



专论与综述

基于蛋白质组芯片的结核分枝杆菌系统生物学研究进展

江河伟^{1,2} 郑云箫^{1,2} 陶生策^{*1,2}

1 上海交通大学系统生物医学研究院 上海 200240

2 系统生物医学教育部重点实验室 上海 200240

摘要: 近些年全球结核病疫情愈发严重, 耐药性结核病使其雪上加霜。一个重要原因是结核病新药的匮乏以及结核分枝杆菌相关基础研究的不足。因此迫切需要开发新的技术以促进结核病系统生物学基础研究, 并在此基础上研究新机制, 发现新靶标, 开发新药物。结核分枝杆菌功能蛋白质组芯片的出现旨在促进结核病相关研究工作。考虑到结核分枝杆菌高毒性、复制周期长和需要在生物安全三级实验室中开展研究等特点和难点, 该工具为结核病相关研究人员提供了一个强有力的武器。目前这一技术手段的应用已经使我们对结核分枝杆菌-宿主相互作用、小分子-蛋白结合以及抗生素耐药性机制等关键生物过程有了更深入的了解。为了更好地帮助同行了解这一有效的工具, 本文综述了结核分枝杆菌功能蛋白组芯片的几种主要应用, 期望同行专家能更好地将其应用于结核病相关的基础研究中。

关键词: 结核分枝杆菌, 蛋白质组芯片, 病原-宿主相互作用, 蛋白-蛋白相互作用, 蛋白质-小分子相互作用

Advances in system biology of *Mycobacterium tuberculosis* based on proteome microarray

JIANG He-Wei^{1,2} ZHENG Yun-Xiao^{1,2} TAO Sheng-Ce^{*1,2}

1 Shanghai Center for Systems Biomedicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

2 Key Laboratory of Systems Biomedicine, Ministry of Education, Shanghai 200240, China

Abstract: Tuberculosis (TB) is still one of the leading causes of death worldwide. Due to the ever-growing problem of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) drug resistance, TB is still not well controlled. There is an urgent need to develop new technology for promoting *Mtb* basic research, and to reveal new mechanisms, identify new targets, and develop new anti-*Mtb* drugs. Bore this need in mind, a *Mtb* functional proteome microarray was constructed to promote basic research. Considering the high virulence of *Mtb*, long replication cycle, it is very difficult to perform *Mtb* related studies, thus efficient tool is need. The proteome microarray is a powerful tool for the researchers in the field of TB study. It has already been successfully applied in a wide range of studies. Better understandings of a variety of key biological processes have already been added, for example, *Mtb*-host interactions, small-molecule-protein binding and mechanism of antibiotic resistance. In order to help readers to better understand this powerful tool, we present several major applications of the *Mtb* functional proteome microarray in this review, we anticipate researchers will adopt

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31670831)

***Corresponding author:** E-mail: taosc@sjtu.edu.cn

Received: 01-11-2018; **Accepted:** 15-01-2019

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31670831)

***通信作者:** E-mail: taosc@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2018-11-01; **接受日期:** 2019-01-15

this powerful tool for a variety of TB related studies, thus facilitate both basic and clinical research of TB.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, Proteome microarray, Host-pathogen interaction, Protein-protein interaction, Protein-small molecule interaction

结核病是由结核分枝杆菌所引起,是目前全球十大死亡原因之一,结核病所导致死亡的人数在所有感染性疾病中排名第一^[1]。据世界卫生组织评估,2017年全球结核病患病人数约1 000万人,死亡人数达160万^[1]。2018年9月召开的联合国结核病问题高级别会议特别呼吁各国需要紧密联合为终止结核病紧急行动起来。现阶段结核病的治疗难点主要在于多重耐药性(Multi drug resistance, MDR)和广泛耐药性(Extensive drug resistance, XDR)结核病^[2]。多重耐药性结核病的治愈率为55%,而广泛耐药性结核病的治愈率仅只有34%^[1]。结核病新药的匮乏以及结核分枝杆菌相关基础研究的不足是耐药性结核病治愈率低下的主要原因^[3]。因此开发新技术用于促进结核病基础研究,并在此基础上研发新的抗结核病药物、疫苗和诊断方法就显得尤为迫切。

蛋白质组芯片是一种将一个物种的全部或者大部分基因所编码的蛋白质以阵列的形式固定在固相表面上的技术。采用蛋白质组芯片,可在单次实验中进行生物分子与蛋白质相互作用的全局性筛选及其它蛋白质相关的研究。蛋白质芯片具有高通量、微型化和样品消耗少等特点^[4-5]。目前蛋白质组芯片可以用于蛋白-蛋白相互作用^[6]、蛋白-DNA相互作用^[7]、蛋白-小分子相互作用^[8]以及血清标志物的发现等^[9],这些应用对于系统性地了解复杂疾病具有重要意义^[10]。将蛋白质组芯片技术应用于结核病的系统生物学研究,可有助于结核分枝杆菌以及其与宿主之间相互作用的研究,还可以规避结核分枝杆菌高毒力、复制周期长和实验室不易研究等特点,从而促进相关药物及疫苗的开发等。

