强非致病菌耻垢分枝杆菌在人源和鼠源巨噬细胞中的生存率。

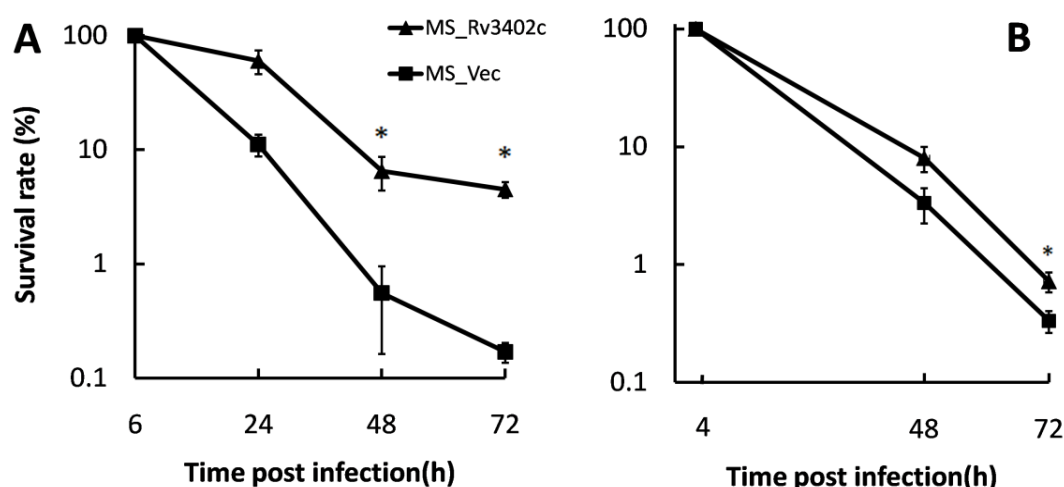


图 3. 巨噬细胞中 MS_Vec 和 MS_Rv3402c 的胞内存活能力的比较。

Fig. 3 Intracellular survival of recombinant *M. smegmatis* in macrophages. U-937 cells (A) and RAW267.4 cells (B) were infected with MS_Vec and MS_Rv3402c as described in the methods section, respectively. Aliquots of infected cells were lysed with 0.025% SDS at indicated times, and serial dilutions were plated on 7H10 agar plates containing kanamycin. Recovered CFUs were enumerated after the incubation for 3-4 days at 37 °C. Numbers of intracellular bacteria are shown as a percentage of the numbers detected at t = 6 h (U-937) or 4 h (RAW267.4) (% survival). Data are shown as means \pm SD of triplicate wells. Similar results were obtained in three independent experiments.

4. 4 Rv3402c 不能增强重组耻垢分枝杆菌的抗压能力

一个蛋白增强细菌胞内存活能力一般有两方面的贡献：增强细菌自身存活，如增加自身复制能力或抗压能力；削弱宿主细胞的杀菌能力，如干扰宿主的信号通路等。为进一步弄清 Rv3402c 增强重组耻垢分枝杆菌的胞内存活能力的原因，我们分析了重组菌 MS_Rv3402c 和对照菌 MS_Vec 的一些生长特性及抗压能力。如图 4A 所示，两株菌的体外生长曲线基本一致，这说明 Rv3402c 并未改变耻垢分枝杆菌的增殖能力。

当结核杆菌进入宿主细胞后，将面对各种压力条件，如低铁环境、酸性环境、活性氧簇等。因此，我们也考察了 Rv3402c 是否赋予宿主菌抵抗这些压力的能力。文献报道在限铁条件下培养结核杆菌时，能够诱导 *rv3402c* 的高表达 [21]，因此我们首先考察了重组菌 MS_Rv3402c 和对照菌 MS_Vec 在低铁条件下的生长情况。如图 4B 所示，在含有铁螯合剂联吡啶的 7H9 培养基中培养的两株菌的生长曲线并无明显差异，说明 Rv3402c 并未改变耻垢分枝杆菌耐受低铁环境的能力。为考察其在酸性条件下的生长情况，我们将重组菌 MS_Rv3402c 和对照菌 MS_Vec 分别培养于 pH 为 3.0 和 5.0 的 MB 7H9 中，在 0、3 和 6 小时时间点计算其 CFU，发

现两株菌的生长情况没有差异 (图 4C)。类似地, 我们将两株菌培养于 5 mM H₂O₂ 的培养基中考察其在氧化环境下的生长状况。如图 4D 所示, H₂O₂ 处理 6 小时后, MS_Vec 和 MS_Rv3402c 的生存率分别为 123.3% 和 116.7%, 统计分析显示没有差异。综合以上结果, 我们发现 Rv3402c 并不能增强耻垢分枝杆菌对胞内环境的抗压能力。因此, 我们推测 Rv3402c 可能参与宿主-病原菌的互作, 而实现这一结果的前提是该蛋白是个胞外蛋白。

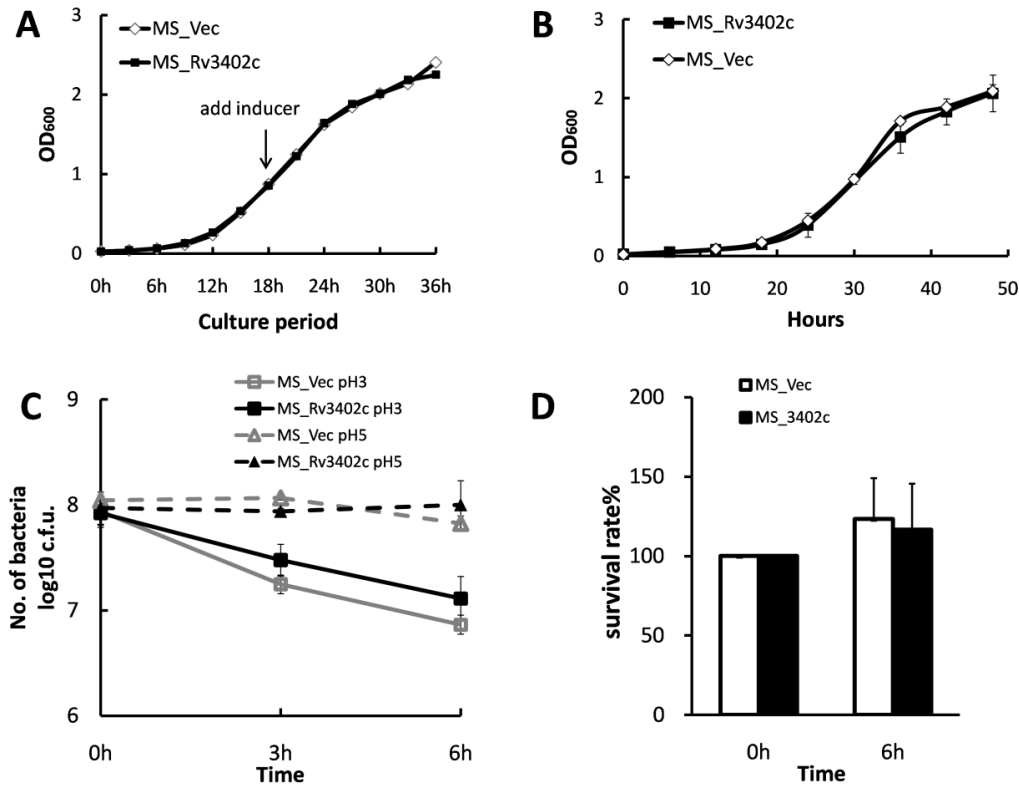


图 4. 重组菌 MS_Rv3402c 和对照菌 MS_Vec 的胞外生长情况。

Fig. 4 Growth of MS_Vec and MS_Rv3402c under stress conditions. (A). Growth of MS-Vec and MS-Rv3402c at 37 °C in MB 7H9 liquid medium was monitored by determining OD₆₀₀ at intervals of 3 h. (B). Growth curve of MS-Vec and MS-Rv3402c in iron-depleted medium. Two recombinant *M. smegmatis* were grown in MB 7H9 medium supplemented with 100 μM 2' 2' dipyridyl. The growth of the strains were monitored by measuring OD₆₀₀ at intervals of 6 h. (C). *In vitro* growth of MS-Vec and MS-Rv3402c at different pH. The bacteria were collected by centrifugation and resuspended to an OD₆₀₀ of 0.5 in 5ml MB 7H9 (pH 5 or 3). All cultures were again incubated at 37 °C and 0.1 ml removed for viable count enumeration after 0, 3 and 6 h. (D). Survival of recombinant *M. smegmatis* after exposure to hydrogen peroxide. Aliquots (5 ml) of cultures at OD₆₀₀ of 0.5 were exposed to 5 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) for 6 h at 37 °C. The cultures were serially diluted and plated onto MB 7H10 plates and the colonies counted after 3-4 days of incubation at 37 °C.

4.5 Rv3402c 部分定位于重组耻垢分枝杆菌细胞表面

有文献报道 Rv3402c 可能参与类脂多糖分子的生物合成过程 [21]。而且通过序列比对，我们发现 Rv3402c 与 *Bacillus cereus* 的脂多糖合成蛋白以及 *Rheinheimera sp.* 的 PLP 依赖的酶分别有 32% 和 28% 的序列相似性，后两者可能参与细胞壁的生物合成过程。因此我们推测 Rv3402c 可能定位于结核杆菌的细胞壁或细胞膜组分上。为了验证这一假设，我们在耻垢分枝杆菌中过表达携带 Myc 标签的 Rv3402c 蛋白，使用离心力分级分离重组耻垢分枝杆菌的全细胞裂解液、细胞壁、细胞膜及可溶性的细胞质组分，然后利用免疫印迹法检测 Rv3402c 蛋白的定位情况。由图 5A 可知，尽管在细胞质中检测到了绝大部分的 Rv3402c 蛋白，但仍能清晰地看到 Rv3402c 也部分定位于细胞表面，即细胞壁和细胞膜组分中。我们没有在滤液蛋白中检测到 Rv3402c 的存在，这说明此蛋白可能无法分泌到培养滤液中。我们使用热休克蛋白 GroEL2 作为细胞质组分的阳性对照，免疫印迹实验检测到该蛋白只存在于全细胞裂解液和细胞质中，说明细菌组分的分级分离方法是可信的。

为进一步证明 Rv3402c 蛋白定位于重组耻垢分枝杆菌细胞表面，我们进行了蛋白酶 K 和胰蛋白酶敏感性实验 [30,35]。其基本原理是：如果一个蛋白能够表达于细菌细胞表面，那么该重组菌经过以上任一种蛋白酶处理后，细菌细胞表面的蛋白将消化殆尽，而胞内的蛋白不受影响，使用免疫印迹法能检测到此消化过程。我们选择绿色荧光蛋白 (GFP) 作为胞内蛋白的对照。理论上，一个蛋白的性质应该不受所用载体的影响。因此，为了证明 Rv3402c 的定位不受载体的影响，我们选择了另外一个载体 pALACE 来重新构建重组耻垢分枝杆菌进行此项实验。如图 5B 和 C 所示，重组耻垢分枝杆菌表达的携带 His 标签的 Rv3402c 蛋白分别被蛋白酶 K 和胰蛋白酶部分地水解了，这就说明 His-Rv3402c 蛋白确实能定位于细菌细胞表面。而即使将反应时间延长到 30 分钟也无法完全降解掉 His-Rv3402c，说明仍有大量蛋白定位于细菌胞内。相反地，重组耻垢分枝杆菌表达的 GFP 蛋白没有被消化。综合以上结果可知，尽管大部分 Rv3402c 蛋白位于细胞质中，但仍有少量蛋白能够暴露于细菌表面，这也提示该蛋白有机会与胞外环境相互作用。

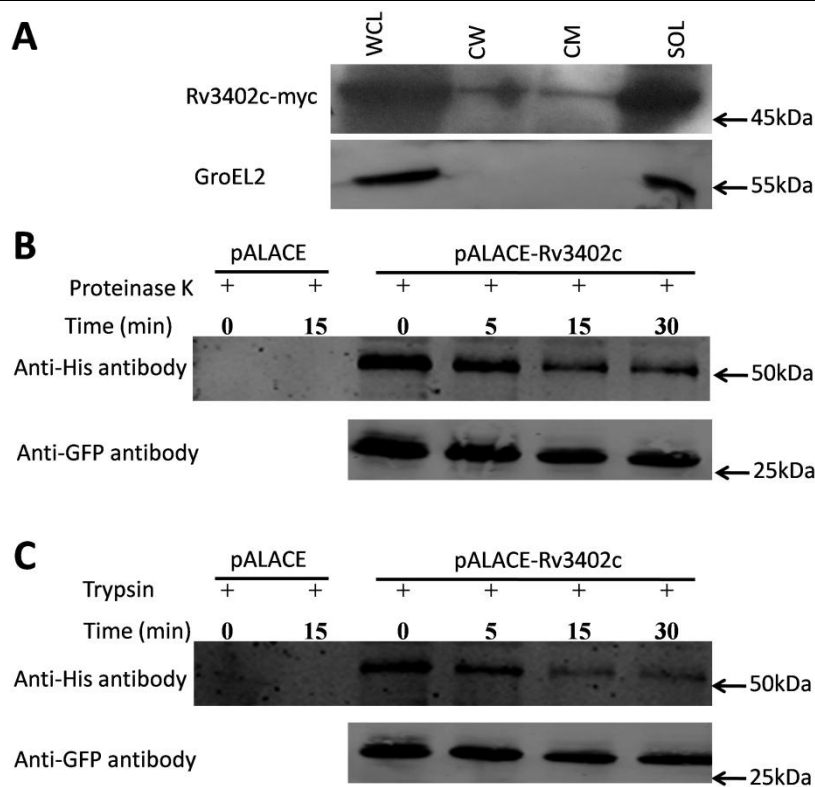


图 5. Rv3402c 部分定位于重组耻垢分枝杆菌细胞表面。

Fig. 5 Rv3402c is a cell envelope-associated protein. (A). Subcellular fractionation of *M. smegmatis* induced to express Rv3402c-Myc showed localization to the cell wall and membrane fractions. Subcellular fractions were separated by SDS-PAGE and proteins were detected with an anti-Myc antibody. Native GroEL2 was detected as a cytoplasmic control. WCL, whole cell lysates (66 μ g total protein); CW, cell wall fraction (24 μ g total protein); CM, cell membrane fraction (47 μ g total protein); SOL, soluble fraction (60 μ g total protein). (B and C). *M. smegmatis* transformed with pALACE, pALACE-GFP or pALACE-Rv3402c were incubated with proteinase K or trypsin at different time points. Whole-cell lysates obtained by the recombinant bacteria were separated on SDS-PAGE. Immunoblots were performed using anti-His antibodies and anti-GFP antibodies. Similar results were obtained in two independent experiments.

4. 6 Rv3402c 对重组耻垢分枝杆菌菌落形态及脂肪酸组成没有影响

文献报道以及初步的生物信息学结果都显示 Rv3402c 和某些其它细菌参与细胞壁生物合成的蛋白具有较高的同源性。而且亚细胞结构分级分离和蛋白酶敏感性分析结果证明 Rv3402c 定位于耻垢分枝杆菌细胞表面。因此我们猜测 Rv3402c 会否影响耻垢分枝杆菌细胞表面的某些特性。首先我们分析比较了重组菌 MS_Rv3402c 和空载菌 MS_Vec 之间菌落形态的差异。我们将 MS_Rv3402c 和 MS_Vec 培养于 MB 7H10 上, 必要时添加 0.05% (v/v) Tween 80 或 28 mM 己内酰胺。37 $^{\circ}$ C 培养 5 天后, 拍照。如图 6 所示, 过表达 Rv3402c 并不能影响耻垢分

枝杆菌的菌落形态。

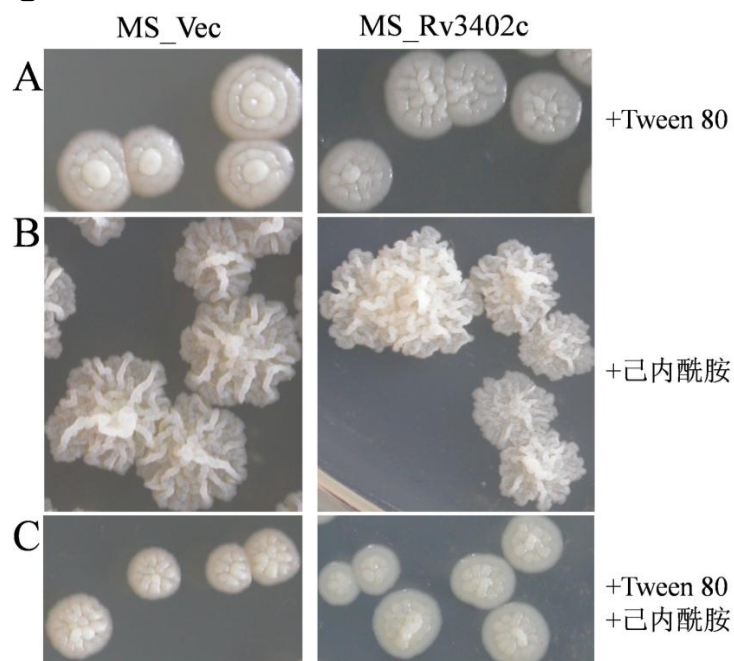


图 6. 重组菌 MS_Rv3402c 和空载菌 MS_Vec 菌落形态的比较。

Fig. 6 Colony morphology of recombinant *M.smegmatis* strains cultured on 7H10 medium. MS_Vec and MS_Rv3402c were grown at 37 °C on MB 7H10 agar supplemented with glucose, glycerol and kanamycin. When required, 0.05% (v/v) Tween 80 (A), 28 mM ϵ -caprolactam (B) or both (C) were added. Pictures were taken at day 5.

接下来我们比较了重组菌和空载菌之间脂肪酸组成的差异。如图 7 所示，MS_Rv3402c 和 MS_Vec 之间脂肪酸的组成并没有明显差异。综合以上结果显示，Rv3402c 的过表达并不能影响重组耻垢分枝杆菌的细胞表面特性。

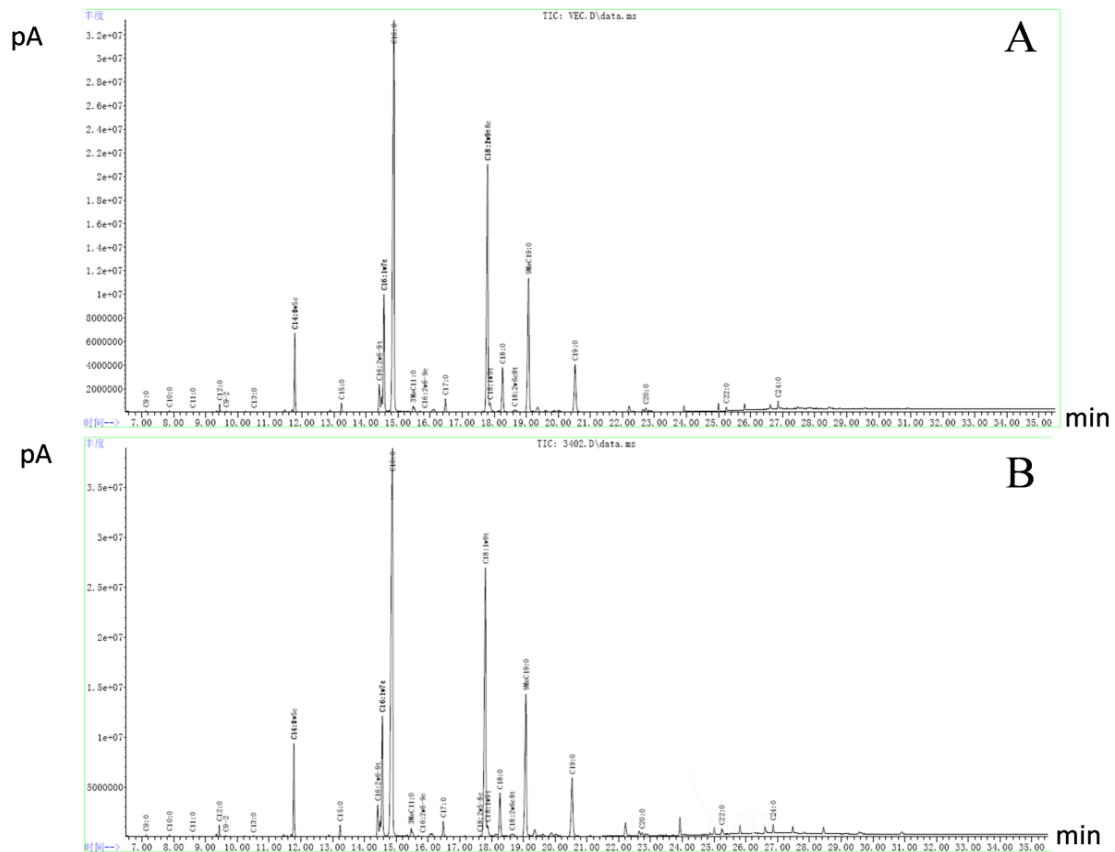


图 7. 重组菌 MS_Rv3402c 和空载菌 MS_Vec 脂肪酸组成的比较。

Fig. 7 Bacterial fatty acids compositions of MS_Vec (A) and MS_Rv3402c (B) were analyzed by GC/MS.

4.7 表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌促进巨噬细胞死亡

被结核杆菌感染后的巨噬细胞有可能被结核杆菌释放的分泌蛋白干扰其正常的细胞途径而引起死亡。因此我们比较了重组菌 MS_Rv3402c 和对照菌 MS_Vec 对于巨噬细胞活性的影响。巨噬细胞死亡后，会裂解释放 LDH，因此我们通过检测细胞培养基上清中 LDH 的含量多少来评估细胞的死亡率。类巨噬细胞 U-937 感染 MS_Rv3402c 后 48 小时和 72 小时时间点的 LDH 释放量分别达到了 49.8% 和 50.4%；而感染对照菌 MS_Vec 的 U-937 细胞的 LDH 释放量从未超过 31%（图 8）。这些结果显示，表达 Rv3402c 蛋白的耻垢分枝杆菌能加速巨噬细胞的裂解。

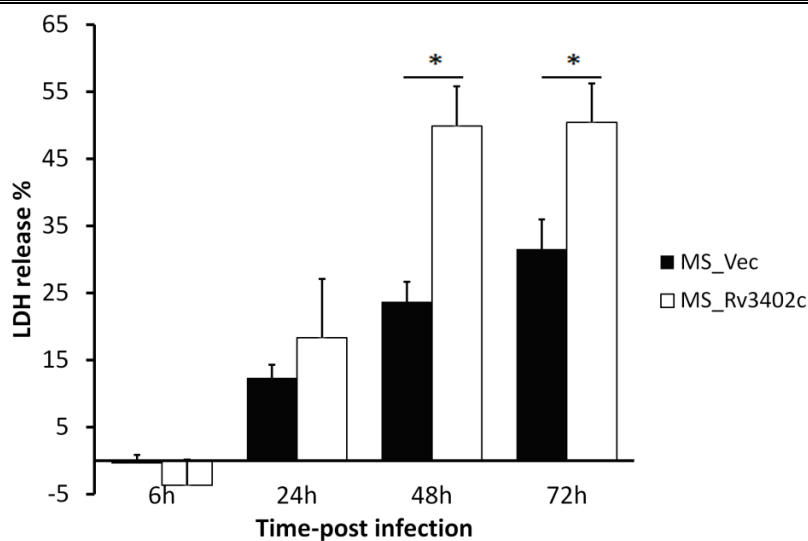


图 8. 感染重组耻垢分枝杆菌后的 U-937 细胞系的 LDH 含量分析。

Fig. 8 Assay of cell death in macrophages infected with recombinant *M. smegmatis*. Culture supernatants were collected from mono-layers of U-937 infected at a MOI of 10:1 with MS_Vec or MS_Rv3402c and the release of LDH as a measure of macrophage cell death was estimated at various time points. Data are shown as means \pm SD of triplicate wells. Similar results were obtained in three independent experiments.

4.8 表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌影响巨噬细胞的细胞因子分泌

为了探索 Rv3402c 是否能干扰巨噬细胞的信号通路, 我们比较了 U-937 细胞被 MS_Vec 和 MS_Rv3402c 感染后的细胞因子分泌情况。ELISA 实验结果显示, MS_Rv3402c 刺激 U-937 细胞产生促炎性因子 TNF- α 和 IL-1 β 的能力明显高于 MS_Vec (图 9A 和 C)。半定量 RT-PCR 结果也显示, 与对照菌株 MS_Vec 相比, 重组菌株 MS_Rv3402c 攻击 U-937 细胞 12 小时后, 这两种促炎性因子的转录水平也明显增加 (图 9B 和 D)。为了证明 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌是由 Rv3402c 直接引起的, 我们使用重组蛋白 rRv3402c 处理 U-937 细胞。如 Fig. 10A 和 B 所示, rRv3402c 引起宿主细胞 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌增加, 而这一增加效果在 rRv3402c 被蛋白酶 K 消化后, 也随之消失了。此外我们没有观察到 Rv3402c 对其它细胞因子如 IL-6、IL-10、和 IL-12p40 的影响 (图片未显示)。综合以上结果, 我们发现表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌或 Rv3402c 的重组蛋白能够影响巨噬细胞的细胞因子分泌。

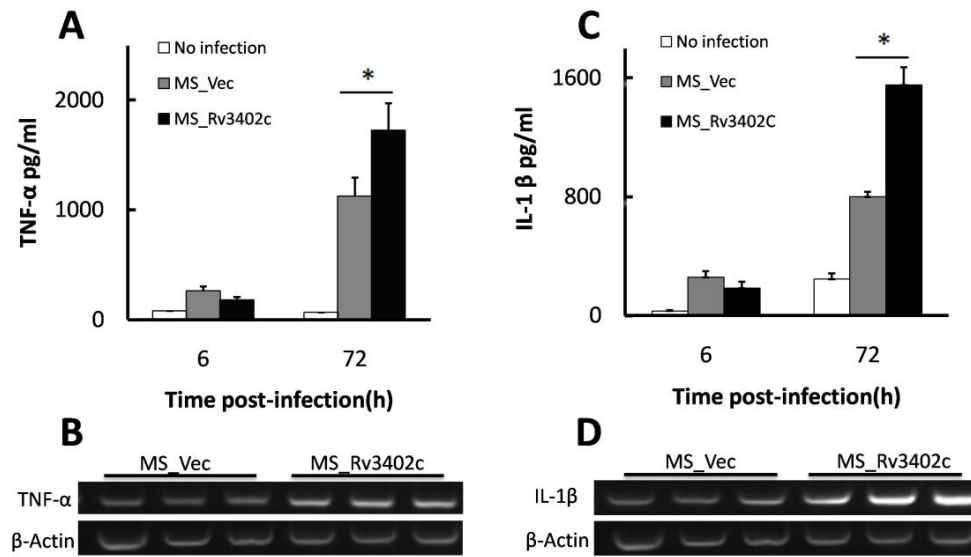


图 9. Rv3402c 对类巨噬细胞 U-937 细胞因子分泌的影响。

Fig. 9 Rv3402c induces the secretion of TNF- α and IL-1 β in infected macrophages. Culture supernatants were harvested after 6 or 72 h of infection and the concentrations of TNF- α (A) and IL-1 β (C) were determined. Cells were harvested after 12 h of infection and semi-quantitative RT-PCR analysis of TNF- α (B) and IL-1 β (D) mRNA level was performed. Each three lanes in the RT-PCR analysis are replicates of a single time point. Similar results were obtained in three independent experiments.

4.9 表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌通过 NF- κ B, ERK 和 p38 途径促进巨噬细胞分泌 TNF- α 和 IL-1 β

文献报道 NF- κ B 是触发 TNF- α 转录的主要转录因子 [36,37,38], 巨噬细胞中 ERK 1/2 的激活对于 TNF- α 的表达至关重要 [39,40], 而且 MAPK 信号途径在分枝杆菌感染巨噬细胞过程中也很关键 [39,41]。感染重组菌后 U-937 细胞增加 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌这一结果暗示重组菌可能影响了 U-937 细胞的信号通路。为了验证这一假设, 我们使用 NF- κ B、ERK 和 p38 等信号通路的抑制剂处理 U-937 细胞系, 观察其被重组耻垢分枝杆菌感染后细胞因子的分泌情况。如图 10C 和 D 所示, NF- κ B 抑制剂 TPCK [42]、ERK 1/2 抑制剂 PD 98,059 和 p38 抑制剂 SB 202190 都能够强烈地抑制 MS_Rv3402c 诱导的 TNF- α 的分泌作用; 不过只有 NF- κ B 抑制剂和 ERK 1/2 抑制剂能够强烈抑制 MS_Rv3402c 诱导的 IL-1 β 的分泌作用。使用 rRv3402c 重复以上实验, 我们可以得到类似的抑制效果, 且这几个抑制剂对于 TNF- α 分泌作用的抑制呈现剂量依赖现象 (图 10E)。以上结果显示, 重组菌 MS_Rv3402c 或重组蛋白 rRv3402c 诱导的 TNF- α 和 IL-1 β 的分泌依赖于 NF- κ B、ERK 和 p38 信号通路。

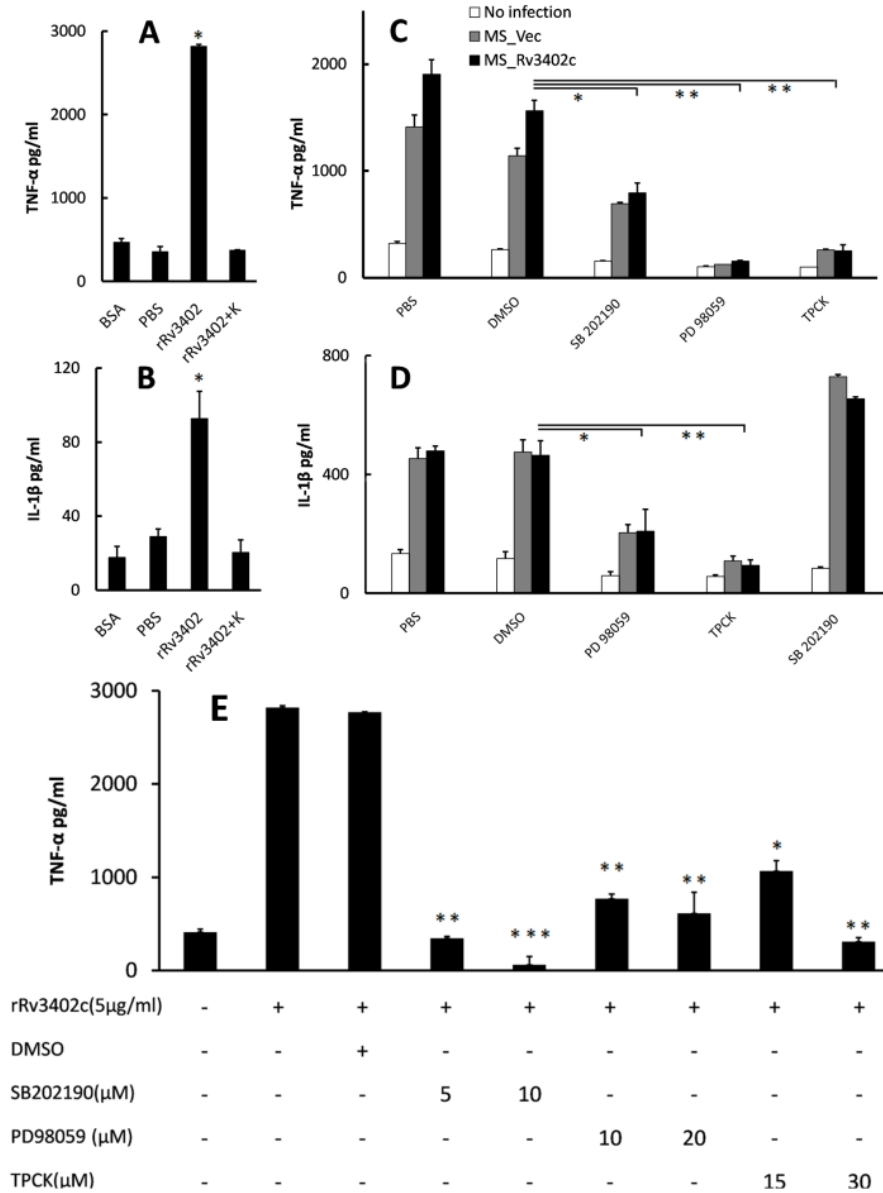


图 10. Rv3402c 诱导的细胞因子分泌依赖于 NF-κB, ERK 和 p38 信号通路。

Fig. 10. Rv3402c alters the activation levels of NF-κB, ERK and p38 in macrophages infected with *M. smegmatis*. Culture supernatants were harvested after 12 h of treatment with rRv3402c at the concentration of 5 μg/ml and the concentrations of TNF-α (A) and IL-1β (B) were determined. U-937 cells were pre-treated with 30 μM TPCK (a NF-κB inhibitor) or with 20 μM PD 98059 (an ERK1/2 inhibitor) or with 10 μM SB 202190 (a p38 inhibitor). Treatment with DMSO served as a control for the inhibitor treatments. After 1 h, the macrophages were infected with MS_Vec at an MOI of 10 or treated with rRv3402c at the concentration of 5 μg/ml. Protease K (K) used to digest the recombinant protein. Culture supernatants were harvested after 24 h of infection and the concentrations of TNF-α (C, E) and IL-1β (D) were determined. (A), (B) and (E) are performed with recombinant protein; (C) and (D) are performed with *M. smegmatis* strains. The data are representative of two independent experiments.

5 讨论

致病性分枝杆菌能够在巨噬细胞内滞留感染的原因之一是它能够分泌一些效应分子来干扰宿主的信号通路。目前为止,人们已经鉴定出一些结核杆菌的效应分子能够抑制吞噬体成熟。越来越多分泌蛋白的发现,将有助于了解结核杆菌的致病机制以及宿主相应的对抗机制,最终将有利于更加有效的疫苗和抗痨药物的开发。

耻垢分枝杆菌是一种非致病腐生型分枝杆菌,进入宿主后迅速被巨噬细胞清除掉,这些特性使得耻垢分枝杆菌可以作为研究结核杆菌毒力蛋白的理想替代模型,而且目前也已经有大量的文献运用了这一模型 [26,32,33,43,44,45,46,47,48,49]。本研究利用该模型发现 Rv3402c 蛋白可能通过干扰宿主细胞的先天免疫反应从而削弱其杀菌能力,从而间接地增强了重组耻垢分枝杆菌的胞内存活能力;而且似乎 Rv3402c 蛋白扰乱了宿主细胞的正常功能,造成 U-937 细胞大量死亡。这些结果没有在空载体对照菌中表现出来,说明是 Rv3402c 特异性介导的。重组菌 MS_Rv3402c 和对照菌 MS_Vec 在无菌培养基中显示出相同的生长速率,而且其抗压能力也不相上下,这暗示 MS_Rv3402c 胞内存活能力的增强可能是 Rv3402c 蛋白干扰宿主细胞的先天免疫的结果。有意思的是,我们观察到重组菌在人源类巨噬细胞 U-937 和鼠源巨噬细胞 RAW264.7 中的存活率存在差异。我们推测这可能是由于这两种巨噬细胞模型之间巨大的种系差异造成的。比如和野生型结核杆菌相比,结核杆菌 *ptpA* 缺失株在人源巨噬细胞 THP-1 中显示生存率降低 [9,10];然而同样的缺失菌株在小鼠模型[50]以及小鼠巨噬细胞模型 J774 细胞 (Yossef Av-Gay 实验室,未发表数据)中却没有显示出任何生长缺陷。目前 Yossef Av-Gay 实验室正在解析导致该差异的具体原因。因此,我们也不应排除 Rv3402c 可能与 U-937 细胞中某个受体结合,而恰好该受体在 RAW264.7 细胞中存在差异。

尽管我们的实验结果显示 Rv3402c 在重组耻垢分枝杆菌与宿主细胞的相互作用中起到某种作用,但是其具体的功能目前仍未解析。TubercuList 网站 (<http://tuberculist.epfl.ch/index.html>)将 Rv3402c 注释为一个功能保守的蛋白。有文献预测 Rv3402c 可能参与类脂多糖分子的生物合成过程 [21]。通过 NCBI 网站的 BLAST 工具,我们也发现 Rv3402c 分别与 *Bacillus cereus* 的脂多糖合成蛋白以及参与 *Rheinheimera sp.* 细胞壁合成的 PLP 依赖性酶具有较高的序列相似性。根据这些线索我们考察了 Rv3402c 是否会影响重组耻垢分枝杆菌细胞表面的特性。我们发现过表达 Rv3402c——尽管其能够暴露于重组耻垢分枝杆菌的细胞表面——并没有影响耻垢分枝杆菌的菌落形态。进一步使用 GC-MS 方法也没有观察到该蛋白对耻垢分枝杆菌细胞壁脂肪酸的影响。

尽管我们对 Rv3402c 的功能及生理作用知之甚少，但是根据本课题的研究结果，尤其是该蛋白定位于细胞表面使其具有与细菌细胞外环境接触的机会，我们应该更进一步研究 Rv3402c 作为一个细胞膜或者细胞壁相关蛋白的功能。在进行蛋白酶 K 和胰蛋白酶敏感性分析实验时，我们为了避免某个质粒对蛋白质性质产生的潜在影响而选取了另一个在分枝杆菌属广泛采用的质粒 pALACE。这些在活菌中进行的实验显示携带 His 标签的 Rv3402c 蛋白只有部分暴露在重组耻垢分枝杆菌的细胞表面。虽然这一结果与亚细胞定位实验的结果相符，但为什么只有较少一部分目的蛋白定位于细菌表面？这或许是因为本研究使用的重组菌株表达 Rv3402c 的量是其正常生理条件下表达量的上百甚至上千倍，细菌本身来不及将如此多的蛋白质转运到细菌细胞表面，从而造成大量蛋白质滞留在细胞质中所致。通过文献调研我们发现这一现象具有普遍性，许多结核杆菌的蛋白质如 Rv2224c [51]、Rv0132c [28]、Eis [52]和 PknI [53]等都能在细胞质以及细胞表面检测到。

作为一个关键的促炎性细胞因子，TNF- α 在宿主免疫系统抵抗结核杆菌感染过程中扮演着十分重要的角色 [54,55]。和其它致病性分枝杆菌相比，耻垢分枝杆菌能够强烈刺激巨噬细胞分泌 TNF- α [56]。这和我们观察到的现象一致：和未感染组相比，感染了空载体耻垢分枝杆菌的巨噬细胞能够分泌更多的 TNF- α 。TNF- α 分泌的增加被认为是结核杆菌在人类巨噬细胞中滞留并致病的重要因素 [45]。文献报道结核杆菌的某些组分能够刺激单核细胞或巨噬细胞大量产生 TNF- α [45,57,58,59]。另有研究显示人单核细胞 [60,61] 或肺泡巨噬细胞 [62] 中结核杆菌的繁殖和播散往往伴随着 TNF- α 的大量分泌以及对细胞的毒害作用。这些研究也和我们的实验结果吻合：表达 Rv3402c 蛋白的重组耻垢分枝杆菌感染 U-937 细胞后，巨噬细胞的 TNF- α 分泌量随之增加，且细胞开始大量裂解释放乳酸脱氢酶。通过信号通路抑制剂实验，我们发现 NF- κ B、ERK1/2 和 p38 信号途径对于 Rv3402c 诱导的 TNF- α 分泌是必需的。不过只有 NF- κ B 和 ERK1/2 信号通路是 Rv3402c 诱导的 IL-1 β 分泌所需的，而 p38 途径不影响其分泌。这说明 Rv3402c 刺激这两种细胞因子分泌的信号途径可能有差异。这些结果揭示 Rv3402c 可能通过干扰宿主的信号途径来扰乱宿主的免疫应答，最终导致细菌的胞内存活率提高。

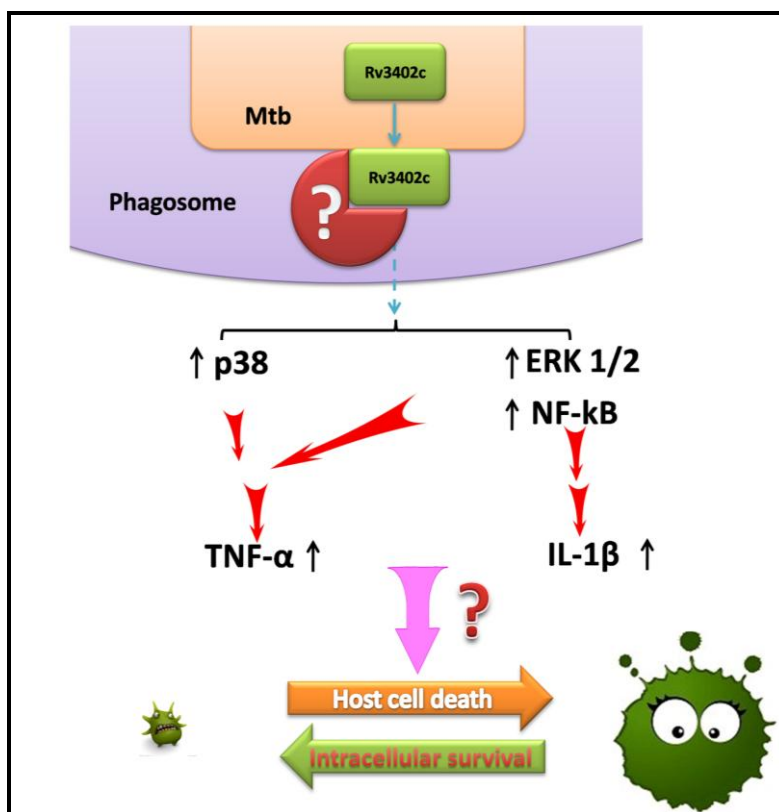


图 11. Rv3402c 参与宿主-病原菌相互作用示意图。

Fig. 11. Disruption of host macrophage cellular processes by Mtb Rv3402c.