国内多个研究团队联合攻关,构建了世界上第一款结核分枝杆菌功能蛋白质组芯片^[11],蛋白质覆盖率超过95%。该芯片上包含3 829种结核分枝

杆菌标准菌株H37Rv所编码的以及433种结核分枝杆菌毒株CDC1551所编码的,总共4 262种蛋白质。所有这些蛋白质均在N-末端带有GST标签,在酿酒酵母体系中诱导过表达,通过GST亲和介质富集纯化,洗脱液中含有25%的甘油以利于冻存。所纯化的蛋白浓度范围一般在0.1-1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,纯度在85%以上。纯化的蛋白质以8 μL /孔分装于384孔板,于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。蛋白质芯片的制备采用专用的生物芯片点样仪,根据应用的不同采用不同修饰或包被类型的基片。制备好的芯片在-80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存以备用。

本文将重点介绍近年基于该蛋白质组芯片所进行的结核分枝杆菌相关研究工作,简述其在病原宿主相互作用、信号传导通路研究中的应用以及关于结核分枝杆菌新药靶点发现的研究,并对蛋白质组芯片在结核分枝杆菌中的系统生物学应用进行总结和展望。

1 蛋白质组芯片用于病原宿主相互作用研究

结核分枝杆菌作为一种胞内病原菌,进化出了多种高效的策略使其在感染宿主后能够避免受到免疫系统的攻击,从而可以长期潜伏于宿主的巨噬细胞中^[12-13]。这其中就包括通过分泌特定的效应蛋白干扰宿主细胞的信号通路和生物学功能来促进其在宿主细胞中的存活^[14-16]。例如,结核分枝杆菌可以分泌一种酪氨酸磷酸酶 PtpA 抑制宿主细胞吞噬体膜上的氢离子转运 ATP 酶活性,从而避免吞噬体的酸化对其带来的不利影响^[17]。然而目前只有少量结核分枝杆菌效应蛋白的功能被解析^[18-20],这对于理解结核分枝杆菌与宿主之间复杂的相互作用机制来说远远不够。

当前研究病原宿主相互作用的方法主要采用酵母双杂交(Y2H)和亲和纯化-质谱分析(AP-MS)这两种技术^[21-23]。酵母双杂交由于具有很高的假阳性

率, 只能检测到 20% 的蛋白-蛋白相互作用^[24-25], 而亲和纯化-质谱分析则不能区分亲和纯化下来的蛋白与诱饵蛋白之间是直接或者是非直接作用的关系^[22,24]。这两种技术不适宜用来全局性发现结核分枝杆菌与宿主的蛋白-蛋白相互作用。

Wang 等发现结核分枝杆菌的磷酸酶 PtpA 通过拮抗宿主细胞的泛素连接酶 TRIM27 来抑制巨噬细胞相关细胞因子的产生以及促进分枝杆菌在巨噬细胞内的生存^[26]。为了全局性解析调控 TRIM27 的效应蛋白, 作者利用结核分枝杆菌蛋白质组芯片鉴定出了 321 个与之相互作用的候选蛋白, 其中有 29 个蛋白是已报道的分泌蛋白^[27]。而且之前研究发现的 PtpA 也在这 29 个分泌蛋白列表中。生物信息学分析表明, 与 TRIM27 相互作用的蛋白功能分布多样, 如压力反应、转录调控以及基础代谢等。

He 等报道了一种新的方法 SOPHIE (Systematic unLocking Pathogen and Host Interacting Effectors)^[28], 可用于全局性研究结核分枝杆菌与宿主的蛋白-蛋白相互作用。该方法首先将人巨噬细胞进行非变性裂解, 对裂解得到的总蛋白进行生物素标记, 再将生物素标记的总蛋白与结核分枝杆菌蛋白质组芯片进行孵育, 随后采用荧光标记的链霉亲和素进行芯片孵育并读取结果。芯片上有较强结合信号的结核分枝杆菌蛋白超过 100 种。由于肺结核分枝杆菌中有相当比例的蛋白质的功能未知, 而且最有可能与宿主发生相互作用的应该是膜蛋白和分泌蛋白, 由此, 本课题组初步确定了 26 个候选蛋白质, 这些蛋白质可能参与结核分枝杆菌与宿主的相互作用。进一步, 从鉴定到的结核分枝杆菌潜在效应蛋白中, 在展示性功能研究中本课题组聚焦在一个对结核分枝杆菌生存必需的铁存储蛋白 BfrB 上^[29-30], 通过一系列实验发现该蛋白与 NF- κ B 通路中的关键亚基 RPS3 相结合。RPS3 的作用之一是调控 NF- κ B 对下游特定基因的表达。研究发现在 TNF- α 的刺激下, BfrB 能减少 RPS3 进入细胞核, 影响其对 NF- κ B 下游基因的调控^[31]。进一步在 HEK293T 细胞中过表达 BfrB 发现