总而言之，本研究结果显示 Rv3402c 可能赋予了重组耻垢分枝杆菌某些特性，从而增强后者的胞内存活能力、降低宿主的活性并能修饰宿主的免疫应答(图 11)。这为解析结核杆菌与宿主之间相互作用网络提供了一些新的线索。但仍然有许多问题有待解决。如具体是哪个或哪些宿主蛋白与 Rv3402c 作用(图 11 中暗红色圆圈所示)? 各个信号通路到细胞因子产生之间的信号是如何传递的(图 11 中红色箭头所示)? 细胞因子又是如何影响宿主细胞的裂解以及促进耻垢分枝杆菌的存活的(图 11 中粉红色箭头所示)? 进一步弄清楚 Rv3402c 在宿主信号通路以及免疫应答中所起到的作用能加强我们对结核杆菌致病性的了解。当然，直接使用结核杆菌的 Rv3402c 敲除菌株来研究该基因的功能无疑是最具说服力的。

参考文献

1. Flannagan RS, Cosio G, Grinstein S (2009) Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol* 7: 355-366.
2. De Voss JJ, Rutter K, Schroeder BG, Su H, Zhu Y, et al. (2000) The salicylate-derived mycobactin siderophores of *Mycobacterium tuberculosis* are essential for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1252-1257.
3. Li W, Xie J (2011) Role of mycobacteria effectors in phagosome maturation blockage and new

- drug targets discovery. *J Cell Biochem*.
4. Ng VH, Cox JS, Sousa AO, MacMicking JD, McKinney JD (2004) Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenesis: countering the phagocyte oxidative burst. *Mol Microbiol* 52: 1291-1302.
 5. Fridovich I (1995) Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64: 97-112.
 6. Spagnolo L, Toro I, D'Orazio M, O'Neill P, Pedersen JZ, et al. (2004) Unique features of the sodC-encoded superoxide dismutase from *Mycobacterium tuberculosis*, a fully functional copper-containing enzyme lacking zinc in the active site. *J Biol Chem* 279: 33447-33455.
 7. Wilson T, de Lisle GW, Marcinkeviciene JA, Blanchard JS, Collins DM (1998) Antisense RNA to ahpC, an oxidative stress defence gene involved in isoniazid resistance, indicates that AhpC of *Mycobacterium bovis* has virulence properties. *Microbiology* 144 (Pt 10): 2687-2695.
 8. Master SS, Springer B, Sander P, Boettger EC, Deretic V, et al. (2002) Oxidative stress response genes in *Mycobacterium tuberculosis*: role of ahpC in resistance to peroxynitrite and stage-specific survival in macrophages. *Microbiology* 148: 3139-3144.
 9. Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z, Av-Gay Y (2008) *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe* 3: 316-322.
 10. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y (2011) *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 19371-19376.
 11. Cowley S, Ko M, Pick N, Chow R, Downing KJ, et al. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. *Mol Microbiol* 52: 1691-1702.
 12. Walburger A, Koul A, Ferrari G, Nguyen L, Prescianotto-Baschong C, et al. (2004) Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages. *Science* 304: 1800-1804.
 13. Vergne I, Chua J, Lee HH, Lucas M, Belisle J, et al. (2005) Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 4033-4038.
 14. van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, et al. (2007) *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell* 129: 1287-1298.
 15. Velmurugan K, Chen B, Miller JL, Azogue S, Gurses S, et al. (2007) *Mycobacterium tuberculosis* nuoG Is a Virulence Gene That Inhibits Apoptosis of Infected Host Cells. *PLoS Pathogens* 3: e110.
 16. Miller JL, Velmurugan K, Cowan MJ, Briken V (2010) The type I NADH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF-alpha-mediated host cell apoptosis. *PLoS Pathog* 6: e1000864.

17. Blomgran R, Desvignes L, Briken V, Ernst JD (2012) *Mycobacterium tuberculosis* inhibits neutrophil apoptosis, leading to delayed activation of naive CD4 T cells. *Cell Host Microbe* 11: 81-90.
18. Braunstein M, Espinosa BJ, Chan J, Belisle JT, Jacobs WR, Jr. (2003) SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol* 48: 453-464.
19. Kurtz S, McKinnon KP, Runge MS, Ting JP, Braunstein M (2006) The SecA2 secretion factor of *Mycobacterium tuberculosis* promotes growth in macrophages and inhibits the host immune response. *Infect Immun* 74: 6855-6864.
20. Li W, He J, Xie L, Chen T, Xie J (2013) Comparative Genomic Insights Into the Biosynthesis and Regulation of Mycobacterial Siderophores. *Cell Physiol Biochem* 31: 1-13.
21. Gold B, Rodriguez GM, Marras SA, Pentecost M, Smith I (2001) The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Mol Microbiol* 42: 851-865.
22. Schnappinger D, Ehrt S, Voskuil MI, Liu Y, Mangan JA, et al. (2003) Transcriptional adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages: Insights into the phagosomal environment. *Journal of Experimental Medicine* 198: 693-704.
23. Pandey AK, Raman S, Proff R, Joshi S, Kang CM, et al. (2009) Nitrile-inducible gene expression in mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 89: 12-16.
24. Zhang Z, Zhang ZY, Schittenhelm J, Wu Y, Meyermann R, et al. (2011) Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains. *J Neuroimmunol* 237: 73-79.
25. Cowley SC, Av-Gay Y (2001) Monitoring promoter activity and protein localization in *Mycobacterium* spp. using green fluorescent protein. *Gene* 264: 225-231.
26. Li JM, Li N, Zhu DY, Wan LG, He YL, et al. (2008) Isocitrate lyase from *Mycobacterium tuberculosis* promotes survival of *Mycobacterium smegmatis* within macrophage by suppressing cell apoptosis. *Chin Med J (Engl)* 121: 1114-1119.
27. Ji L, Long Q, Yang D, Xie J (2011) Identification of mannich base as a novel inhibitor of *Mycobacterium tuberculosis* isocitrate by high-throughput screening. *Int J Biol Sci* 7: 376-382.
28. Bashiri G, Perkowski EF, Turner AP, Feltcher ME, Braunstein M, et al. (2012) Tat-Dependent Translocation of an F(420)-Binding Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 7: e45003.
29. Rengarajan J, Murphy E, Park A, Krone CL, Hett EC, et al. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* Rv2224c modulates innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 264-269.
30. Chaturvedi R, Bansal K, Narayana Y, Kapoor N, Sukumar N, et al. (2010) The multifunctional PE_PGRS11 protein from *Mycobacterium tuberculosis* plays a role in regulating resistance to oxidative stress. *J Biol Chem* 285: 30389-30403.

31. Reddy PV, Puri RV, Khera A, Tyagi AK (2011) Iron Storage Proteins Are Essential for the Survival and Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 Macrophages and the Guinea Pig Model of Infection. *Journal of Bacteriology* 194: 567-575.
32. Pelosi A, Smith D, Brammananth R, Topolska A, Billman-Jacobe H, et al. (2012) Identification of a Novel Gene Product That Promotes Survival of *Mycobacterium smegmatis* in Macrophages. *PLoS One* 7: e31788.
33. Daim S, Kawamura I, Tsuchiya K, Hara H, Kurenuma T, et al. (2011) Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* PPE37 protein in *Mycobacterium smegmatis* induces low tumour necrosis factor alpha and interleukin 6 production in murine macrophages. *Journal of Medical Microbiology* 60: 582-591.
34. Stover CK, de la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, et al. (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 351: 456-460.
35. Dong D, Wang D, Li M, Wang H, Yu J, et al. (2012) PPE38 modulates the innate immune response and is required for *Mycobacterium marinum* virulence. *Infect Immun* 80: 43-54.
36. Collart MA, Baeuerle P, Vassalli P (1990) Regulation of tumor necrosis factor alpha transcription in macrophages: involvement of four kappa B-like motifs and of constitutive and inducible forms of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 10: 1498-1506.
37. Kuprash DV, Udalova IA, Turetskaya RL, Kwiatkowski D, Rice NR, et al. (1999) Similarities and differences between human and murine TNF promoters in their response to lipopolysaccharide. *J Immunol* 162: 4045-4052.
38. Baeuerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179.
39. Yadav M, Roach SK, Schorey JS (2004) Increased mitogen-activated protein kinase activity and TNF-alpha production associated with *Mycobacterium smegmatis*- but not *Mycobacterium avium*-infected macrophages requires prolonged stimulation of the calmodulin/calmodulin kinase and cyclic AMP/protein kinase A pathways. *J Immunol* 172: 5588-5597.
40. Jo EK, Yang CS, Choi CH, Harding CV (2007) Intracellular signalling cascades regulating innate immune responses to *Mycobacteria*: branching out from Toll-like receptors. *Cell Microbiol* 9: 1087-1098.
41. Pathak SK, Bhattacharyya A, Pathak S, Basak C, Mandal D, et al. (2004) Toll-like receptor 2 and mitogen- and stress-activated kinase 1 are effectors of *Mycobacterium avium*-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J Biol Chem* 279: 55127-55136.
42. Kengatharan M, De Kimpe SJ, Thiemermann C (1996) Analysis of the signal transduction in the induction of nitric oxide synthase by lipoteichoic acid in macrophages. *Br J Pharmacol* 117: 1163-1170.
43. Kuprash DV, Alimzhanov MB, Tumanov AV, Anderson AO, Pfeffer K, et al. (1999) TNF and lymphotoxin beta cooperate in the maintenance of secondary lymphoid tissue microarchitecture but not in the development of lymph nodes. *J Immunol* 163: 6575-6580.

44. Huang Y, Wang Y, Bai Y, Wang ZG, Yang L, et al. (2010) Expression of PE_PGRS 62 protein in *Mycobacterium smegmatis* decrease mRNA expression of proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 in macrophages. *Molecular and Cellular Biochemistry* 340: 223-229.
45. Dheenadhayalan V, Delogu G, Brennan MJ (2006) Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes Infect* 8: 262-272.
46. Nair S, Ramaswamy PA, Ghosh S, Joshi DC, Pathak N, et al. (2009) The PPE18 of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with TLR2 and activates IL-10 induction in macrophage. *J Immunol* 183: 6269-6281.
47. Delogu G, Pusceddu C, Bua A, Fadda G, Brennan MJ, et al. (2004) Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol* 52: 725-733.
48. Lagier B, Pelicic V, Lecossier D, Prod'homme G, Raubert J, et al. (1998) Identification of genetic loci implicated in the survival of *Mycobacterium smegmatis* in human mononuclear phagocytes. *Mol Microbiol* 29: 465-475.
49. Iantomasi R, Sali M, Cascioferro A, Palucci I, Zumbo A, et al. (2011) PE_PGRS30 is required for the full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell Microbiol*.
50. Grundner C, Cox JS, Alber T (2008) Protein tyrosine phosphatase PtpA is not required for *Mycobacterium tuberculosis* growth in mice. *FEMS Microbiol Lett* 287: 181-184.
51. Rengarajan J, Murphy E, Park A, Krone CL, Hett EC, et al. (2008) *Mycobacterium tuberculosis* Rv2224c modulates innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 264-269.
52. Dahl JL, Wei J, Moulder JW, Laal S, Friedman RL (2001) Subcellular localization of the intracellular survival-enhancing Eis protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 69: 4295-4302.
53. Singh A, Singh Y, Pine R, Shi L, Chandra R, et al. (2006) Protein kinase I of *Mycobacterium tuberculosis*: cellular localization and expression during infection of macrophage-like cells. *Tuberculosis (Edinb)* 86: 28-33.
54. Jacobs M, Togbe D, Fremont C, Samarina A, Allie N, et al. (2007) Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection. *Microbes Infect* 9: 623-628.
55. Roach DR, Briscoe H, Saunders B, France MP, Riminton S, et al. (2001) Secreted lymphotoxin-alpha is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J Exp Med* 193: 239-246.
56. Roach DR, Bean AG, Demangel C, France MP, Briscoe H, et al. (2002) TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection. *J Immunol* 168: 4620-4627.
57. Lee JS, Song CH, Lim JH, Kim HJ, Park JK, et al. (2003) The production of tumour necrosis factor-alpha is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of *Mycobacterium*

- tuberculosis*. Clin Exp Immunol 132: 443-449.
58. Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, et al. (2006) The mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. Infect Immun 74: 2686-2696.
59. Kim KH, Yang CS, Shin AR, Jeon SR, Park JK, et al. (2011) Mycobacterial Heparin-binding Hemagglutinin Antigen Activates Inflammatory Responses through PI3-K/Akt, NF-kappaB, and MAPK Pathways. Immune Netw 11: 123-133.
60. Byrd TF (1997) Tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) promotes growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes iron-mediated growth suppression is correlated with decreased release of TNFalpha from iron-treated infected monocytes. J Clin Invest 99: 2518-2529.
61. Silver RF, Li Q, Boom WH, Ellner JJ (1998) Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes: requirement for CD4+ T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. J Immunol 160: 2408-2417.
62. Engele M, Stossel LE, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, et al. (2002) Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. Journal of Immunology 168: 1328-1337.

第 5 章 结核分枝杆菌蛋白酪氨酸激酶 A 的底物鉴定及其生理学作用研究

1 引言

蛋白酪氨酸磷酸酶 A (protein tyrosine phosphatase A, PtpA) 是结核菌中的明星分子, 它是研究最深入的毒力蛋白之一。截止目前, 人们在宿主细胞内鉴定出了大量的 PtpA 底物, 如 VPS33B (human vacuolar protein sorting 33B) [1]、 H^+ -ATPase 中的 H 亚基 [2]、糖原合酶激酶 (glycogen synthase kinase 3 α , GSK3 α) [3]、宿主接头蛋白 TAB3 [4] 以及最新发现的参与宿主细胞能量代谢的三功能酶 (trifunctional enzyme, TFP) 的 α 亚基、ATP 合酶的 α 亚基、硫化醌氧化还原酶 (sulfide quinone oxidoreductase, SQRD) 及 6-磷酸果糖激酶 [5] 等。PtpA 与这些宿主分子相互作用, 通过抑制巨噬细胞凋亡和宿主天然免疫, 阻止吞噬体的酸化并阻断其与溶酶体的融合等手段帮助结核菌逃避宿主的杀灭作用并建立潜伏感染 [1,2,3,4]。PtpA 在结核菌致病性中的重要性使其成为抗痨药物的明星靶点 [6]。然而开发靶向 PtpA 药物存在一大缺陷, 即它在人体内有同源蛋白, 且许多涉及酶活性的关键残基都较为保守, 这就要求靶向 PtpA 的药物必需要克服与宿主蛋白的作用。因此, 靶向 PtpA 的上游调控蛋白或许是解决这一难题的关键。

蛋白酪氨酸激酶 A (protein tyrosine kinase, PtkA) 就是 PtpA 的一个上游调控蛋白。PtkA 是结核菌中唯一的蛋白酪氨酸激酶, 除自身外, 目前其唯一底物是 PtpA [7]。在结核菌基因组上, *ptkA*、*ptpA* 和一个编码跨膜蛋白的 *rv2235* 基因 [8] 很有可能位于同一个操纵子内: 因为它们顺序排列、转录方向一致且碱基之间互相有重叠。有研究预测 PtkA 蛋白可能定位于结核菌细胞表面 [9]。基于 PtkA 的亚细胞定位, 有人假设 PtkA 可能介导 PtpA 的分泌或维持 PtpA 在宿主巨噬细胞内的活性 [10]。研究显示 PtkA 磷酸化 PtpA 的 128 位和 129 位的酪氨酸残基 (Tyr), 这两个氨基酸残基与 126 位的天冬氨酸 (Asp) 残基 (PtpA 关键的催化位点) 都位于 PtpA 的 D 环内 [7]。当 PtpA 结合去磷酸化底物时, 其 D 环的构象从一个“开”的状态转变为“关”的状态 [11]。因此, PtkA 对 PtpA 的两个位于 D 环内的酪氨酸残基的磷酸化有可能会调节 PtpA D 环的构象变化, 从而调控 PtpA 的磷酸酶活性 [10]。而 Av-Gay 实验室最新研究也证实了 PtkA 通过磷酸化 PtpA 来增强后者的蛋白酪氨酸磷酸酶活性 [12]。

基于 PtkA 作为 PtpA 的调控蛋白有如此重要的作用, 探索 PtkA 在结核菌的致病性及生理过程中的作用显得意义重大。因此 Av-Gay 实验室构建了结核菌 Δ *ptkA* 突变株, 利用反向遗传学方法发现 Δ *ptkA* 突变株在致死剂量和非致死剂量的 H_2O_2

及氢过氧化枯烯 (cumene hydroperoxide) 条件下存活率明显高于结核菌野生株 (未发表数据)。这就暗示, PtkA 作为蛋白酪氨酸激酶, 可能还有其它底物存在。尽管除了 PtkA 和 PtpA 之外, 结核菌中目前还没有发现其它的蛋白酪氨酸激酶底物, 但 Chow 等人的研究结果提示结核菌中肯定还存在其它的蛋白酪氨酸激酶底物 [13]。因此, 本研究的目标就是鉴定 PtpA 调控蛋白 PtkA 在结核菌中的其它底物并揭示 PtkA 在结核菌致病性及生理过程的作用机制, 为抗痨药物的开发提供理论基础。

2 实验材料

2.1 主要试剂

各种限制性内切酶、KOD DNA 聚合酶以及 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas (Burlington, ON, Canada) 或者 New England Biolabs (NEB) 公司 (Ipswich, MA)。LB 培养基及琼脂购自 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA)。OADC 的成分 [油酸 (Oleic acid)、葡萄糖及触酶 (catalase)]、7H9 及 7H10 购自 Difco Laboratories (Detroit, MI)。卡那霉素购自 Gibco Laboratories。潮霉素购自 Roche。MinElute PCR 产物纯化试剂盒、质粒抽提试剂盒及蛋白纯化用镍柱等购自 Qiagen (Mississauga, ON, Canada)。 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP 购自 Perkin Elmer (Boston, MA)。激酶通用底物髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein) 购自 Sigma 公司。其它试剂购自 Fisher Scientific 或 Sigma。

2.2 实验菌株及培养条件

大肠杆菌工程菌株如 DH5a 和 BL21(DE3) 等为 Av-Gay 实验室保存, 培养于 LB 固体或液体培养基上。耻垢分枝杆菌 (*M. smegmatis* mc²155) 及其相应的衍生菌株为 Av-Gay 实验室保存, 在 37 °C 环境下培养于 Middlebrook (MB) 7H9 液体培养基或 MB 7H10 固体培养基上, 培养基中添加 0.2% (w/v) 葡萄糖, 0.5% (v/v) 甘油以及 0.05% (v/v) Tween 80。结核分枝杆菌 H37Rv 标准株及其相应的衍生菌株为 Av-Gay 实验室保存, 在 37 °C 环境下培养于苏通培养基、MB 7H9 液体培养基或 MB 7H10 固体培养基上, 添加 10% OADC (油酸、葡萄糖和触酶混合物) 和 0.05% Tween-80 (Sigma-Aldrich) 于后两个培养基中。

2.3 抗体

Anti-His mouse primary antibody 购自 Abm Inc., Anti-GFP mouse primary antibody 购自 Boehringer Mannheim Corp.。Rabbit anti-PtpA 参看文献 [14], Rabbit anti-TrxB2、Rabbit anti-PtkA 和 Rabbit anti-DosR 均在 Av-Gay 实验室纯化出蛋白后在 YenZym Antibodies 公司 (Canada) 制备成一抗。Secondary Alexa Fluor 660-conjugated goat anti-mouse IgG 和 Alexa Fluor 680-conjugated goat anti-rabbit IgG

购自 Life technologies Corp., Canada。

3 实验方法

3.1 基因克隆, 蛋白表达与纯化

表达PtkA蛋白的重组菌株BL21(ED3)-pET151D/TOPO-*ptkA*保存于Av-Gay实验室, 蛋白的表达与纯化条件参考文献 [7]。表达TrxC蛋白的重组菌株BL21(ED3)-pET22b(+)-*trx*C保存于Av-Gay实验室, 蛋白的表达与纯化条件参考文献 [15]。所有结核菌基因的克隆模板均为结核分枝杆菌H37Rv标准株基因组。所涉及的质粒及引物信息见表1。

表1. 研究中涉及的质粒及引物

Table 1. Primers and plasmids used in this study.