能够很好地抑制 NF- κ B 下游细胞因子 IL2 和 IL8 的表达。另外, 在耻垢分枝杆菌中过表达 BfrB 能够通过抑制巨噬细胞相关细胞因子的表达, 从而促进耻垢分枝杆菌在细胞内的存活。因此, 作为一种新发现的结核分枝杆菌效应蛋白, BfrB 可以作为一个潜在的药物靶点。

通过 SOPHIE 技术筛选得到的 26 个效应蛋白对于后续结核分枝杆菌的病原宿主相互作用机制研究有重要的参考价值, 并可提供系列可用于结核药物设计和筛选的靶蛋白。这些蛋白由于与已有结核药物的作用靶蛋白不同, 因而有潜力用于耐药性结核分枝杆菌药物的设计和筛选。相比于已有技术, SOPHIE 具有以下优点: (1) 能够在单次实验中全局性地检测出结核分枝杆菌蛋白与宿主巨噬细胞蛋白裂解液的相互作用; (2) 由于芯片上的结核分枝杆菌蛋白是以高通量的方式按照相同的流程表达和纯化, 可以获得较高的局部蛋白浓度, 更有利于蛋白相互作用的检测; (3) 整个检测过程中耗时较短, 蛋白维持在生理活性状态, 结果相对可靠性高。除这 26 个蛋白质之外, 其它芯片实验所发现的强阳性蛋白中相信也有一批新的效应蛋白。当这些蛋白的功能标注得到进一步完善后, 研究者可再进行相关研究。SOPHIE 在技术上具有通用性, 有望应用于其它病原与宿主的相互作用研究。例如可采用通过商业途径获取的人蛋白质组芯片, 仿照 SOPHIE 类似的策略, 理论上将可进行任何病原与人相互作用蛋白质的全局性发现研究。

2 蛋白质组芯片在结核分枝杆菌信号传导通路研究中的应用

结核分枝杆菌长期寄生于宿主的巨噬细胞中, 拥有一套复杂的信号通路传导机制来应对来自巨噬细胞中的各种压力。了解其信号传导通路及其调控机制将有助于开发有效的药物和疫苗。本课题组关于蛋白质组芯片在结核分枝杆菌信号传导研究中的应用主要涉及两个方面, 磷酸化信

号传导通路的研究和 c-di-GMP 信号分子调控作用的研究。

磷酸化在真核细胞以及原核细胞的信号传导具有非常重要的功能^[32]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Serine threonine protein kinase, STPKs) 是一组真核生物中重要的蛋白激酶, 原核生物一般较少。但与多数细菌病原体不同的是, 结核分枝杆菌基因组编码 11 种 STPKs^[33-34]。这一组蛋白激酶在结核分枝杆菌适应复杂环境、细胞壁的合成、细胞分裂和致病性方面扮演着重要的角色^[35-38]。Wu 等利用结核分枝杆菌蛋白质组芯片全局性检测了结核分枝杆菌其它蛋白与全部 11 种 STPKs 相互作用的蛋白, 构建了 STPKs-蛋白相互作用网络图谱^[39], 其中包括了 492 个结合蛋白和 1 027 个相互作用。生物信息学分析表明, 相互作用的蛋白功能分布多样, 例如双组分系统、转录调控、蛋白降解以及细胞壁合成通路等。该项研究中构建的蛋白相互作用是一个理解结核分枝杆菌中关键信号传导通路的资源。

在功能研究方面, 作为一个例子, Wu 等聚焦在丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknG 上^[39]。PknG 能够分泌到宿主胞质中, 在结核分枝杆菌的感染过程中发挥重要作用, 有望成为有效的药物靶点^[40-41]。然而其调控机制目前仍不清楚。Wu 等利用蛋白质组芯片鉴定出 59 个与 PknG 相互作用的结核分枝杆菌蛋白, 利用生物膜干涉以及酵母双杂交方法成功地验证了其中的大部分相互作用。生物信息学分析发现与 PknG 相互作用的蛋白中, 细胞壁合成通路相关的蛋白高度富集。其中包括鼠李糖合成途径中的两个重要成分 RmlA 和 WbbL2, 以及肽聚糖合成途径的关键成分 MurC^[42]。进一步研究发现 RmlA 和 MurC 都是 PknG 的磷酸化底物, PknG 可以通过磷酸化调节它们的酶学活性进而分别调控鼠李糖和肽聚糖的合成。由于鼠李糖和肽聚糖的合成通路与结核分枝杆菌细胞壁的合成密切相关^[43], 因而该研究进一步表明 PknG 是一个潜在的抗结核药物靶点。