质粒	特征	来源及参考文献
pET151D/TOPO	产生 N 末端组氨酸标签融合蛋白, Amp ^R	Invitrogen
pET151D/TOPO- <i>ptkA</i>	pET151D/TOPO 携带 <i>ptkA</i> 基因, Amp ^R	[7]
pALACE	产生 N 末端组氨酸标签融合蛋白, Hgy ^R	本实验室
pALACE- <i>ptkA</i>	pALACE 携带 <i>ptkA</i> 基因, Hgy ^R	本实验室
pMAL-c5x	产生 N 末端 MBP 标签融合蛋白, Amp ^R	Invitrogen
pMAL-c5x- <i>ptkA</i>	pMAL-c5x 携带 <i>ptkA</i> 基因, Amp ^R	本研究
pET22a(+)	产生 C 末端组氨酸标签融合蛋白, Amp ^R	Invitrogen
pET22a(+)- <i>ptkA</i>	pET22a(+)携带 <i>ptkA</i> 基因, Amp ^R	本研究
pET30b(+)	产生 N 末端组氨酸标签融合蛋白, Kan ^R	Invitrogen
pET30b(+)- <i>trx</i> B2	pET30b(+)携带 <i>trx</i> B2 基因, Kan ^R	本研究
pET30b(+)- <i>trx</i> B2 突变体	pET30b(+)携带 <i>trx</i> B2 突变体基因, Kan ^R	本研究
引物	序列	限制性酶切位点
pET22a(+)- <i>ptkA</i> -For	5' CGTCATATGGTGTCTTCGCCTCGTG 3'	Nde I
pET22a(+)- <i>ptkA</i> -Rev	5' ATCAAGCTTGACACCTAGCGCCTCC 3'	Hind III
pMAL-c5x- <i>ptkA</i> -For	5' TTTCATATGGTGTCTTCGCCTCGTG 3'	Nde I
pMAL-c5x- <i>ptkA</i> -Rev	5' TTTAAGCTTTCAGACACCTAGCGCC 3'	Hind III
pET22a(+)- <i>rv</i> 1310-For	5' GCCCATATGATGACTACCACTGCCG 3'	Nde I
pET22a(+)- <i>rv</i> 1310-Rev	5' TATAAAGCTTCAGCTTGGCGCCGAGAC 3'	Hind III
pET22a(+)- <i>rv</i> 0384c-For	5' CGTCATATGGTGGACTCGTTTAACCC 3'	Nde I
pET22a(+)- <i>rv</i> 0384c-Rev	5' TTTAAGCTTGGCCAGGATCAGCGAGT 3'	Hind III
pET28a(+)- <i>rv</i> 2222-For	5' GGGCATATGATGGACCGACAGAAGG 3'	Nde I
pET28a(+)- <i>rv</i> 2222-Rev	5' GCTAAGCTTCAGCGACAGGTAGGTGC 3'	Hind III
pET28a(+)- <i>rv</i> 0322-For	5' TGTCATATGGTGCATGCAGCGTC 3'	Nde I
pET28a(+)- <i>rv</i> 0322-Rev	5' TTTAAGCTTATCGCGCACTCCCAGC 3'	Hind III

pET22a(+)-rv0685-For	5'	TTACATATGGTGGCGAAGGCGAAGT	3'	Nde I
pET22a(+)-rv0685-Rev	5'	GCGGAAGCTTCTTGATGATCTTGG	3'	Hind III
pET22a(+)-rv1023-For	5'	GAGCATATGGTGCCGATTATCGAGC	3'	Nde I
pET22a(+)-rv1023-Rev	5'	TTGAAGCTTTTTTCGTCTCGCACGC	3'	Hind III
pET22a(+)-rv0949-For	5'	TTTCATATGATGAGTGTGCACGCG	3'	Nde I
pET22a(+)-rv0949-Rev	5'	GTTAAGCTTGAGCTTGGTGACAGGG	3'	Hind III
pET30b(+)-trxB2-For	5'	ATATATTGAATTCGATGACCGCCCCGCC		EcoR I
pET30b(+)-trxB2-Rev	5'	ATATATCTCGAGTCATCGTTGTGCTCC		Xho I
pET30b(+)-trxB2 ^{Y27A} -For	5'	CGCGGGG <u>GCT</u> ACTGCGGCGCTCTA	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y27A} -Rev	5'	TAGAGCGCCGAGT <u>AGC</u> CCCCG	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y32A} -For	5'	GCTC <u>GCA</u> GCCGCCCCGTGCCAGCT	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y32A} -Rev	5'	AGCTGGGCACGGGCGGCT <u>TGC</u> GAGC	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y61A} -For	5'	ACGTGGAGAAC <u>GCA</u> CCGGGATTCGCAAC	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y61A} -Rev	5'	GTTGCGAAATCCCGT <u>TGC</u> GTTCTCCACGT	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y128A} -For	5'	AATGGGCGCAGCGGCACGC <u>GCT</u> CTGCAGGT	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y128A} -Rev	5'	ACCTGCAG <u>AGC</u> GCGTGCCGCTGCGCCATT	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y268A} -For	5'	TCGACCCGGACGGC <u>GCC</u> GTGTTGGTGCAG	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y268A} -Rev	5'	CTGCACCAACA <u>CGG</u> CGCCGTCCGGGTCGA	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y294A} -For	5'	TGGTGGATCGCAC <u>GCT</u> CGCCAGGCGGTTAC	3'	
pET30b(+)-trxB2 ^{Y294A} -Rev	5'	GTAACCGCCTGGCG <u>AGC</u> GGTGCATCCACCA	3'	

3.2 结核菌全菌体裂解液及滤液蛋白的制备

200ml 结核菌 H37Rv 7H9 液体培养基在 37°C 条件下滚动培养至 OD₆₀₀ 约为 1.0。4000 rpm 离心 10min 收集菌体，分为五等份。用蛋白提取缓冲液（20mM Tris-HCl，1mM DTT，1mM PMSF，pH=7.2）洗涤两次，最后重悬于 1/100 初始体积蛋白提取缓冲液中。称取 0.8g 重量的 0.1 mm 玻璃珠（Zirconia/silica）于 2ml 配套离心管中，加入细菌重悬液。用 ribolyzer（速度设定为 6.5，30s on，30s off）震荡 3-5 次。室温下 13000rpm 离心 5min 以去掉不可溶组分。上清通过 0.22 um 滤膜过滤收集，加入甘油至终浓度为 10%，分装 50μl/管，于 -70°C 冻存备用。（以上步骤均在加拿大不列颠哥伦比亚省疾控中心的 P3 实验室中完成）

3.3 基因定点突变实验

本研究利用重叠延伸 PCR 技术对 *trxB2* 基因进行定点突变，具体步骤参见文献 [16]。现以 *trxB2*^{Y27A} 为例来简要说明利用重叠延伸 PCR 技术进行基因定点突变的过程。该方法的关键是设计好四条引物：pET30b(+)-*trxB2*-For（简称为 F）和 pET30b(+)-*trxB2*-Rev（简称为 R）为侧翼引物，用于扩增全长的 *trxB2* 基因，其 5'

末端分别带有 NdeI 和 HindIII 酶切位点；pET30b(+)-*trx2*^{Y27A}-For (简称为 Fm) 和 pET30b(+)-*trx2*^{Y27A}-Rev (简称为 Rm) 为两条完全互补的引物，其中引入了目的突变位点 (见表 1 红色下划线标注碱基)。碱基的突变是通过 3 轮高保真 PCR 反应来完成的：第一轮利用 F 和 Rm 为引物，将 *trx2* 的前半段扩增出来；第二轮利用 Fm 和 R 为引物，将 *trx2* 后半段扩增出来。前两轮 PCR 可分别同时进行，产物经琼脂糖凝胶电泳分离、试剂盒纯化后等比例混合。取混合 PCR 产物为模板，以 F 和 R 为引物进行第三轮 PCR 扩增，产物即为引入了目的突变位点的 *trx2*^{Y27A} 基因。第一、二轮 PCR 为常规条件和体系，不表。第三轮 PCR 的体系如下 (50 μ l)：

ddH ₂ O	25 μ l
10 \times buffer	5 μ l
dNTP	5 μ l
MgSO ₄	2 μ l
DMSO	2.5 μ l
KOD 聚合酶	0.5 μ l
第一轮 PCR 产物	3 μ l
第二轮 PCR 产物	3 μ l

加完体系后，置于 PCR 仪上进行如下反应：

① 95 $^{\circ}$ C	2 min
② 95 $^{\circ}$ C	30 s
③ 50 $^{\circ}$ C	30 s
④ 72 $^{\circ}$ C	70 s
⑤ ② \rightarrow ④	5 个循环
⑥ 72 $^{\circ}$ C	5 min

反应停止后，各加入 2 μ l/管的引物 F 和 R，混匀后置于 PCR 仪上进行如下反应：

① 95 $^{\circ}$ C	2 min
② 95 $^{\circ}$ C	30 s
③ 59.3 $^{\circ}$ C	30 s
④ 72 $^{\circ}$ C	70 s
⑤ ② \rightarrow ④	25 个循环
⑥ 72 $^{\circ}$ C	5 min
⑦ 16 $^{\circ}$ C	O/N

其它 5 个 *trx2* 突变体的构建与上述方法一致。6 个 *trx2* 的突变基因分别于 pET30b(+) 连接，转入表达菌株 BL21(DE3) 中，参照上述蛋白表达方法进行蛋白表达纯化。

3.4 体外蛋白激酶实验

体外蛋白激酶实验为 20 μ l 反应体系，常规体系所含组分的终浓度为 20mM Tris-HCl (pH=7.5), 5mM MnCl₂, 5mM MgCl₂, 1mM DTT。改良后 20 μ l 反应体系中所含组分的终浓度为 20mM Tris-HCl (pH=7.5), 1mM MnCl₂, 0.1mM MgCl₂, 1mM DTT。加入适量蛋白激酶及底物后，加入 0.05 μ Ci γ -[³²P] ATP 启动反应。37 $^{\circ}$ C 条件下孵育指定时间后，加入 5 μ l 5 \times Sample Buffer, 95 $^{\circ}$ C 孵育 10min。样品经 12% SDS-PAGE 胶分离、银染和干燥后，利用 PhosphoImager SI (Molecular Dynamics) 扫描成像。

3.5 放射性双向电泳分析

首先进行体外蛋白激酶实验分析，设 100 μ l 反应体系，所含组分的终浓度分别为 20mM PIPES 或者 Tris-HCl (pH=7.5), 1mM MnCl₂, 0.1mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.5%的混合磷酸酶抑制剂 (P5726, Sigma)。然后加入总量为 33 μ g 的 PtkA 重组蛋白, 200 μ g 的结核菌裂解液和 30 μ Ci 的 γ -[³²P] ATP, 用蛋白透析缓冲液 (20mM Tris-HCl, 50mM NaCl, 1mM DTT, 10%甘油, pH=7.5) 补足余下体积。37 $^{\circ}$ C 条件下反应 1h 后，加入用于双向电泳的水化液成分如下：

成分	质量或体积	最终浓度
尿素	0.12g	8M
CHAPS	0.005g	2%(w/v)
IPG buffer	1.25 μ l	0.5%(v/v)
溴酚蓝	0.5 μ l 1% 贮存液	痕量
1M DTT	1 μ l	约 0.7mg

混匀后，用透析缓冲液将体积补充到 250 μ l，室温放置 1.5h，使蛋白充分变性。双向电泳的具体步骤参见 GE Healthcare 的操作手册，本文简要描述其操作步骤。第一维蛋白等电聚焦于 GE Healthcare 系统中完成。将上述反应液吸入等电聚焦条槽中，通过水化膨胀法将蛋白质吸收进入 pH 范围 3-10 的等电聚焦条 (GE Healthcare) 中。等电点聚焦的程序为：20 $^{\circ}$ C 水化膨胀 14h；20 $^{\circ}$ C 下以 50 μ A/trip 进行等电聚焦 (S1: 梯度, 100V, 0:01hrs; S2: 梯度, 300V, 0:30hrs; S3: 梯度, 500V, 0:30hrs; S4: 梯度, 1000V, 0:30hrs; S5: 稳定于 6000V, 持续 8hrs)。蛋白等电点聚焦完成后，IPG 胶条置于 SDS 平衡缓冲液 (6M 尿素, 50mM Tris-HCl, pH8.8, 30%甘油, 2% SDS, 0.0002% 溴酚蓝, 使用前每 10ml 缓冲液中加入 100mg DTT) 中，摇动平衡 15min。将 IPG 胶条轻轻放在 12% SDS-PAGE 胶的上方，用琼脂糖凝胶封闭液 (25mM Tris, 192mM 甘氨酸, 01% SDS, 0.5% 琼脂糖, 痕量

溴酚蓝) 封闭, 静置几分钟。于 40V 恒定电压下进行电泳, 直到溴酚蓝移动到距胶下边缘 0.5cm 处, 停止电泳。参照文献 [17,18] 的方法对蛋白胶进行银染。然后置于凝胶真空干燥器上干燥, 利用 PhosphoImager SI 扫描成像。

3.6 磷酸化氨基酸分析 (phospho-amino acid analysis)

1). 体外激酶实验: 体外激酶实验如前文所述, 将样品进行 SDS-PAGE 之前, 在样品孔左右两侧各加适量预染蛋白 marker。跑完胶后不染色。

2). 蛋白质转膜及消化: 将大小合适的 PVDF 膜 (Immobilon-P, 0.45 μm 孔径) 在甲醇中浸泡数分钟。接着将 PVDF 膜、海绵、滤纸及凝胶在 4°C 保存的转移缓冲液 (57.63g 甘氨酸+12.12g Tris + 800ml 甲醇, 用水稀释到 4 L) 中平衡 5 分钟。按“海绵—滤纸—凝胶—PVDF 膜—滤纸—海绵”的顺序装置好, 将转移夹合上, 夹紧, 做成“三明治”结构。PVDF 膜应该靠近正极, 切记各层之间不能有气泡形成。76V 电压下转移 1.5h。用水冲洗 PVDF 膜去除残留的 SDS 和甘氨酸。利用 PhosphoImager SI 对 PVDF 膜扫描成像后, 将膜相应位置的条带切下来放入 500 μl 6N HCl 中。110°C 条件下精确孵育 2.5h。将消化在 HCl 中的氨基酸等体积地转移至 2-4 个离心管中, 利用真空离心浓缩仪除掉 HCl。使用 0.1N HCl/30% 甲醇溶液对被消化的氨基酸漂洗三次, 每次 250 μl , 溶液依旧用真空离心浓缩仪去除, 最后一次务必彻底去除溶剂。最后取 25 μl ddH₂O 溶解被消化的氨基酸, 备用。

3). TLC 薄层色谱分析及放射自显影: 使用毛细管取适量上述样品点在纤维素 TLC 板上 (距离底部 1-2cm), 然后在合适位置分别点上磷酸化的 Thr、Ser 和 Tyr (1 μl 浓度为 2mg/ml 的标准品)。将点了样的薄层板置于盛有展开剂 (异丁酸:0.5M NH₄OH=5:3, v/v) 的展开槽中 12h。取出薄层板, 置于通风橱中干燥。将微量的 γ -[³²P] ATP (1:10000 稀释) 点在薄层板的四个角落, 干燥后进行放射自显影, 利用 PhosphoImager SI 扫描成像。然后将显色剂 (溶于乙醇的 0.1%-0.2% 的茚三酮, w/v) 均匀地喷在薄层板上, 显色, 扫描。然后将三种磷酸化氨基酸标准品的比移值 (R_f 值) 与样品中氨基酸的比移值比对, 即可得出蛋白质样品中磷酸化的氨基酸种类。

3.7 pull-down 实验分析

将 750 μg 纯化的 PtkA-His 蛋白加入到 1ml 50% Ni-NTA His-Bind Resins 中, 同时以一管不加 PtkA-His 蛋白的 Resins 作为阴性对照。室温静置 30min 后, 利用重力去除液体。分别将 1mg Mtb ΔptkA 突变株的裂解液加入上述 Resins 中, 轻轻吹打混匀, 4°C 孵育过夜。使用 2 倍柱体积的含有 20mM 咪唑的洗涤缓冲液洗涤 Resins 后, 再加入 250 μl 含有 250mM 咪唑的洗脱缓冲液, 吹打混匀, 室温静置 5min。

收集洗脱蛋白进行 SDS-PAGE 检测。

3.8 硫氧还蛋白还原酶活性分析 (DTNB 法)

1). 准备试剂: 20mM EDTA, 50mM NADPH (购自 ICN 公司), 1mM 5,5'-二硫基-(2-硝基苯甲酸) [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] (Sigma, 溶于 95% 的乙醇)。100mM 磷酸盐缓冲液 (PB) (pH=7.4): 按 3.8ml 0.2M NaH₂PO₄+16.2ml 0.2M Na₂HPO₄+20ml ddH₂O 配制。

2). 按照“实验方法 3.4”的方法用 PtkA-His 对 TrxB2 进行磷酸化处理。反应体系为 20μl, 一共得到 0.8μg 的自磷酸化的 PtkA-His (pPtkA-His) 和 0.9 μg 的 pPtkA-His+ pTrxB2 混合物。

3). 酶活测定方法参考文献 [19]。由于 TrxB2 被 PtkA-His 磷酸化后很难分离纯化 pTrxB2, 所以该实验直接使用 TrxB2 和 PtkA-His 体外激酶实验后的混合物来代表 pTrxB2, 并加入单独的 pPtkA-His 作为对照。具体添加样品的方法 (100μl 体系, 三复孔) 以下表为例 (单位: μl)。