c-di-GMP 作为细菌中普遍存在的第二信使分子^[44-45], 调控多种细胞功能, 例如细菌的运动、生物膜的形成、细胞周期和分化以及细菌的毒力等^[46-49]。c-di-GMP 在细菌中的调控功能依赖相应的众多效应分子来实现, 然而目前对于这些效应分子的研究严重不足。Zhang 等利用生物素化的 c-di-GMP 与结核分枝杆菌蛋白质组芯片反应, 发现了 30 个与 c-di-GMP 相互作用的蛋白^[50]。序列比对发现其中 12 个蛋白包含 motif AxxxxAxV。本课题组发现的相互作用中的大部分通过生物膜干涉以及免疫印迹实验得到了验证。

在初步的功能研究方面, Zhang 等从鉴定的相互作用蛋白中选择一个转录抑制因子 EthR^[50]。EthR 是乙硫异酰胺 (ETH) 激活蛋白 EthA 的转录抑制调控因子^[51], 了解 EthR 在体内的调控机制有助于解析 ETH 相关的耐药机制。研究发现 c-di-GMP 通过与 EthR 结合增强了其与 EthA 启动子序列的相互作用, 从而下调了 EthA 的转录水平。由于 EthA 参与 ETH 的活化, 因而 c-di-GMP 与 EthR 的结合可增强病原菌对 ETH 的耐药性。这项研究不仅发现了一种新型的耐药性产生的方式, 即由小分子调控引起, 而不再是传统的位点突变或修饰改变引入的耐药问题, 同时也发现了 c-di-GMP 的一种新的调控功能及作用机制即通过结合 TetR 家族蛋白调控耐药性, 这是对 c-di-GMP 调控生物膜形成而引起的耐药性的一个补充。

3 结核分枝杆菌新药靶点的发现及药物作用机制研究

结核病耐药是当前结核病治疗中的难点。目前广泛使用的抗结核药物, 如一线药物异烟肼、利福平、吡嗪酰胺、乙胺丁醇、链霉素和二线药物乙硫异烟胺 (ETH) 等都出现了不同程度的耐药性^[52]。另一方面新药研发困难重重, 50 年来仅有两种抗结核药物被研发出来^[53-54]。寻找新的药物靶点迫在眉睫。

类泛素-蛋白酶体系统 (Pup-proteasome system,

PPS)是结核分枝杆菌体内一种类似于真核生物泛素-蛋白酶体系统^[55-56], 主要行使蛋白质选择性降解的功能, 已被证明对结核分枝杆菌在宿主体内的生存至关重要。在该通路中, PafA 作为目前已知的唯一类泛素连接酶, 催化类泛素 Pup 与底物之间的连接反应^[57-59]。序列比对发现 PafA 在人体内没有同源蛋白, 并且 PPS 途径在绝大多数肠道微生物内也不存在^[60-62]。结合这些特征可以认为 PafA 是一个极具潜力的结核病药物靶点。然而结核分枝杆菌 PafA 的提纯和活性保持困难, 蛋白结构尚未被解析, 针对其开发抑制剂不易, 也无相关抑制剂或抑制机制报道。

Jiang 等发现 PafA 的类泛素连接酶活性可被丝氨酸蛋白酶抑制剂 AEBSF 高效抑制^[63]。质谱分析表明 AEBSF 主要通过共价结合丝氨酸 119 位点发挥抑制作用。进一步, 通过模拟 AEBSF 结合的空间位阻影响, 将丝氨酸 119 位点突变为苯环家族的氨基酸后 PafA 几乎完全丧失了类泛素连接酶活性。分子动力学模拟结果显示对 S119 进行扰动, 如结合 AEBSF 或突变为苯丙氨酸可造成 Pup 的 C-末端和 PafA 的结合力减弱, 从而抑制了类泛素连接酶活。随后利用生物膜层干涉技术(BLI)和赖氨酸类泛素连接实验验证了这一发现。表型结果显示针对 S119 位点进行扰动可以抑制分枝杆菌在氮饥饿和巨噬细胞中的生存。该研究通过多角度证明了 PafA S119 位点可作为一个全新的“精确”抗结核靶点用于抗结核药物的筛选和设计。考虑到针对 PafA 设计抑制剂存在的诸多困难, 该研究可为开发特异性靶向 PafA 的抑制剂提供清晰的方向, 为最终攻克耐药性结核病提供可能的选项。在该研究的基础上, 本课题组已经与相关单位合作, 针对结核分枝杆菌 PafA 的 S119 区域进行了基于计算机的药物筛选, 目前已经得到几个有较好抗结核活性的先导化合物, 相关研究在稳步推进中。

吡嗪酰胺是目前治疗结核病的一线药物。吡嗪酰胺是一个前体药, 需要由结核分枝杆菌的 *pncA* 基因编码的吡嗪酰胺酶催化成活性成分吡嗪

酸^[64]。尽管结核分枝杆菌对吡嗪酰胺的耐药性大多数是由 *pncA* 突变引起, 但该突变不能解释所有的吡嗪酰胺耐药^[64]。此前有文献报道在结核分枝杆菌中存在药物外排的耐药机制, 然而是否存在吡嗪酸外排且相关的蛋白到底有哪些目前并不清楚^[65]。Zhang 等利用生物素化的吡嗪酸与结核分枝杆菌蛋白质组芯片孵育反应, 鉴定了结合吡嗪酸的 4 种外排蛋白 Rv0191、Rv3756c、Rv3008 和 Rv1667c^[66]。表型实验发现这 4 种外排蛋白的过表达均会引起结核分枝杆菌对吡嗪酰胺、吡嗪酸的低水平抗性, 但对其他药物却无影响。与此同时, 加入外排泵抑制剂如利血平、胡椒碱和维拉帕米后, 过表达这 4 种外排蛋白的结核分枝杆菌菌株对吡嗪酰胺的敏感性会相应增加。这些结果表明这 4 种外排蛋白可能跟吡嗪酰胺/吡嗪酸外排相关, 是结核分枝杆菌吡嗪酰胺耐药的可能机制之一。

4 总结和展望

系统生物学研究有助于促进对结核分枝杆菌本身, 以及结核分枝杆菌与宿主之间相互作用的了解。然而一直以来缺乏高效的结核分枝杆菌蛋白质组学研究工具。结核分枝杆菌蛋白质组芯片的问世填补了这一空白。多个课题组基于该芯片已经有了诸多方面的应用(图 1), 如在病原宿主相互作用研究方面, 应用结核分枝杆菌蛋白质组芯片构建了一张全局性的病原-宿主蛋白的相互作用网络, 基于该相互作用网络鉴定出铁储存蛋白 BfrB 调控宿主巨噬细胞先天性免疫反应的机制。利用 *Mtb* 蛋白质芯片发现了泛素连接酶 TRIM27 与 *Mtb* 的相互作用蛋白, 加深了对 *Mtb*-病原相互作用的认识。在结核分枝杆菌信号传导通路研究中, 应用结核分枝杆菌蛋白质组芯片构建了一张全局性的激酶-蛋白的相互作用网络, 基于该相互作用网络发现了 PknG 调控结核分枝杆菌细胞壁的生成代谢通路。在蛋白小分子相互作用研究方面, 应用结核分枝杆菌蛋白质组芯片鉴定出第二信使分子 c-di-GMP 的 30 个效应分子。从鉴定到的效应分