成分 \ 组别	1	2	3	4	5	6	7	8	9
TrxC(1.6 μg/μl)	\	2.5	\	\	\	2.5	2.5	\	2.5
TrxB2(0.9 μg/μl)	\	\	12	\	\	12	\	12	\
pPtpA-His	\	\	\	12	\	\	24	24	\
pPtpA-His+ pTrxB2	\	\	\	\	24	\	\	\	24
20mM EDTA	15	15	15	15	15	15	15	15	15
50mM NADPH	3	3	3	3	3	3	3	3	3
1mM DTNB	8.25	8.25	8.25	8.25	8.25	8.25	8.25	8.25	8.25
100mM PB	274	272	262	262	253	260	249	238	248

因此, 各个成分的终浓度分别为: 1mM EDTA, 26μM DTNB, 0.5mM NADPH, 1 μM 纯化的各种 TrxC、TrxB2、pTrxB2 等蛋白。加完样品后, 以第 1 组为空白对照, 室温下在 412nm 处实时监测各个组, 持续 5min。当检测 0.1 μM 和 0.5 μM 的 TrxB2 或 pTrxB2 的酶活性时, 只需要依据上表稍微改变一下相关组分的添加量即可。

3.9 Western blot 分析蛋白质的亚细胞定位

按方法 3.2 制备结核杆菌 H37Rv 全菌体裂解液及滤液蛋白 (CFP)。将上述亚细胞结构组分进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳结束, 将蛋白转移到醋酸纤维素膜上进行免疫印迹实验 (干法转膜)。由于 DosR 蛋白定位于细胞质中, 所以我们使用该蛋白作为全菌体裂解液组分 (即结核杆菌全蛋白组分) 的对照, 检测全菌体

裂解液组分是否渗漏到滤液蛋白组分中。分别使用特异性抗体 Rabbit anti-TrxB2、Rabbit anti-PtkA 和 Rabbit anti-DosR 一抗抗体检测 TrxB2、PtkA 和 DosR 蛋白。二抗抗体使用 Alexa Fluor 680-conjugated goat anti-rabbit IgG (Life technologies Corp.)。使用 Odyssey CLx Infrared Imaging System 收集免疫印迹信号。

4 结果与分析

4.1 以放射性双向电泳为基础的磷酸化蛋白质组学方法鉴定 PtkA 的底物

首先本研究对比了实验室已有的两个不同形式的 PtkA 蛋白的激酶活性。由图 1 的体外蛋白激酶实验结果可知，纯化自 BL21(ED3)-pMAL-*ptkA* 的 PtkA-MBP 蛋白 (MBP 为麦芽糖结合蛋白, maltose binding protein) 自磷酸化作用不太明显，但对于已知底物 PtpA-His 和激酶通用底物髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, 以示区分, 下文简称为 myelin BP) 的磷酸化作用比较明显；而纯化自 *M. smegematis*-pALACE-*ptkA* 的 PtkA-His(MS) 蛋白，尽管能很好的自磷酸化及对 myelin BP 进行磷酸化，但对 PtpA-His 的磷酸化作用很弱。因此以下实验将采用 PtkA-MBP 蛋白。

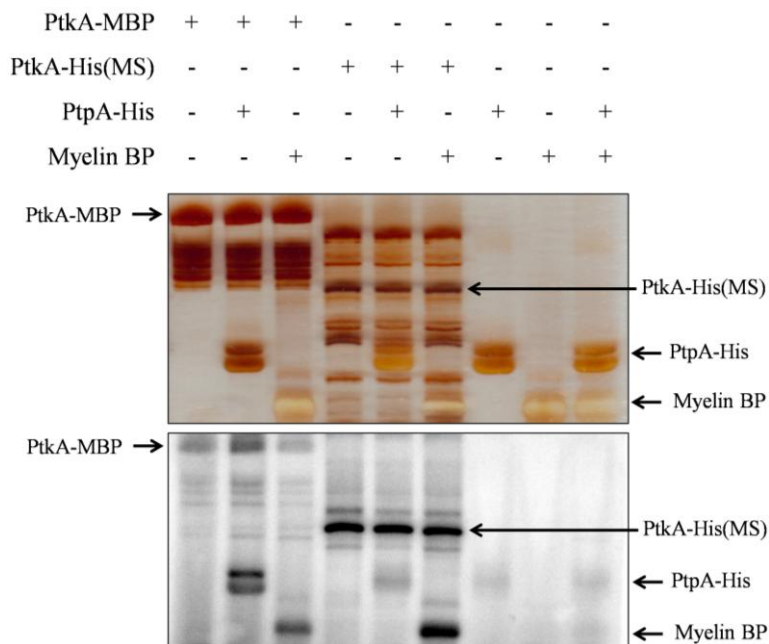


图 1. 分别从 *M. smegematis*-pALACE-*ptkA* 和 BL21(ED3)-pMAL-*ptkA* 中纯化的 PtkA 的激酶活性对比。上图显示的是银染的蛋白胶，下图显示的是放射自显影照片。

Fig. 1. Comparison of the kinase activity of rPtkA purified from *M. smegematis*-pALACE-*ptkA* and BL21-pMAL-*ptkA*, respectively. The lower image shows phosphorylation visualized by auto-radiography, and the upper image represents the Silver-stained gels.

本研究接着以放射性同位素 ^{32}P 为磷酸基团供体，将纯化的 PtkA-MBP 蛋白和

结核菌全菌体裂解液共孵育后，利用双向电泳鉴定 PtkA 的新底物。如图 2 所示，右边放射自显影图片中，与 PtkA-MBP 蛋白共孵育之后的结核菌 H37Rv 全菌体蛋白（图 2A，红色圈圈出了 PtkA-MBP 蛋白的位置）并没有比后者单独孵育时（图 2B）多出任何磷酸化信号（黑点）。而且令人感到奇怪的是，就连蛋白酪氨酸激酶 PtkA-MBP 本身的自磷酸化活性也完全消失了。鉴于本实验中添加了足量的磷酸酶抑制剂且放射自显影图片中仍可见其他磷酸化信号，我们排除了磷酸酶去磷酸化作用做本实验的干扰。我们考虑是否是 PtkA-MBP 自磷酸化活性太低（见图 1）及体外蛋白激酶实验条件影响其对底物的磷酸化作用。且 PtkA-MBP 蛋白比较容易被降解（见该蛋白下面一系列条带），因此下一步我们将着手探索 PtkA 蛋白更优的纯化条件及体外蛋白激酶实验条件。

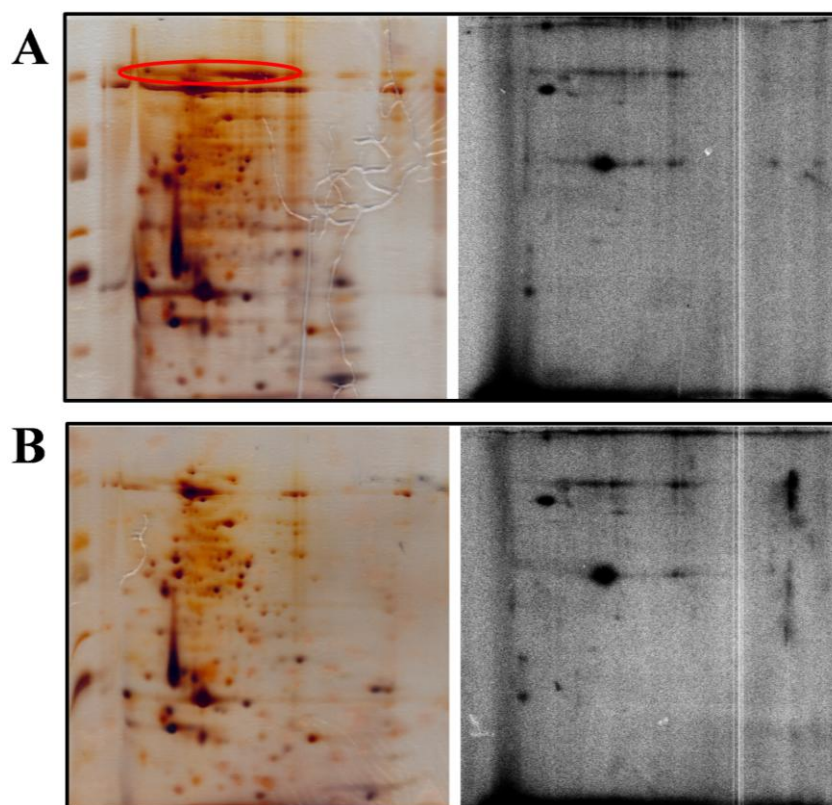


图 2. 体外放射性双向电泳分析。A，结核菌 H37Rv 全菌体蛋白与 PtkA-MBP 共孵育，红色圈圈出了 PtkA-MBP 的位置；B，结核菌 H37Rv 全菌体蛋白单独孵育。左图显示银染的蛋白胶，右图显示放射自显影图片。

Fig. 2. *In vitro* phosphorylation assays. *M. tuberculosis* intracellular proteins were incubated with either PtkA-MBP (A) or no PtkA (B). Proteins were incubated with ^{32}P - γ -ATP and a range of cofactors for 1 h, separated by 2-D electrophoresis and visualized by a phosphoimager apparatus. The right images show phosphorylation visualized by autoradiography, and the left images represent the Silver-stained gels. The position of PtkA-MBP is indicated with a red oval.

4.2 PtkA 体外蛋白激酶条件的优化

我们在纯化 PtkA 蛋白时发现，pALACE-*ptkA* 和 pET151D/TOPO-*ptkA* 两种来源的蛋白纯化率都很低，且杂蛋白很多（图 3A 和 B）。由图 3C 可知，从 pMAL-c5x-*ptkA* 中纯化的 PtkA 蛋白降解很严重。通过对 pET151D/TOPO、pALACE 及 pMAL-c5x 载体分析，我们发现它们的 His（前两个载体）或 MBP 标签都是和 PtkA 蛋白的 N 末端连接。因此我们大胆猜测纯化的 PtkA 蛋白有可能是从 C 末端开始被降解掉的：MBP 标签很大（约 45kDa），且该质粒表达量高，所以 PtkA 的降解反映为蛋白胶上从 PtkA-MBP 到 MBP 之间连续的条带；而其它两个质粒都是小标签 His，所以 PtkA 的降解无法反映在蛋白胶上，但却导致其纯化率很低。基于此，我们选择了一个能在目的蛋白的 C 末端添加标签的载体 pET22a(+), 由图 3D 可知，使用该载体可以大量获得纯度高、无降解的 PtkA-His 蛋白。

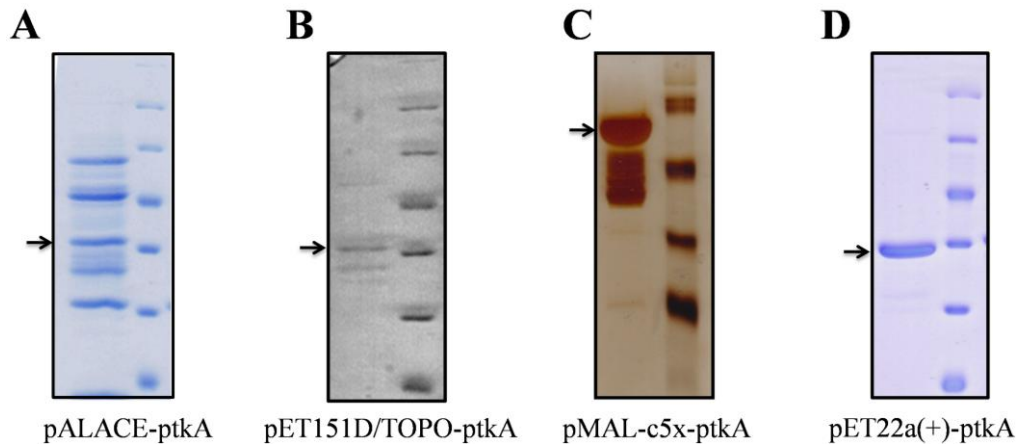


图 3. 不同载体、不同纯化条件下，重组蛋白 PtkA 的得率及纯净度比较。经 BCA 法测得各种 PtkA 的浓度分别为：0.82mg/ml (A)，0.094mg/ml (B)，1.47mg/ml (C)，0.998mg/ml (D)。箭头所指处即为 rPtkA。

Fig. 3. Comparison of the recombinant PtkA from different conditions. For each gel the positions of rPtkA is indicated with an arrow.

接着我们测试了不同体外蛋白激酶实验条件对于纯化自 pET22a(+)-*ptkA* 的 PtkA-His 蛋白的激酶活性的影响。首先我们摸索了 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 不同浓度的配伍对于 PtkA-His 的自磷酸化活性（图片未显示），发现 0.1mM $MgCl_2$ 和 1.0mM $MnCl_2$ 搭配是最优的。由图 4B 可知，改良后的离子浓度配伍明显优于常规的离子浓度配伍（5.0mM $MgCl_2$ 和 5.0mM $MnCl_2$ ）。接着我们发现 64nM 的 ^{32}P （即 $4\mu Ci$ ^{32}P ）就可以满足 PtkA 自磷酸化（图 4A）。最后我们检测到 37°C 孵育 1h 可以得到比较好的 PtkA-His 的自磷酸化作用。

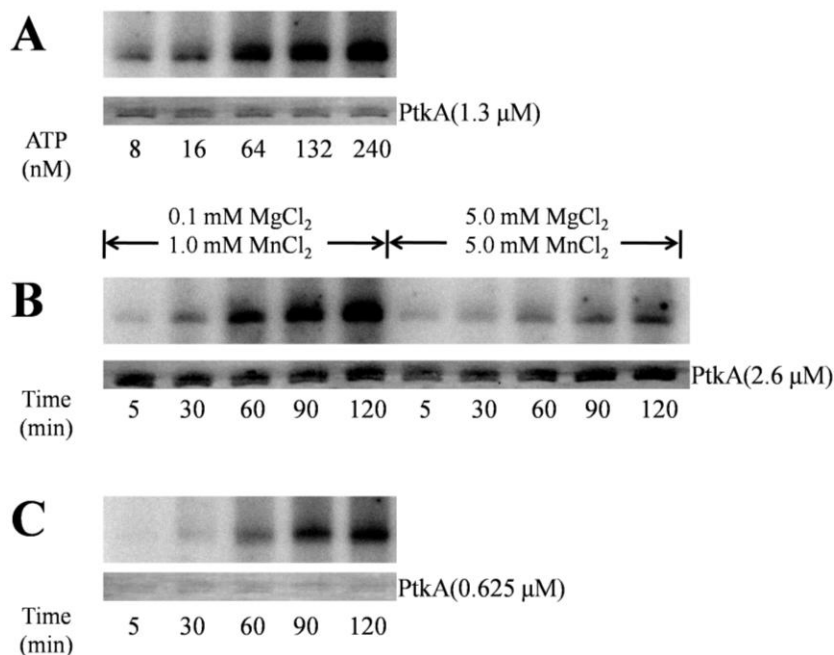


图 4. PtkA 自磷酸化条件的优化。每幅小图中，上图代表放射自显影图片，下图代表考马斯亮蓝染色的蛋白胶。

Fig.4. Autophosphorylation of PtkA. Recombinant PtkA is autophosphorylated in an ATP dose- (A) and time- (B and C) dependent manner. The upper images show phosphorylation visualized by autoradiography, and the lower images represent the Coomassie blue-stained gel.

然后我们利用优化的体外蛋白激酶实验条件对不同类型的 PtkA 进行了测试。由图 5 可知，无论是自磷酸化作用，还是对底物的磷酸化作用，纯化自 pET22b(+)-*ptkA* 的 PtkA-His 蛋白的表现都明显优于其它来源的 PtkA。因此，我们选择纯化自 pET22b(+)-*ptkA* 的 PtkA-His 蛋白供后续研究。

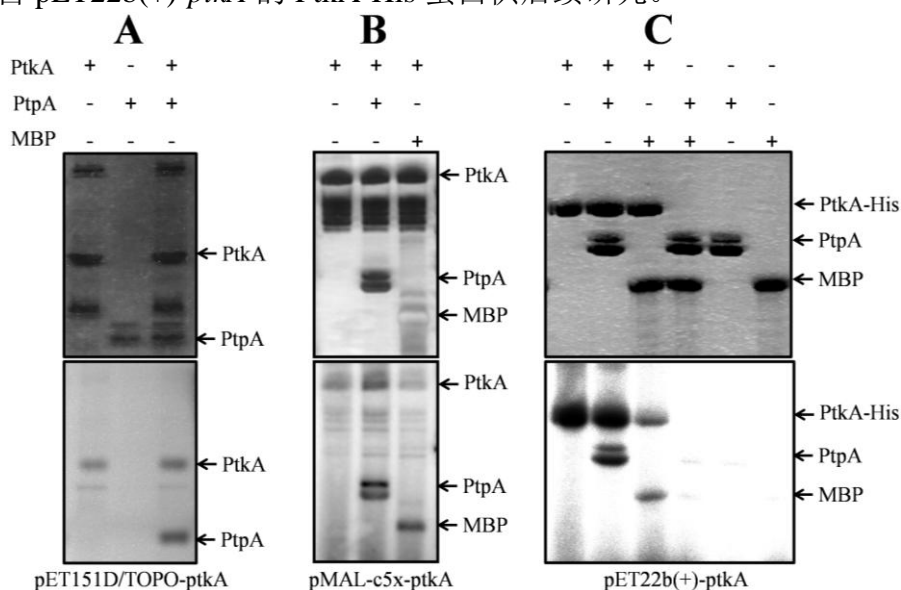


图 5. 不同来源的 PtkA 的激酶活性对比。每幅小图中，上图代表考马斯亮蓝染色的蛋白胶，

下图代表放射自显影图片。

Fig. 5. Comparison of the kinase activity of rPtkA purified from different strains. The lower images show phosphorylation visualized by autoradiography, and the upper images represent the Coomassie blue-stained gel.

4.3 使用蛋白质组学方法无法找到 PtkA 底物的原因

我们利用优化好的 PtkA-His 重新进行体外蛋白激酶实验，由于放射性双向电泳操作复杂，我们首先进行常规的 SDS-PAGE。意外的是，不论与结核菌 H37Rv 野生型菌株全蛋白还是与结核菌 $\Delta ptkA$ 突变株全蛋白共孵育，PtkA-His 蛋白的自磷酸化活性依然基本消失了（图 6）。鉴于前面实验证实 PtkA-MBP 的自磷酸化活性也被结核菌全细胞裂解液抑制（图 2），因此我们怀疑结核菌中存在 PtkA 的抑制因子。

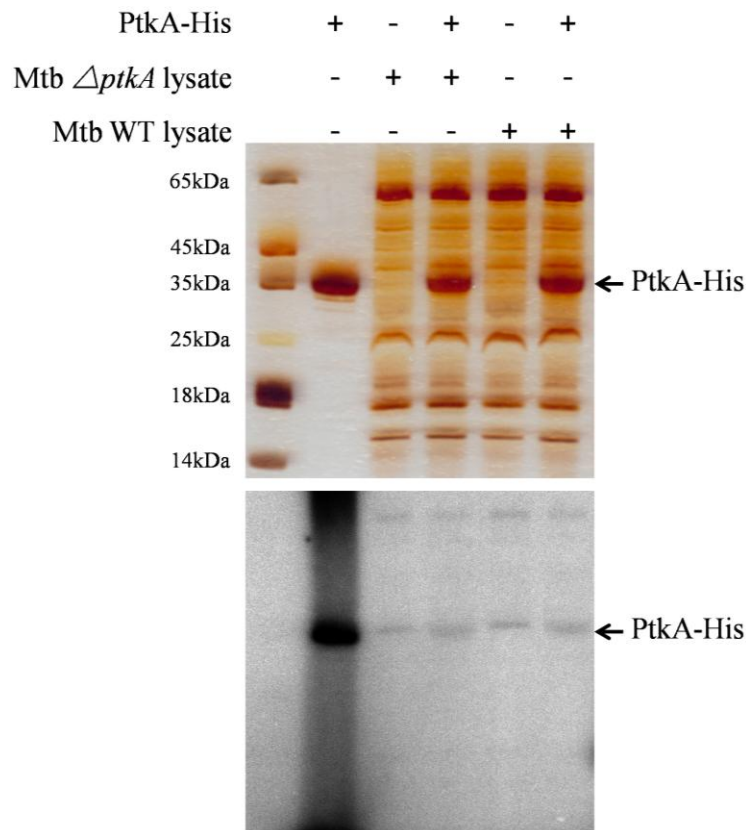


图 6. PtkA-His 与结核菌全菌体裂解液的体外激酶实验。上图代表银染的 SDS-PAGE 蛋白胶，下图代表放射自显影图片。

Fig. 6. *In vitro* phosphorylation assays. *M. tuberculosis* intracellular proteins were incubated with either PtkA-His or no PtkA-His. Proteins were incubated with ^{32}P - γ -ATP and a range of cofactors for 1 h, separated by SDS-PAGE and visualized by a phosphoimager apparatus. The lower image shows phosphorylation visualized by autoradiography, and the upper image represents the Silver-stained gels.

结核菌全细胞裂解液中包含各种离子及蛋白质，我们首先想确定是哪个组分抑制了 PtkA-MBP 的自磷酸化活性。基于此，我们利用一个孔径为 10kDa 的超滤离心管将结核菌全细胞裂解液中大于 10kDa 的蛋白去掉，剩下的就是结核菌全细胞裂解液中小于 10kDa 的蛋白质及各种离子，在图 7 中表示为“10kDa flow-through”。然后将该组分与结核菌 $\Delta ptkA$ 突变株全细胞裂解液等进行体外蛋白激酶实验分析。如图 7 所示，PtkA-His 与全细胞裂解液孵育后，自磷酸化活性基本消失；而与只含小于 10kDa 蛋白及离子的“10kDa flow-through”组分孵育后，自磷酸化活性依然存在。由此我们可以判断结核菌全细胞裂解液中确实存在某个分子量大于 10kDa 可抑制 PtkA-His 自磷酸化作用的蛋白质。

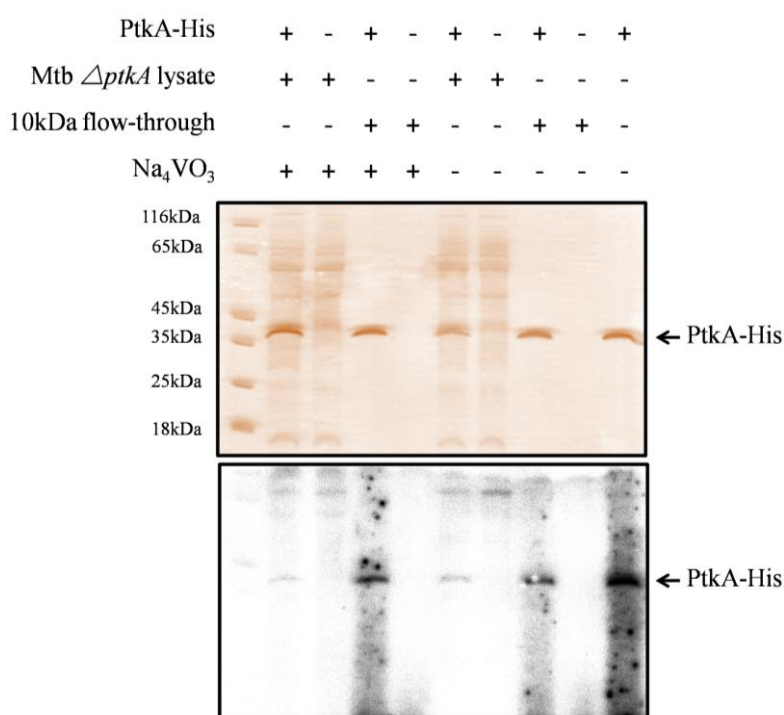


图 7. PtkA-His 与结核菌全菌体裂解液的不同组分的体外激酶实验。上图显示的是银染后的蛋白胶，下图代表放射自显影图片。

Fig. 7. *In vitro* phosphorylation assays. *M. tuberculosis* intracellular proteins and “no protein flow-through” were incubated with either PtkA-His or no PtkA-His. The lower image shows phosphorylation visualized by autoradiography, and the upper image represents the Silver-stained gel.

接着我们尝试利用 pull-down 技术将该抑制蛋白鉴定出来。由图 8 可知，利用简单的 His-tag pull-down 技术并没有在结核菌 $\Delta ptkA$ 总蛋白中钓取到与 PtkA-His 相互作用的蛋白。鉴于我们的目的是寻找 PtkA-His 的底物，且时间有限，我们并没有尝试其它更先进更复杂的方法来鉴定抑制 PtkA-His 自磷酸化的蛋白质。不过，总而言之，我们通过实验发现了 PtkA-His 的上游调控蛋白，具体蛋白及作用机制

有待进一步研究。

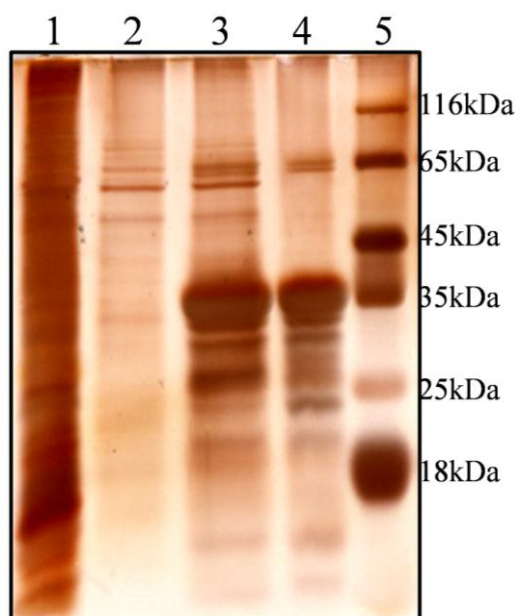


图 8. Pull-down 试验分析。各个条带代表的信息是：1，结核菌 $\Delta ptkA$ 总蛋白；2，结核菌 $\Delta ptkA$ 全细胞裂解液空白对照（裂解液中与树脂非特异性结合的蛋白）；3，固化的 PtkA-His 从结核菌 $\Delta ptkA$ 全细胞裂解液中捕获的相互作用蛋白；4，纯化的 PtkA-His 蛋白；5，蛋白 marker。

Fig. 8. Pull-down assay. His-tagged PtkA was used as bait. Ni^{2+} cations beads coupled with approximately 0.9 μg of PtkA-His were incubated with either lysates of the Mtb $\Delta ptkA$ strain (lane 3) or with buffer alone (lane 2). After washing the beads, proteins bound to the beads were analyzed by 12% SDS-PAGE followed by silver staining. Lane 1: Mtb $\Delta ptkA$ lysate; lane 4: PtkA-His; lane 5: marker.

4.4 借助生物信息学方法寻找 PtkA 的底物

研究人员利用无凝胶的质谱和固定化金属亲和层析技术（gel-free mass spectrometry and immobilized metal affinity chromatography technology）在不同细菌中鉴定出了 105 个酪氨酸磷酸化蛋白质（表 2）。尽管通过磷酸化蛋白质组学方法鉴定出了在结核菌中大量的丝氨酸和/或苏氨酸磷酸化蛋白质 [20]，但目前为止仍然没有鉴定出来任何酪氨酸磷酸化蛋白质。Tan 等人[21]利用序列比对方法比较人与不同亲缘关系的模式生物（果蝇、线虫和酵母）磷酸化蛋白的保守性时，发现了 344 个人源蛋白中的 479 个磷酸化位点似乎在 6 亿年的进化过程中都是保守的。比较表 2 中已经鉴定出来的酪氨酸磷酸化蛋白质，我们并没有发现某个磷酸化酪氨酸残基在所有细菌中都保守。但有这样的例子，如枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）、天蓝色链霉菌（*Streptomyces coelicolor*）和大肠杆菌（*Escherichia coli*）的 SSBs（Single-stranded DNA-binding proteins）蛋白在大肠杆菌中表达时都能检测到酪氨酸磷酸化作用，这说明在不同细菌中仍然存在相对保守的酪氨酸磷酸化作用 [22]。

表 2. 磷酸化蛋白质组学方法报道的所有酪氨酸磷酸化蛋白集合

Bacterium	No. of phosphopeptides	No. of phosphotyrosine -proteins	No. of Mtb homologues
<i>E. coli</i> [23]	105	7	5
<i>B. subtilis</i> [24]	103	12	7
<i>L. lactis</i> [25]	102	6	2
<i>P. putida</i> [26]	56	8	4
<i>P. aeruginosa</i> [26]	57	8	4
<i>Campylobacter jejuni</i> [27]	58	4	2
<i>S. pneumoniae</i> [28]	102	13	7
<i>S. coelicolor</i> [29]	44	5	3
<i>K. pneumoniae</i> [30]	117	20	9
<i>H. pylori</i> [31]	80	15	3
<i>L. monocytogenes</i> [32]	115	7	4

基于蛋白质的磷酸化作用是一个相对保守的翻译后修饰。我们利用序列比对方法比较了不同细菌中 105 个酪氨酸磷酸化蛋白（表 2）与结核菌蛋白质组的同源性。我们发现结核菌中一共有 8 个不同的蛋白质与这 105 个酪氨酸磷酸化蛋白质具有保守的磷酸化酪氨酸残基（表 3）。通过蛋白同源性比对，我们发现结核菌的这 8 个蛋白质与相应细菌的相应蛋白质具有很高的序列一致性（除 Rv0322 与大肠杆菌的 Ugd 蛋白只有 23.4% 的一致性以外，其它蛋白的序列一致性都在 36% 以上）。因此，我们假设结核菌的 8 个保守蛋白质为酪氨酸磷酸化蛋白。鉴于目前结核菌中只鉴定出了唯一的蛋白酪氨酸激酶 PtkA，我们进一步假设这 8 个保守蛋白质都为 PtkA 的磷酸化底物。

表 3. 所选结核菌中潜在蛋白酪氨酸激酶底物及其同源蛋白的相关信息

Table 3. A list of conservation of phosphotyrosine proteins which have homologue in Mtb and its conserved phosphotyrosine residues.

结核菌蛋白质	同源蛋白	所属物种	磷酸化位点	磷酸化位点在结核蛋白中是否保守	序列一致性
Rv1310	AtpD	<i>E. coli</i>	PSAVGY ₂₆₈ QPTLA	YES	56.0%
Rv3913	TrxB2	<i>P. putida</i>	GSGPAGYSAAVY ₂₄ AAR	YES	41.5%
Rv0384	ClpB	<i>E. coli</i>	GAPPGY ₆₅₃ VGYE	YES	54.4%
Rv2222c	GlnA	<i>S. pneumoniae</i>	NYTAIMNPTVNSY ₂₈₇ K	YES	41.3%
	GlnA	<i>L. lactis</i>	PGYEAPVY ₃₁₀ VAWAGR	NO	45.2%
Rv0322	Ugd	<i>E. coli</i>	TLDKNEAYRDADY ₇₆ V	NO	23.4%
	Ugd	<i>B. subtilis</i>	NFETSY ₇₀ EKGL	YES	36.3%
Rv0685	Tuf	<i>S. pneumoniae</i>	FKGEVY ₃₁₄ ILTK	YES	70.4%
	TufA	<i>E. coli</i>	GYPQFY ₃₃₂ FR	YES	74.1%
Rv1023	Eno	<i>C. jejuni</i>	EALRSVCEIY ₁₈₅ AILK	YES	52.4%
	Eno	<i>B. subtilis</i>	Y8, Y ₄₆ , Y249, Y256, Y281 Y403, Y419, Y424	YES	57.0%
Rv0949	UvrD	<i>H. pylori</i>	SRLAY ₄₇ LIGVCGVP	YES	45.5%

接着我们将这 8 个蛋白质的编码基因从结核菌 H37Rv 基因组上扩增出来并利用限制性内切酶连接到相应的表达载体上（具体见实验方法部分），然后根据标准步骤将各个蛋白质纯化出来。图 9 表明，我们得到了纯度和得率较好的底物蛋白（箭头指示各个蛋白位置）。随后我们对这些假设的底物蛋白和 PtkA-His 做了体外蛋白激酶实验分析。图 10 表明，TrxB2 可以被 PtkA-His 磷酸化，即 TrxB2 可能为 PtkA-His 的酪氨酸磷酸化底物。但仍需进一步实验验证。

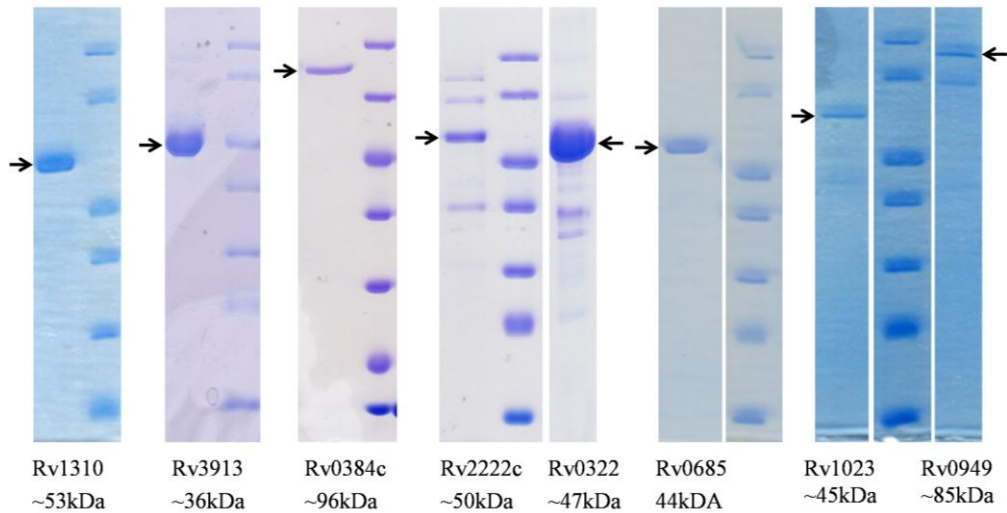


图 9. 各个蛋白的表达情况。箭头所指处即为每个纯化蛋白的位置。

Fig. 9. Protein purification. For each gel the positions of target proteins are indicated with an arrow, respectively.

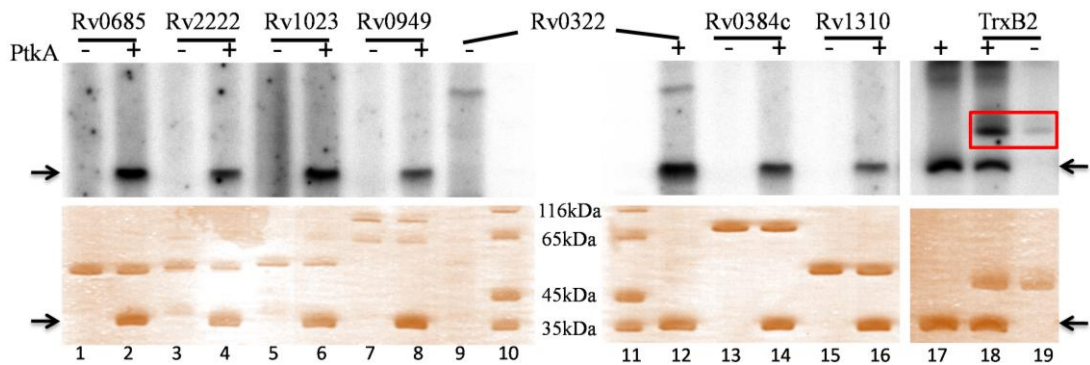


图 10. PtkA 与其潜在底物的体外激酶实验分析。箭头指示 PtkA-His 蛋白的位置，红框指示 TrxB2 被 PtkA-His 蛋白磷酸化的位置。上图显示放射自显影图片，下图显示银染的蛋白胶图片。

Fig. 10. *In vitro* phosphorylation assays. Purified protein substrates were incubated with either PtkA-His or no PtkA-His. Proteins were incubated with ^{32}P - γ -ATP and a range of cofactors for 1 h, separated by SDS-PAGE and visualized by a phosphoimager apparatus. For each gel the positions of PtkA-His are indicated with an arrow. The upper images show phosphorylation visualized by autoradiography, and the lower images represent the silver-stained gels.

4.5 TrxB2 是 PtkA 的特异性酪氨酸磷酸化底物

为进一步证实 TrxB2 是 PtkA 的特异性酪氨酸磷酸化底物，我们首先用 PtkA-His 对 TrxB2 进行时间和浓度依赖的体外磷酸化检测。从图 11A 上图可知，在 TrxB2 和 PtkA-His 量不变的情况下，TrxB2 的磷酸化水平随着时间的增加而增强。从图 11A 下图可知，在 PtkA-His 的量不变的情况下，TrxB2 的磷酸化水平随着其浓度的增加而增强，表现出底物浓度依赖的磷酸化现象。然后我们利用磷酸化氨基酸分析实验来探索 TrxB2 的哪个氨基酸残基被磷酸化了。如图 11B 所示，经过计算可知各个标准品的比移值 (Rf 值) 分别为: phosphor-serine = 0.255; phospho-threonine = 0.300; phospho-tyrosine = 0.345。而 TrxB2 的 Rf 值为 0.339。由此可见，TrxB2 的磷酸化氨基酸残基就是其中某个或某些酪氨酸残基，即 TrxB2 是 PtkA 的特异性酪氨酸磷酸化底物。我们检查了 TrxB2 的蛋白质序列，一共包含 6 个酪氨酸残基。接着我们利用定点突变技术将这 6 个酪氨酸残基分别突变为惰性的丙氨酸。然后将这些 TrxB2 突变蛋白及野生蛋白和 PtkA-His 蛋白进行体外蛋白激酶实验。由图 11C 可知，突变掉 TrxB2 的 32 位酪氨酸残基后，该蛋白无法被 PtkA-His 磷酸化了，即 PtkA-His 蛋白只对 TrxB2 的 32 位酪氨酸残基进行了磷酸化。

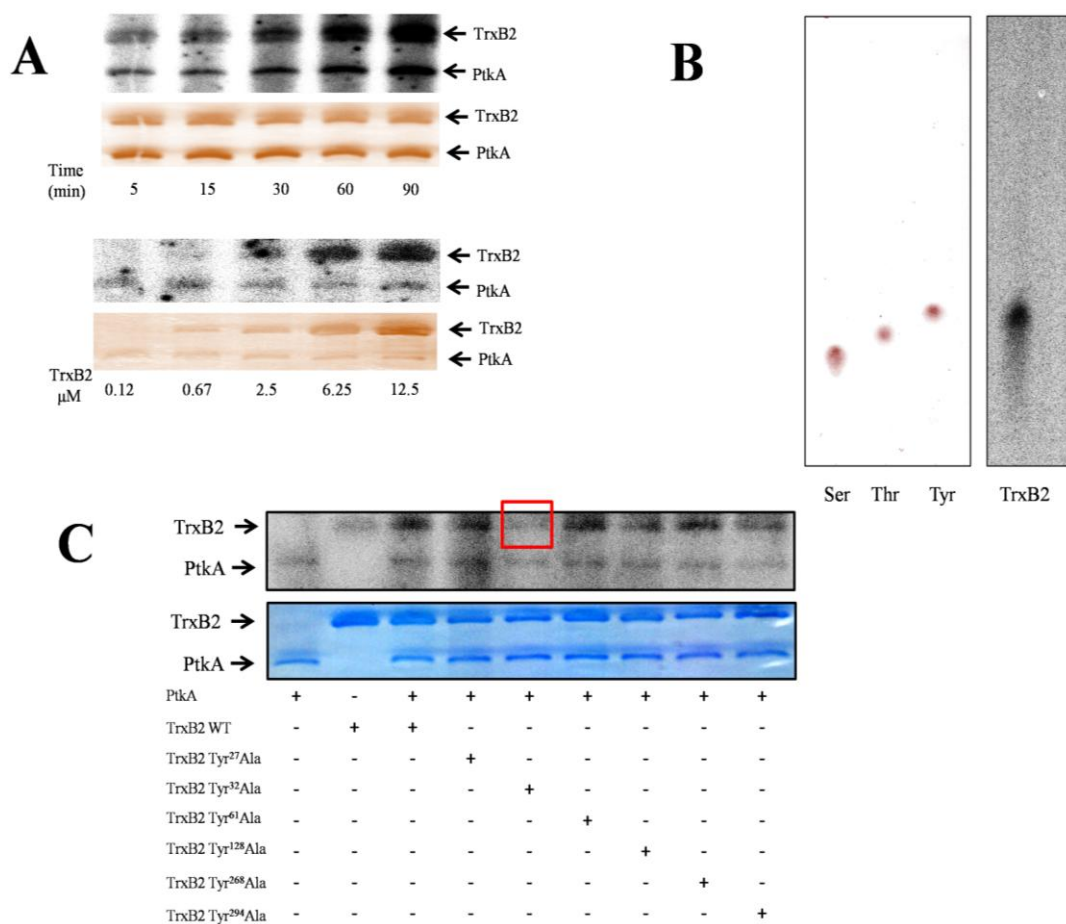


图 11. TrxB2 是 PtkA 的底物。A 上图、B 右图和 C 上图显示的是放射自显影图片，A 下图显

示的是银染蛋白胶图片，B 左图显示的是茚三酮染色的 TLC 薄层板，C 下图显示的是考马斯亮蓝染色的蛋白胶图片。

Fig. 11. TrxB2 is a substrate of PtkA. (A) PtkA phosphorylates TrxB2 in ATP time- (upper image) and dose- (lower image) dependent manner. The lower images in represents the silver-stained SDS-PAGE gel. (B) TrxB2 is phosphorylated at tyrosine residues as shown by phospho-amino acid TLC analysis (RF: phosphoserine=0.255; phosphothreonine=0.300; phosphotyrosine =0.345; TrxB2=0.339). (C) Site-directed mutagenesis shows that TrxB2 is phosphorylated on Tyr³². WT, wild-type. The upper images show phosphorylation visualized by autoradio-graphy, and the lower image represents the coomassie blue-stained gels.