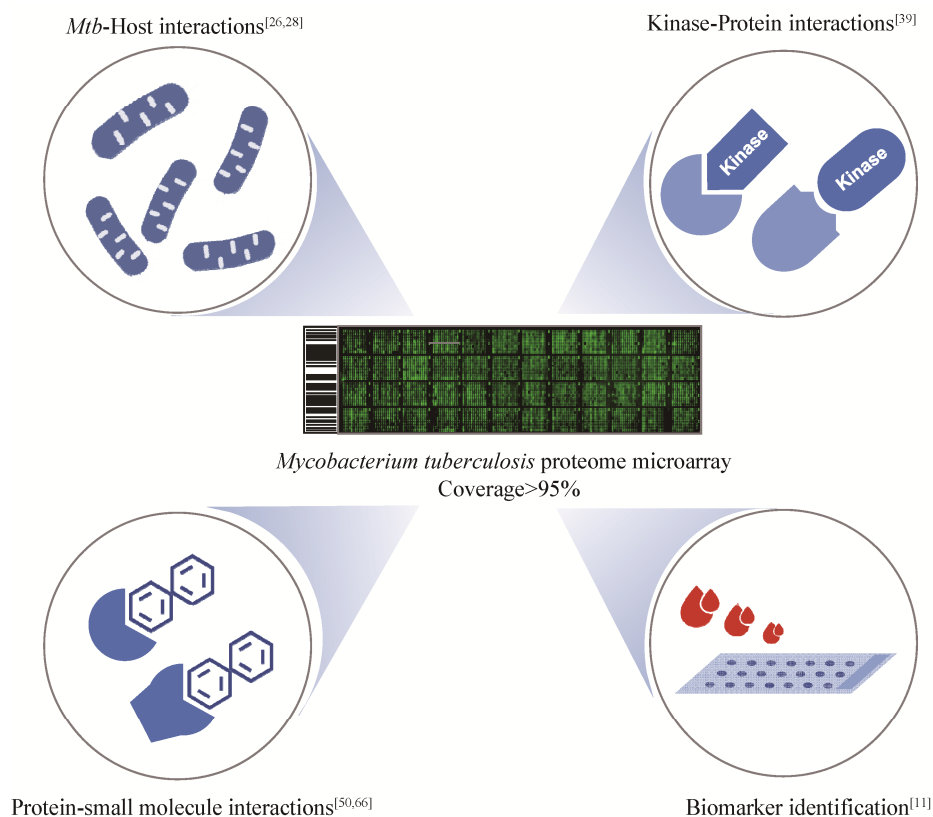


图 1 基于结核分枝杆菌蛋白质组芯片的系统生物学研究进展

Figure 1 Advances in systems biology of *Mycobacterium tuberculosis* based on proteome microarray

子中发现 c-di-GMP 通过与效应分子 EthR 的结合促进结核分枝杆菌对抗结核药 ETH 的耐药性。利用 *Mtb* 蛋白质芯片发现吡嗪酸的外排蛋白, 进一步补充了对吡嗪酰胺耐药机制的认识。而利用结核分枝杆菌蛋白质组芯片寻找潜在的生物标志物和免疫原, 用于疾病的早诊断及预后, 也是该芯片的应用之一。另外在新药靶点的发现方面, 也鉴定出 PafA S119 位点可作为一个全新的“精确”抗结核靶点用于抗结核药物的筛选和设计。

结核分枝杆菌蛋白质组芯片能够在一次实验中同时检测目标分子/样本与几乎所有结核分枝杆菌蛋白的相互作用。其高通量的特性有利于大规模的相互作用网络的构建及目标蛋白的筛选。当然, 蛋白质组芯片仍然存在一些不足。蛋白质组芯片检测到的信号是分子的体外相互作用结果, 考虑到生物体内环境的复杂性和多样性, 因而不

可避免会出现假阳性结果, 仍需通过体外、体内的系列常规实验来进行进一步的验证。这也是当前其它体外筛选研究手段所普遍存在的问题。

综上所述, 利用结核分枝杆菌蛋白质组芯片可从系统层次促进结核分枝杆菌基础生物学研究, 考虑到结核分枝杆菌高毒力、复制周期长和需要在生物安全三级实验室中开展研究等特点, 该工具将为结核病相关研究人员提供一个强有力的武器, 帮助研究人员从基础研究入手, 发现新机制, 确定新靶标, 开发新药物。

REFERENCES

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2018[R]. Geneva: WHO, 2018
- [2] Horsburgh CR Jr, Barry III CE, Lange C. Treatment of tuberculosis[J]. *New England Journal of Medicine*, 2015, 373(22): 2149-2160
- [3] Galagan JE, Minch K, Peterson M, et al. The *Mycobacterium tuberculosis* regulatory network and hypoxia[J]. *Nature*, 2013, 499(7457): 178-183