4.6 磷酸化作用不影响 TrxB2 的酶活性

本研究利用 DTNB 比色法来探索 TrxB2 的磷酸化作用对其硫氧还蛋白还原酶活性的影响。DNTB 法的原理如图 12 所示。由图 13 可知，PtkA-His 没有活性，因此该激酶不影响 TrxB2 的酶活性测定。单独的硫氧还蛋白 TrxC 或者单独的 TrxB2 也基本没有活性，这符合相关的文献报道 [15]；只有 TrxB2 和 TrxC 组成的硫氧还蛋白系统才有还原 DTNB 的能力。不过，我们对比了不同浓度的 pTrxB2 和 TrxB2 的硫氧还蛋白还原酶活性（图 13），发现二者之间并无显著差异，因此 PtkA-His 对 TrxB2 的磷酸化作用不影响后者的硫氧还蛋白还原酶活性。

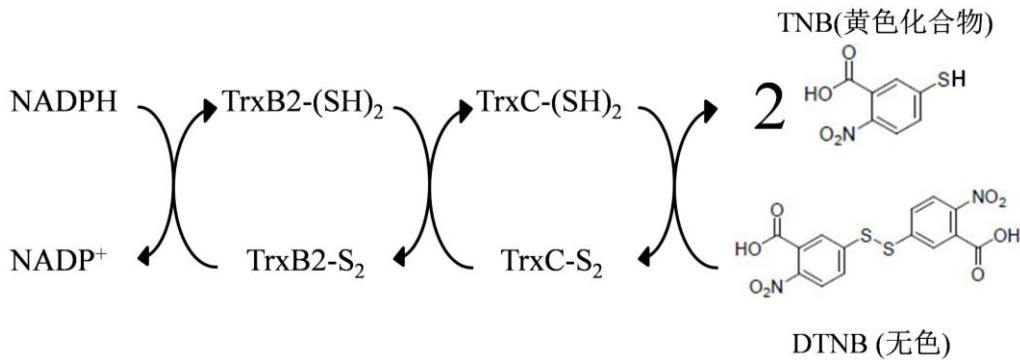


图 12. 硫氧还蛋白系统催化的将电子从 NADPH 传递到终端受体的示意图。

Fig. 12. Scheme of NADPH-dependent transfer of electrons to the terminal acceptors mediated by thioredoxin system.

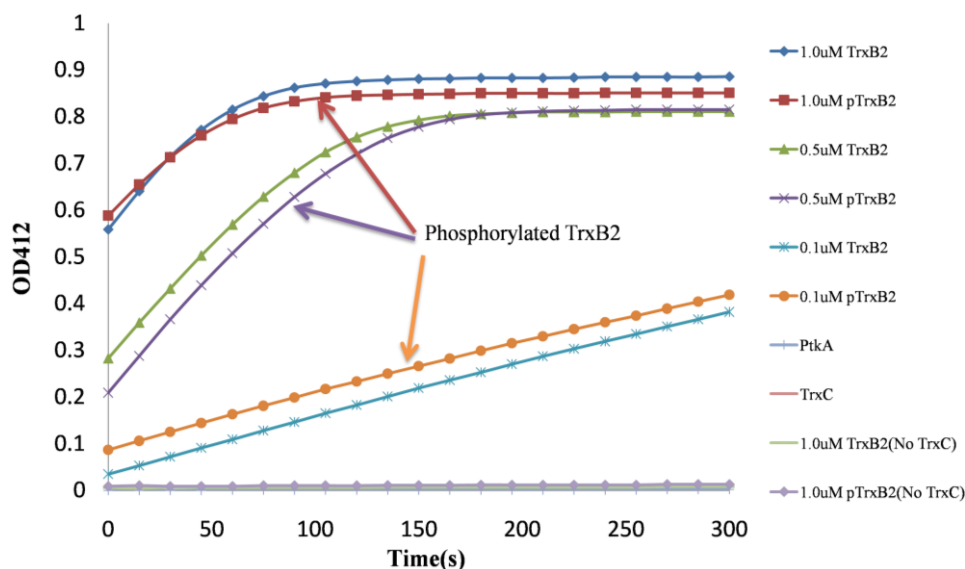


图 13. 磷酸化作用对 TrxB2 的硫氧还蛋白还原酶活性的影响。

Fig. 13. The thioredoxin activity of TrxB2 is not affected by phosphorylation. The reaction mixture contained 100 μ M phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 450 μ M NADPH and purified TrxB2 at an indicated concentration. The progress of the reactions was monitored at 412 nm against a blank control for 6 min at 25 $^{\circ}$ C with a final volume of 100 μ l.

4.7 磷酸化作用抑制 TrxB2 的分泌

有研究显示，枯草芽孢杆菌的蛋白酪氨酸激酶 PtkA 磷酸化其底物后，能够改变底物的亚细胞定位 [33]。此外，Av-Gay 实验室未发表的 iTRAQ 数据也显示，结核菌 H37Rv Δ ptkA 突变株培养基滤液蛋白(CFP)中 TrxB2 的含量比结核菌 H37Rv 野生株 CFP 中的 TrxB2 高了大约 3 倍左右。基于此，我们分别制备结核菌 H37Rv 野生株和 Δ ptkA 突变株的全蛋白裂解液和 CFP 组分，然后利用特异性抗体检测了 PtkA 和 TrxB2 的亚细胞定位情况。如图 14 可知，缺失掉 ptkA 后，结核菌分泌了更多的 TrxB2 到胞外；即 PtkA 的磷酸化作用抑制了 TrxB2 的分泌。

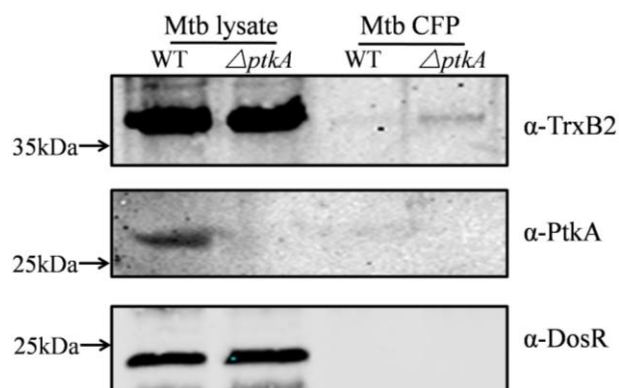


图 14. PtkA 和 TrxB2 在结核菌中的亚细胞定位。

Fig. 14. Cellular localization of PtkA and TrxB2. Lysate and culture filtrate proteins (CFP) were

prepared from wild type Mtb and $\Delta ptkA$ Mtb grown at 37 °C in Sauton medium to an OD600 of 0.6–1.0. Samples were separated by SDS-PAGE and followed by Western blot analysis with the indicated antibody. Rabbit anti-DosR polyclonal IgG was used to detect the DosR protein, which is used as a control for cytoplasm protein. Five microgram protein for α -TrxB2 and α -DosR, while 50 μ g protein for α -PtkA.

5 讨论

本研究的目标是寻找结核菌唯一的蛋白酪氨酸激酶 PtkA 的除自身及 PtpA 以外的其它底物。我们原计划利用常规的放射性双向电泳技术鉴定 PtkA 的底物，但意外地发现结核菌中存在 PtkA 磷酸化的抑制蛋白：尽管具体是哪个蛋白发挥抑制作用还有待深入研究，但这极有可能是至今未见报道 PtkA 其它底物的主要原因。通过本研究以及其它文献资料可以窥见结核菌生理过程的复杂性（图 14）：PtkA 磷酸化 PtpA 通过某分泌系统分泌到胞外（本实验室未发表数据），后者在结核菌感染宿主及潜伏感染过程中十分重要 [1,3,4,34]；而 PtpA 的活性同时也受到 PtkA[12]及某些真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶（STPKs）的磷酸化调控（本实验室未发表数据）。同时，PtpA 的调控蛋白 PtkA 的自磷酸化活性也能被某些 STPKs 激活（本实验室未发表数据），而本研究又发现了 PtkA 的自磷酸化活性被某个蛋白所抑制。所以，综合可知，PtkA 可能在结核菌胞内信号转导过程中起着桥梁分子的作用，厘清该作用网络对于揭示结核菌的致病性十分重要。

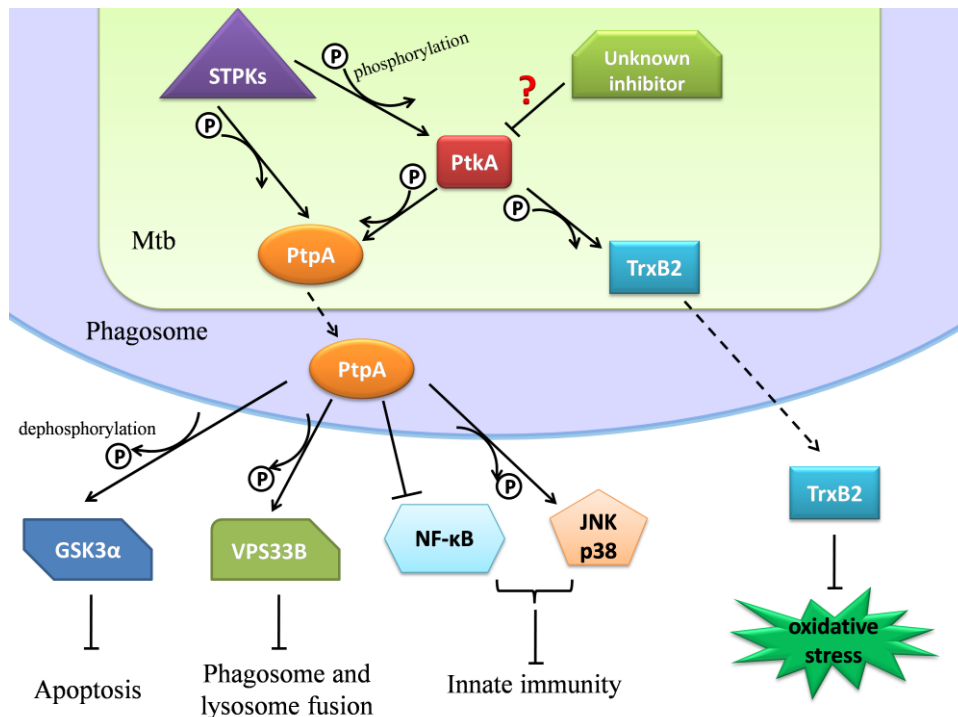


图 14. PtkA 调控底物及信号传递示意图

Fig. 14. A model for the regulation network and signal transduction in Mtb.

接着我们利用生物信息学方法预测到 8 个潜在的酪氨酸磷酸化蛋白质。然后利用一系列生物化学方法体外证明了其中的 TrxB2 是 PtkA 的底物, 其磷酸化残基为 32 位的酪氨酸。根据序列比对信息发现, 结核菌的 TrxB2 和恶臭假单胞菌 (*P. putida*) 中的同源蛋白 TrxB2 的 24 位磷酸化酪氨酸残基是相同位置, 且磷酸化酪氨酸残基附近的氨基酸同源性也相当高。该结果也证明了细菌之间磷酸化位点的保守性。值得注意的是, 预测到的其它 7 个潜在的酪氨酸磷酸化蛋白质与其它细菌的酪氨酸磷酸化蛋白质同源性都很高(表 2), 但都不能被结核菌的 PtkA 磷酸化。基于此, 我们可以大胆假设结核菌中可能还存在其它的蛋白酪氨酸激酶, 而这些预测的蛋白可能是这些未知蛋白酪氨酸激酶的底物。

TrxB2 是结核菌基因组编码的唯一一个硫氧还蛋白还原酶, 此外结核菌基因组还编码三个硫氧还蛋白 TrxA、TrxB1 和 TrxC [35]。TrxB2 和 TrxC 组成了结核菌中的硫氧还蛋白系统。在生物界中, 硫氧还蛋白系统是一种广泛分布的重要的巯基-二硫化物氧化还原酶系统 [36], 其作用是将电子从 NADPH 转移到终端氧化底物和蛋白的二硫键上 [37]。硫氧还蛋白系统在诸如维持细胞还原状态、DNA 合成及转录调控等众多代谢通路方面有着举足轻重的作用 [38]。硫氧还蛋白是一种小分子蛋白, 具有一个保守的 CXXC 催化基序, 该基序形成一个活性中心二硫醇并进行可逆化的氧化还原级联反应。而该氧化还原级联反应是基于硫氧还蛋白还原酶催化的一种 NADPH 氧化反应, 能够介导氧化性硫氧还蛋白[Trx-(S)₂]的减少及还原性硫氧还蛋白-(SH)₂的形成。最后, 在该级联反应的最终阶段, 还原性的硫氧还蛋白将一个末端底物还原 [15]。

有文献报道在大肠杆菌中异源表达的由结核菌 Trx B2 和 TrxC 组成的硫氧还蛋白系统能够还原二硝基苯 (dinitrobenzene) 和氢过氧化枯烯 (cumene hydroperoxide), 而后者的还原可以不依赖于硫氧还蛋白 [39]。该系统通过降低烷基氢过氧化物酶(ahpC)的表达来帮助病原菌抵御活性氧中间产物(ROIs)[36,40]。此外, 该系统还通过给巯基过氧化物酶 Tpx 提供电子的方式在氢过氧化物和过氧亚硝基盐解毒过程中起着重要作用 [36]。本研究显示, TrxB2 的磷酸化作用没有影响其硫氧还蛋白还原酶活性, 但其磷酸化却能抑制 TrxB2 的分泌。也就是说结核菌 H37Rv Δ ptkA 突变株分泌了更多的 TrxB2 到细胞外。本实验室未发表的反向遗传学数据显示, 体外培养的结核菌 H37Rv Δ ptkA 突变株比野生株更加耐受 H₂O₂ 和氢过氧化枯烯。因此, 我们的实验结果可以解释这一现象: 结核菌 H37Rv Δ ptkA 突变株分泌了更多的 TrxB2 到细胞外, TrxB2 独自或与 TrxC 共同对 H₂O₂ 和氢过氧化枯烯进行了解毒作用, 从而使该突变株更加耐受这些氧化压力。但是这一过程对于结核菌自身的代谢或生存有何意义还有待进一步研究。

参考文献

1. Bach H, Papavinasasundaram KG, Wong D, Hmama Z, Av-Gay Y (2008) *Mycobacterium tuberculosis* virulence is mediated by PtpA dephosphorylation of human vacuolar protein sorting 33B. *Cell Host Microbe* 3: 316-322.
2. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y (2011) *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108: 19371-19376.
3. Poirier V, Bach H, Av-Gay Y (2014) *Mycobacterium tuberculosis* promotes anti-apoptotic activity of the macrophage by PtpA protein-dependent dephosphorylation of host GSK3 α . *J Biol Chem* 289: 29376-29385.
4. Wang J, Li BX, Ge PP, Li J, Wang Q, et al. (2015) *Mycobacterium tuberculosis* suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system. *Nat Immunol* 16: 237-245.
5. Margenat M, Labandera AM, Gil M, Carrion F, Purificacao M, et al. (2015) New potential eukaryotic substrates of the mycobacterial protein tyrosine phosphatase PtpA: hints of a bacterial modulation of macrophage bioenergetics state. *Sci Rep* 5: 8819.
6. Wong D, Chao JD, Av-Gay Y (2013) *Mycobacterium tuberculosis*-secreted phosphatases: from pathogenesis to targets for TB drug development. *Trends Microbiol* 21: 100-109.
7. Bach H, Wong D, Av-Gay Y (2009) *Mycobacterium tuberculosis* PtkA is a novel protein tyrosine kinase whose substrate is PtpA. *Biochem J* 420: 155-160.
8. Olsen JV, Blagoev B, Gnäd F, Macek B, Kumar C, et al. (2006) Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell* 127: 635-648.
9. Song H, Sandie R, Wang Y, Andrade-Navarro MA, Niederweis M (2008) Identification of outer membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 88: 526-544.
10. Chao JD, Wong D, Av-Gay Y (2014) Microbial Protein-tyrosine Kinases. *J Biol Chem* 289: 9463-9472.
11. Stehle T, Sreeramulu S, Lohr F, Richter C, Saxena K, et al. (2012) The apo-structure of the low molecular weight protein-tyrosine phosphatase A (MptpA) from *Mycobacterium tuberculosis* allows for better target-specific drug development. *J Biol Chem* 287: 34569-34582.
12. Zhou P, Li W, Wong D, Xie J, Av-Gay Y (2015) Phosphorylation control of protein tyrosine phosphatase A activity in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Lett* 589: 326-331.
13. Chow K, Ng D, Stokes R, Johnson P (1994) Protein tyrosine phosphorylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett* 124: 203-207.
14. Cowley S, Ko M, Pick N, Chow R, Downing KJ, et al. (2004) The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth in vivo. *Mol Microbiol* 52: 1691-1702.
15. Attarian R, Bennie C, Bach H, Av-Gay Y (2009) Glutathione disulfide and S-nitrosoglutathione detoxification by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin system. *FEBS Lett* 583:

- 3215-3220.
16. 戴灿, 苗聪秀, 卢光琇 (2010) 基于重叠延伸 PCR 法的定点突变技术. 现代生物医学进展 10: 411-412.
 17. Morrissey JH (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels: a modified procedure with enhanced uniform sensitivity. *Anal Biochem* 117: 307-310.
 18. Rabilloud T (1992) A Comparison between Low Background Silver Diammine and Silver-Nitrate Protein Stains. *Electrophoresis* 13: 429-439.
 19. Holmgren A (1977) Bovine thioredoxin system. Purification of thioredoxin reductase from calf liver and thymus and studies of its function in disulfide reduction. *J Biol Chem* 252: 4600-4606.
 20. Prsic S, Dankwa S, Schwartz D, Chou MF, Locasale JW, et al. (2010) Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 7521-7526.
 21. Tan CS, Bodenmiller B, Pasculescu A, Jovanovic M, Hengartner MO, et al. (2009) Comparative analysis reveals conserved protein phosphorylation networks implicated in multiple diseases. *Sci Signal* 2: ra39.
 22. Mijakovic I, Petranovic D, Macek B, Cepo T, Mann M, et al. (2006) Bacterial single-stranded DNA-binding proteins are phosphorylated on tyrosine. *Nucleic Acids Res* 34: 1588-1596.
 23. Macek B, Gnad F, Soufi B, Kumar C, Olsen JV, et al. (2008) Phosphoproteome analysis of *E. coli* reveals evolutionary conservation of bacterial Ser/Thr/Tyr phosphorylation. *Mol Cell Proteomics* 7: 299-307.
 24. Macek B, Mijakovic I, Olsen JV, Gnad F, Kumar C, et al. (2007) The serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the model bacterium *Bacillus subtilis*. *Mol Cell Proteomics* 6: 697-707.
 25. Soufi B, Gnad F, Jensen PR, Petranovic D, Mann M, et al. (2008) The Ser/Thr/Tyr phosphoproteome of *Lactococcus lactis* IL1403 reveals multiply phosphorylated proteins. *Proteomics* 8: 3486-3493.
 26. Ravichandran A, Sugiyama N, Tomita M, Swarup S, Ishihama Y (2009) Ser/Thr/Tyr phosphoproteome analysis of pathogenic and non-pathogenic *Pseudomonas* species. *Proteomics* 9: 2764-2775.
 27. Voisin S, Watson DC, Tessier L, Ding W, Foote S, et al. (2007) The cytoplasmic phosphoproteome of the Gram-negative bacterium *Campylobacter jejuni*: evidence for modification by unidentified protein kinases. *Proteomics* 7: 4338-4348.
 28. Sun X, Ge F, Xiao CL, Yin XF, Ge R, et al. (2010) Phosphoproteomic analysis reveals the multiple roles of phosphorylation in pathogenic bacterium *Streptococcus pneumoniae*. *J Proteome Res* 9: 275-282.
 29. Parker JL, Jones AM, Serazetdinova L, Saalbach G, Bibb MJ, et al. (2010) Analysis of the phosphoproteome of the multicellular bacterium *Streptomyces coelicolor* A3(2) by protein/peptide fractionation, phosphopeptide enrichment and high-accuracy mass

- spectrometry. *Proteomics* 10: 2486-2497.
30. Lin MH, Hsu TL, Lin SY, Pan YJ, Jan JT, et al. (2009) Phosphoproteomics of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 reveals a tight link between tyrosine phosphorylation and virulence. *Mol Cell Proteomics* 8: 2613-2623.
 31. Ge R, Sun X, Xiao C, Yin X, Shan W, et al. (2011) Phosphoproteome analysis of the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* reveals over-representation of tyrosine phosphorylation and multiply phosphorylated proteins. *Proteomics* 11: 1449-1461.
 32. Misra SK, Milohanic E, Ake F, Mijakovic I, Deutscher J, et al. (2011) Analysis of the serine/threonine/tyrosine phosphoproteome of the pathogenic bacterium *Listeria monocytogenes* reveals phosphorylated proteins related to virulence. *Proteomics* 11: 4155-4165.
 33. Jers C, Pedersen MM, Paspaliari DK, Schutz W, Johnsson C, et al. (2010) *Bacillus subtilis* BY-kinase PtkA controls enzyme activity and localization of its protein substrates. *Mol Microbiol* 77: 287-299.
 34. Wong D, Bach H, Sun J, Hmama Z, Av-Gay Y (2011) *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 19371-19376.
 35. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, et al. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393: 537-544.
 36. Jaeger T, Budde H, Flohe L, Menge U, Singh M, et al. (2004) Multiple thioredoxin-mediated routes to detoxify hydroperoxides in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Biochem Biophys* 423: 182-191.
 37. Holmgren A (2000) Antioxidant function of thioredoxin and glutaredoxin systems. *Antioxid Redox Signal* 2: 811-820.
 38. Holmgren A, Bjornstedt M (1995) Thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* 252: 199-208.
 39. Zhang Z, Hillas PJ, Ortiz de Montellano PR (1999) Reduction of peroxides and dinitrobenzenes by *Mycobacterium tuberculosis* thioredoxin and thioredoxin reductase. *Arch Biochem Biophys* 363: 19-26.
 40. Manca C, Paul S, Barry CE, 3rd, Freedman VH, Kaplan G (1999) *Mycobacterium tuberculosis* catalase and peroxidase activities and resistance to oxidative killing in human monocytes in vitro. *Infect Immun* 67: 74-79.

附录

附录 1

第 3 章的 Table S1-S8 表格太大，具体请到下面网站下载：

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156713481500057X>

附录 2 缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
AA	Amino acid	氨基酸
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	枯草芽孢杆菌
BCG	bacillus Calmette-Gu érin	BCG 疫苗
BLAST	Basic local alignment search tool	局部比对基本检索工具
bp	Base pair	碱基对
<i>C. jejuni</i>	<i>Campylobacter jejuni</i>	空肠弯曲杆菌
CaMKII	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent kinase II	Ca ²⁺ /钙调节素依赖的蛋白激酶 II
CFP	culture filtered protein	培养基滤液蛋白组分
CFP-10	the 10-kD culture filtrate protein	10kDa 滤液蛋白
CFU	colony-forming units	菌落形成单位
CM	cell membrane fraction	细胞膜组分
coronin 1	Tryptophan aspartate containing coat protein	色氨酸天冬氨酸膜蛋白
CW	cell wall pellet	细胞壁组分
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin	树突状细胞特异性细胞间黏附分子-3-结合非整合素分子
ddH ₂ O	Deionic distilled water	去离子蒸馏水
DEPC	Diethy pyrocarbonate	焦碳酸二乙酯
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	脱氧核苷三磷酸
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)	5,5'-二巯基-(2-硝基苯甲酸)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia. coli</i>	大肠埃希氏菌
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay	酶联免疫吸附测定法
ESAT-6	early secreted antigenic target 6 kD	6kDa 早期分泌抗原
ESX	type VII secretion systems	VII型分泌系统
g	Gram	克
GFP	Green Fluorescent Protein	绿色荧光蛋白
GSK3 α	glycogen synthase kinase 3 α	糖原合酶激酶

h	Hour	小时
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>	幽门螺杆菌
Hyg	Hygromycin B	潮霉素 B
IPTG	isopropyl- β -d-thiogalactoside	异丙基- β -d-硫代半乳糖苷
IVN	isovaleronitrile	异戊腈
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	克雷伯氏肺炎菌
Kan	Kanamycin	卡那霉素
kDa	kilodalton	千道尔顿
kg	kilogram	千克
<i>L. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	乳酸乳球菌
<i>L.monocytogenes</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	单增李斯特氏菌
LAM	lipoarabinomannan	脂阿拉伯-甘露醇聚糖
LAMPs	Lysosome-associated membrane protein	蛋白酶及溶酶体相关的膜蛋白
LB	Luria-Bertani medium	LB 培养基
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LpdC	Lipoamide dehydrogenase	硫辛酰胺脱氢酶
<i>M. avium</i>	<i>Mycobacterium avium</i>	鸟分枝杆菌
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>	牛分枝杆菌
<i>M. gilvum</i>	<i>Mycobacterium gilvum</i>	浅黄分枝杆菌
<i>M. marinum</i>	<i>Mycobacterium marinum</i>	海分枝杆菌
<i>M. microti</i>	<i>Mycobacterium microti</i>	田鼠分枝杆菌
<i>M. smegmatis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>	耻垢分枝杆菌
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	结核分枝杆菌
mAGP	Mycolyl-arabinogalactan-peptidoglycan	分枝酰基-阿拉伯半乳聚糖-肽聚糖
MBP	maltose binding protein	麦芽糖结合蛋白
MDR-TB	multidrug-resistant TB	耐多药结核病
β -ME	β -mercaptoethanol	β -巯基乙醇
mg	milligram	毫克
min	Minute	分钟
ml	milliliter	毫升
MR	mannose receptor	甘露糖受体
MTBC	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex	结核分枝杆菌复合物
myelin BP	myelin basic protein	髓鞘碱性蛋白
NCBI	National Center of Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
OD	Optical density	吸光度
ORF	Open reading frame	开放阅读框
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	铜绿假单胞菌
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	恶臭假单胞菌

附 录

PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链反应
PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase	磷脂酰肌醇-3-激酶
PI3P	phosphatidylinositol 3-phosphate	磷脂酰肌醇-3-磷酸
PMA	phorbol myristoyl acetate	佛波酯
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PTK	protein tyrosine kinase	蛋白酪氨酸激酶
PtkA	protein tyrosine kinase A	蛋白酪氨酸激酶 A
PtpA	protein tyrosine phosphatase A	蛋白酪氨酸磷酸酶 A
RD1	region of difference 1	RD1 区
RILP	Rab-interacting lysosomal protein	Rab-交联溶酶体蛋白
ROIs	Reactive oxygen species	活性氧中间产物
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	天蓝色链霉菌
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	肺炎链球菌
SD	standard deviation	标准偏差
SDS	sodium dodecyl sulfate	十二烷基硫酸钠
SecA1	general secretion pathway	通用型分泌系统
SecA2	accessory secretion system	替代型分泌系统
SNARE	soluble NSF attachment protein receptor	可溶性 N-乙基顺丁希二酰亚胺敏感因子连接蛋白受体核心复合体
SOL	soluble fraction	可溶解的细胞质组分
SQRD	sulfide quinone oxidoreductase	硫化醌氧化还原酶
STPKs	Serine/ threonine protein kinase	真核样丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶
Tat	twin-arginine translocation	双精氨酸分泌系统
TDM	trehalose 6,6'-dimycolate or cord factor	海藻糖二分支菌醇或索状因子
TFP	trifunctional enzyme	三功能酶
TLR2	Toll like receptor 2	Toll 样受体 2
Tris	tris hydroxy methyl aminomethan	三羟甲基氨基甲烷
VPS33B	human vacuolar protein sorting 33B	人小泡分选蛋白 33B
VpsC-HOP	VpsC-homotypic protein sorting complex	VpsC-同型蛋白分选复合体
WCL	whole cell lysates	全细胞裂解液
XDR-TB	extensively drug resistant TB	广泛耐药结核病

致 谢

时间如白驹过隙，转眼又到毕业季。在西南大学的时光，看过了二乔玉兰花开花谢六轮回，也看过了有志青年入学毕业五更替。终于轮到自己毕业，回首过往，心怀感恩，感慨良多。

首先要诚挚地感谢我的硕士和博士阶段的导师谢建平研究员。谢老师有着严谨的治学风格、正直的为人之道、踏实的工作态度、全球性的视野、幽默风趣的谈吐、极富创新的思维、宽厚仁慈的胸怀以及积极乐观的生活态度。谢老师的这些品格有时犹如一面旗帜，鼓舞我们的斗志；有时犹如一座灯塔，指引我们前进的方向。早在我读大三有考研想法时，我就联系了谢老师。谢老师的第一封邮件发给我十多篇 nature、cell 或 science 的文章让我翻译，从此我正式摸到了科学的大门。直到读研究生，我陆陆续续翻译了差不多十万字；期间轻松考过之前 4 次都未过的英语四级，紧接着一次性考过六级并在考研英语中获得西南大学生科院第一的好成绩。进入硕士阶段，谢老师始终坚持以“复合领军型人才”的原则培养我们。在学期间，我在科研、实验室管理以及其它社会活动方面积累了许多宝贵的经验。进入博士阶段后，在谢老师的指导下，我发表了一些科技论文并成功申请到两项校级项目，也与国内外的院士大牛们面对面交流过，这为我以后的科研生涯打下了坚实的基础。同时，也要特别感谢谢老师提供给我出国留学的机会，这是我一生的宝贵财富。

衷心地感谢加拿大不列颠哥伦比亚大学 (UBC) 医学院的 Yossef Av-Gay 教授。感谢 Av-Gay 教授提供给我的联合培养的机会，感谢 Av-Gay 教授对我实验选题和设计方面的指导以及在我实验迷茫时期对我的鼓励和安慰。在温哥华的一年学习时光，值得我铭记一生！

感谢西南大学生科院的孙敏教授、王德寿教授、黄红辉教授、阮华教授、李礼教授、陈亚飞老师、杨蕊老师和唐知然老师这几年来在管理和日常事务中的帮助。感谢李洪涛教授及其硕士生黄娟和杨茹对 western blot 实验的大力支持，感谢罗凌飞教授及其博士生陆辉强在电转化方面的帮助，感谢罗克明教授及其博士生杨立在实验耗材和仪器上的帮助。

感谢 IMB 这个温暖的大家庭。人生中最好的五年时光，我和大家在这里挥洒汗水，播种希望。感谢吴俊师姐在我初来乍到之际手把手地教会我基本的实验技能和严谨的科学态度；感谢蒋德梅博士、赵全菊博士、邓万燕博士和同年级的陈恬在细胞实验方面的愉快合作；感谢周培富博士在加拿大期间对我实验和生活上的无私帮助，十分怀念我们在温哥华一起做饭、实验和游玩的三个月；感谢廖国

建教授、冀磊博士、何颖博士、龙泉鑫博士、杜庆林博士、樊祥宇博士、庞蕾博士、赵宇中博士、谢龙祥博士、刘明强等在实验方面提出的意见和建议，本文的顺利完成，与他们的帮助密不可分，在此特别感谢。感谢已经毕业的师兄师姐对我的照顾和关怀，他们是王琳师姐、吴雷婷师姐、胡锦师姐、毋凡师兄、贺君丽师姐、张繁师姐、侯曼美师姐、毕继才师兄、石廷玉师兄。感谢同年级的王晓珍、郑斐、周叶欣和滕铁山，以及朱传智、张帅帅和寇菲，三年的友谊记心中，并期待我们的再重逢。感谢师弟付体伟、毛金校、张震、严建龙、李启明、Abu Algasim、段湘科、周明亮、于召箫、任赛、鄢双全、许峻旗和王华，师妹贺黎铭、陈静、曾立容、唐榭梅、洪伟玲、喻晓雯、李春梅、曾洁、向小洪、黄琴琴、罗红萍、刘虹、王瑞、李慧、王欢、徐萌萌、林燕萍、张晨辉、李萍、童艳、张怡和郭思瑶等，是你们的欢声笑语让我暂时忘却实验不顺带来的烦恼，十分荣幸能和你们在 IMB 一起学习和成长。

感谢 UBC 免疫和感染研究中心的研究助理 Jeffrey Helm 在我申请联培及在 UBC 学习阶段提供的诸多帮助，感谢 Mary Ko 对我实验提供的技术支持，感谢加拿大不列颠哥伦比亚省 CDC 的 Neil Chin 和 John Tansey 在 P3 实验操作培训方面的帮助。感谢 Av-Gay 教授实验的 Horacio Bach 教授、Dennis Wong 博士、Xingji Zheng 博士、Joseph Chao 博士、Valerie Poirier 博士、Melissa Richard 博士、Gagan Deepnarula 博士、Sandra Pena 和 Enav Zuzm 等在实验中的指导和生活中的帮助。感谢 Jack Bell Research Centre 的华人学者莫凡博士、刘亮亮博士、Yabin Cheng 博士、Yubin Guo 博士、Kenny、尹光明医生和梁培禾医生等，依然怀念和你们在 Granville Island 的篮球场上挥汗如雨、在 Boundary Bay 抓螃蟹和 BBQ、在 Garibaldi Lake 边 hiking 的时光。有你们的陪伴，温哥华的日子是那么的美好和温馨。

感谢我的父母和姐姐姐夫，你们始终如一的支持和无私的爱让我可以安心完成学业。感谢我小姑妈一家，没有你们的精神鼓励和资金上的帮助，我甚至可能连大学都上不了。感谢我的岳父岳母做担保人，让我顺利出国留学。

感谢我的妻子阎紫菲对本文校对所付出的努力，遇见你是我一生的最美丽的邂逅！

情到深处，方知文字之苍白。有太多的人需要感谢，我将永远怀着一颗感恩的心。

谨以此文纪念我的六年硕博生活。

李 武

2015 年 4 月于西南大学 29 教 629 室

在学期间发表的论文

第一作者	状态
1. Li W , Fan X, Long Q, et al. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> effectors involved in host-pathogen interaction revealed by a multiple scales integrative pipeline. <i>Infection Genetics and Evolution</i> , 2015, 32: 1-11. (5-Year IF: 3.335)	已发表
2. Li W , Zhao Q, Deng W, et al. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Rv3402c enhances mycobacterial survival within macrophages and modulates the host pro-inflammatory cytokines production via NF-Kappa B/ERK/p38 signaling. <i>PloS one</i> , 2014, 9(4): e94418. (5-Year IF: 4.015)	已发表
3. Li W , He J, Xie J, et al. Comparative genomic insights into the biosynthesis and regulation of mycobacterial siderophores. <i>Cellular Physiology and Biochemistry</i> , 2013, 31: 1-13. (5-Year IF: 3.309)	已发表
4. Li W , Xie J. Role of mycobacteria effectors in phagosome maturation blockage and new drug targets discovery. <i>Journal of Cellular Biochemistry</i> , 2011, 112: 2688-2693. (5-Year IF: 3.117)	已发表
5. 李武 , 王洪海, 谢建平. 分枝杆菌分泌系统. <i>中国生物化学与分子生物学报</i> . 2010 (8): 697-704. (核心期刊)	已发表
第二作者	
1. Zhou P, Li W , Wong D, et al. Phosphorylation control of protein tyrosine phosphatase A activity in <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . <i>FEBS Lett</i> , 2015, 589: 326-331. (5-Year IF: 3.470)	已发表
2. Deng W, Li W , Zeng J, et al. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> PPE Family Protein Rv1808 Manipulates Cytokines Profile via Co-Activation of MAPK and NF-kappaB Signaling Pathways. <i>Cellular Physiology and Biochemistry</i> , 2014, 33: 273-288. (5-Year IF: 3.309)	已发表
3. Zhao Q, Li W , Chen T, et al. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> serine protease Rv3668c can manipulate the host-pathogen interaction via Erk-NF-κB axis-mediated cytokine differential expression. <i>Journal of Interferon and Cytokine Research</i> , 2014. DOI:10.1089/jir.2013.0071. (5-Year IF: 3.267)	已发表
4. Fan X, Li W , Zheng F, et al. Bacteriophage inspired antibiotics discovery against infection involved biofilm. <i>Crit Rev Eukaryot Gene Expr</i> , 2013, 23: 317-326. (5-Year IF: 3.082)	已发表
5. Xie L, Li W , Xie J. Prokaryotic Nepsilon-lysine acetylomes and implications for new antibiotics. <i>Journal of Cellular Biochemistry</i> , 2012, 113: 3601-3609. (5-Year IF: 3.117)	已发表
6. Liu M, Li W , Xiang X, et al. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> effectors interfering host apoptosis signaling. <i>Apoptosis</i> , 2015: 1-9. (5-Year IF: 3.865)	已发表

在学期期间参加的课题

在学期期间参加的课题

基金名称	资助单位	项目编号	
国家重要传染病十一 五科技重大专项	卫生部	2008ZX10003-006	参加
中央高校基本科研业 务费专项资金	教育部	XDJK2009A003	参加
国家自然科学基金 新世纪优秀人才支持 计划	国家自然科学基金委员会 教育部	81071316, 81371851, 81271882 NCET-11-0703	参加 参加
西南大学研究生科技 创新基金项目	西南大学	ky2011003	主持
中央高校基本科研业 务费(学生)专项资金	教育部	XDJK2012D011	主持
2013 年国家公派研究 生项目	教育部	留金发[2013]3009	被资助人