- [4] Zhu H, Bilgin M, Bangham R, et al. Global analysis of protein activities using proteome chips[J]. *Science*, 2001, 293(5537): 2101-2105
- [5] Chen CS, Korobkova E, Chen H, et al. A proteome chip approach reveals new DNA damage recognition activities in *Escherichia coli*[J]. *Nature Methods*, 2008, 5(1): 69-74
- [6] Chen Y, Yang LN, Cheng L, et al. Bcl2-associated athanogene 3 interactome analysis reveals a new role in modulating proteasome activity[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2013, 12(10): 2804-2819
- [7] Lin YY, Lu JY, Zhang JM, et al. Protein acetylation microarray reveals that NuA4 controls key metabolic target regulating gluconeogenesis[J]. *Cell*, 2009, 136(6): 1073-1084
- [8] Huang J, Zhu H, Haggarty SJ, et al. Finding new components of the target of rapamycin (TOR) signaling network through chemical genetics and proteome chips[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(47): 16594-16599
- [9] Gnjatic S, Ritter E, Büchler MW, et al. Seromic profiling of ovarian and pancreatic cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(11): 5088-5093
- [10] Yang LN, Guo SJ, Li Y, et al. Protein microarrays for systems biology[J]. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 2011, 43(3): 161-171
- [11] Deng JY, Bi LJ, Zhou L, et al. *Mycobacterium tuberculosis* proteome microarray for global studies of protein function and immunogenicity[J]. *Cell Reports*, 2014, 9(6): 2317-2329
- [12] Pieters J, Gatfield J. Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages[J]. *Trends in Microbiology*, 2002, 10(3): 142-146
- [13] Cambier CJ, Falkow S, Ramakrishnan L. Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Cell*, 2014, 159(7): 1497-1509
- [14] Kim KH, An DR, Song JS, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Eis protein initiates suppression of host immune responses by acetylation of DUSP16/MKP-7[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(20): 7729-7734
- [15] Wang J, Li BX, Ge PP, et al. *Mycobacterium tuberculosis* suppresses innate immunity by coopting the host ubiquitin system[J]. *Nature Immunology*, 2015, 16(3): 237-245
- [16] Chai QY, Zhang Y, Liu CH. *Mycobacterium tuberculosis*: an adaptable pathogen associated with multiple human diseases[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2018, 8: 158
- [17] Wong D, Bach H, Sun J, et al. *Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H⁺-ATPase to inhibit phagosome acidification[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(48): 19371-19376
- [18] Vergne I, Chua J, Lee HH, et al. Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(11): 4033-4038
- [19] Sreejit G, Ahmed A, Parveen N, et al. The ESAT-6 protein of *Mycobacterium tuberculosis* interacts with Beta-2-microglobulin (β2M) affecting antigen presentation function of macrophage[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(10): e1004446
- [20] Mueller-Ortiz SL, Wanger AR, Norris SJ. Mycobacterial protein HbhA binds human complement component C3[J]. *Infection and Immunity*, 2001, 69(12): 7501-7511
- [21] Mehra A, Zahra A, Thompson V, et al. *Mycobacterium tuberculosis* type VII secreted effector EsxH targets host ESCRT to impair trafficking[J]. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(10): e1003734
- [22] Rajagopala SV, Sikorski P, Kumar A, et al. The binary protein-protein interaction landscape of *Escherichia coli*[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(3): 285-290
- [23] Dziadek B, Brzostek A, Grzybowski M, et al. *Mycobacterium tuberculosis* AtsG (Rv0296c), GlmU (Rv1018c) and SahH (Rv3248c) proteins function as the human IL-8-binding effectors and contribute to pathogen entry into human neutrophils[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148030
- [24] Mendez-Rios J, Uetz P. Global approaches to study protein-protein interactions among viruses and hosts[J]. *Future Microbiology*, 2010, 5(2): 289-301
- [25] Yu HY, Braun P, Yildirim MA, et al. High-quality binary protein interaction map of the yeast interactome network[J]. *Science*, 2008, 322(5898): 104-110
- [26] Wang J, Teng JLL, Zhao DD, et al. The ubiquitin ligase TRIM27 functions as a host restriction factor antagonized by *Mycobacterium tuberculosis* PtpA during mycobacterial infection[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34827
- [27] Målen H, Berven FS, Fladmark KE, et al. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv[J]. *Proteomics*, 2007, 7(10): 1702-1718
- [28] He X, Jiang HW, Chen H, et al. Systematic identification of *Mycobacterium tuberculosis* effectors reveals that BfrB suppresses innate immunity[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017, 16(12): 2243-2253
- [29] Pandey R, Rodriguez GM. A ferritin mutant of *Mycobacterium tuberculosis* is highly susceptible to killing by antibiotics and is unable to establish a chronic infection in mice[J]. *Infection and Immunity*, 2012, 80(10): 3650-3659
- [30] Reddy PV, Puri RV, Khera A, et al. Iron storage proteins are essential for the survival and pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* in THP-1 macrophages and the guinea pig model of infection[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(3): 567-575
- [31] Wan FY, Anderson DE, Barnitz RA, et al. Ribosomal protein S3: a KH domain subunit in NF-κB complexes that mediates selective gene regulation[J]. *Cell*, 2007, 131(5): 927-939
- [32] Newman RH, Hu JF, Rho HS, et al. Construction of human activity-based phosphorylation networks[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9: 655
- [33] Prsic S, Dankwa S, Schwartz D, et al. Extensive phosphorylation with overlapping specificity by *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinases[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(16): 7521-7526
- [34] Dworkin J. Ser/Thr phosphorylation as a regulatory mechanism in bacteria[J]. *Current Opinion in Microbiology*, 2015, 24: 47-52
- [35] Ortega C, Liao RL, Anderson LN, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Ser/Thr protein kinase B mediates an oxygen-dependent replication switch[J]. *PLoS Biology*, 2014, 12(1): e1001746

- [36] Khan S, Nagarajan SN, Parikh A, et al. Phosphorylation of enoyl-acyl carrier protein reductase InhA impacts mycobacterial growth and survival[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(48): 37860-37871
- [37] Jani C, Eoh H, Lee JJ, et al. Regulation of polar peptidoglycan biosynthesis by Wag31 phosphorylation in mycobacteria[J]. *BMC Microbiology*, 2010, 10: 327
- [38] Wolff KA, de la Peña AH, Nguyen HT, et al. A redox regulatory system critical for mycobacterial survival in macrophages and biofilm development[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(4): e1004839
- [39] Wu FL, Liu Y, Jiang HW, et al. The Ser/Thr protein kinase protein-protein interaction map of *M. tuberculosis*[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017, 16(8): 1491-1506
- [40] Walburger A, Koul A, Ferrari G, et al. Protein kinase G from pathogenic mycobacteria promotes survival within macrophages[J]. *Science*, 2004, 304(5678): 1800-1804
- [41] Scherr N, Honnappa S, Kunz G, et al. Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a virulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(29): 12151-12156
- [42] Griffin JE, Gawronski JD, Dejesus MA, et al. High-resolution phenotypic profiling defines genes essential for mycobacterial growth and cholesterol catabolism[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(9): e1002251
- [43] Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Tuberculosis*, 2003, 83(1/3): 91-97
- [44] Ross P, Weinhouse H, Aloni Y, et al. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid[J]. *Nature*, 1987, 325(6101): 279-281
- [45] D'Argenio DA, Miller SI. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger[J]. *Microbiology*, 2004, 150(8): 2497-2502
- [46] Jenal U, Malone J. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria[J]. *Annual Review of Genetics*, 2006, 40: 385-407
- [47] Römling U, Gomelsky M, Galperin MY. C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system[J]. *Molecular Microbiology*, 2010, 57(3): 629-639
- [48] Tamayo R, Pratt JT, Camilli A. Roles of cyclic diguanylate in the regulation of bacterial pathogenesis[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 131-148
- [49] Hengge R. Principles of c-di-GMP signalling in bacteria[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 7(4): 263-273
- [50] Zhang HN, Xu ZW, Jiang HW, et al. Cyclic di-GMP regulates *Mycobacterium tuberculosis* resistance to ethionamide[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5860
- [51] Dover LG, Corsino PE, Daniels IR, et al. Crystal structure of the TetR/CamR family repressor *Mycobacterium tuberculosis* EthR implicated in ethionamide resistance[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2004, 340(5): 1095-1105
- [52] Mahboub, Bassam. Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management || First- and Second-Line Drugs and Drug Resistance [J]. 2013, 10.5772/56396(Chapter 10): 163-180
- [53] Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2013, 12(5): 388-404
- [54] Mdluli K, Kaneko T, Upton A. The tuberculosis drug discovery and development pipeline and emerging drug targets[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, 5(6): a021154
- [55] Pearce MJ, Mintseris J, Ferreyra J, et al. Ubiquitin-like protein involved in the proteasome pathway of *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Science*, 2008, 322(5904): 1104-1107
- [56] Striebel F, Imkamp F, Sutter M, et al. Bacterial ubiquitin-like modifier Pup is deamidated and conjugated to substrates by distinct but homologous enzymes[J]. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(6): 647-651
- [57] Pearce MJ, Arora P, Festa RA, et al. Identification of substrates of the *Mycobacterium tuberculosis* proteasome[J]. *The EMBO Journal*, 2014, 25(22): 5423-5432
- [58] Sutter M, Damberger FF, Imkamp F, et al. Prokaryotic ubiquitin-like protein (Pup) is coupled to substrates via the side chain of its C-terminal glutamate[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(16): 5610-5612
- [59] Guth E, Thommen M, Weber-Ban E. Mycobacterial ubiquitin-like protein ligase PafA follows a two-step reaction pathway with a phosphorylated pup intermediate[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(6): 4412-4419
- [60] Festa RA, Pearce MJ, Darwin KH. Characterization of the proteasome accessory factor (*paf*) operon in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(8): 3044-3050
- [61] Burns KE, Liu WT, Boshoff HIM, et al. Proteasomal protein degradation in mycobacteria is dependent upon a prokaryotic ubiquitin-like protein[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(5): 3069-3075
- [62] Bode NJ, Darwin KH. The pup-proteasome system of mycobacteria[J]. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(5): 1-14
- [63] Jiang HW, Czajkowsky DM, Wang T, et al. Identification of serine 119 as an effective inhibitor binding site of *M. tuberculosis* ubiquitin-like protein ligase PafA using purified proteins and *M. smegmatis*[J]. *EBioMedicine*, 2018, 30: 225-236
- [64] Scorpio A, Zhang Y. Mutations in *pncA*, a gene encoding pyrazinamidase/nicotinamidase, cause resistance to the antituberculous drug pyrazinamide in tubercle bacillus[J]. *Nature Medicine*, 1996, 2(6): 662-667
- [65] Hartkoorn RC, Uplekar S, Cole S T. Cross-resistance between clofazimine and bedaquiline through upregulation of MmpL5 in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(5): 2979-2981
- [66] Zhang YM, Zhang J, Cui P, et al. Identification of novel efflux proteins Rv0191, Rv3756c, Rv3008, and Rv1667c involved in pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2017, 61(8): e00940-17