

# 结核分枝杆菌耐氟喹诺酮类药物的分子机制研究进展

张玉娇, 李晓静, 米凯霞

中国科学院微生物研究所, 病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

**摘要:** 结核病是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)通过空气传播引起人类感染的慢性传染病, 耐药结核分枝杆菌的流行是目前结核病防治的世界难题。氟喹诺酮类药物是人工合成药物, 应用于耐药结核的临床治疗中, 在治疗中起着核心的作用。但近年来, 氟喹诺酮类药物的抗性菌株不断出现, 愈发增加了结核病治疗的困难与治疗失败风险。在临床中氟喹诺酮药物的靶点比较清楚, 是结核分枝杆菌的 DNA 旋转酶。目前发现结核分枝杆菌耐氟喹诺酮类药物的机制主要包括药物靶点 DNA 旋转酶的关键氨基酸改变、药物外排泵系统、细菌细胞壁厚度的增加以及喹诺酮抗性蛋白 MfpA 介导的 DNA 旋转酶活性调控。其中在氟喹诺酮靶标 DNA 旋转酶功能活性改变的耐药机制方面, 编码 DNA 旋转酶基因突变一直是研究的热点, 但近年来发现 DNA 旋转酶的调控蛋白 MfpA 以及 DNA 旋转酶的修饰在细菌耐药性中起着重要的作用, 相关机制还亟待发现。本文综述了当前结核分枝杆菌耐氟喹诺酮类药物的作用机制, 旨在为研发精准诊断技术和药物发掘提供科学理论基础和参考。

**关键词:** 结核分枝杆菌; 氟喹诺酮; 耐药; DNA 旋转酶

## Mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*

Yujiao Zhang, Xiaojing Li, Kaixia Mi

CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

**Abstract:** Tuberculosis, caused by the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*, is one of the world's deadliest bacterial infectious disease. It is still a global-health threat, particularly because of the drug-resistant forms. Fluoroquinolones, with target of gyrase, are among the drugs used to treat tuberculosis. However, their widespread use has led to bacterial resistance. The molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *mycobacterium tuberculosis* have been reported, such as DNA gyrase mutations, drug efflux pumps system, bacterial cell wall thickness and pen-tapeptide proteins (MfpA) mediated regulation of gyrase. Mutations in gyrase conferring quinolone resistance play important roles and have been extensively studied. Recent studies have shown that the regulation of DNA gyrase affects mycobacterial drug resistance, but the mechanisms, especially by post-translational modification and regulatory

收稿日期: 2016-04-19; 修回日期: 2016-07-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31270178, 31670137)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31270178, 31670137)]

作者简介: 张玉娇, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学专业。E-mail: 491274407@qq.com

通讯作者: 米凯霞, 博士, 副研究员, 研究方向: 结核分枝杆菌耐药机制。E-mail: mik@im.ac.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.16-136

网络出版时间: 2016/8/15 14:24:00

URI: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160815.1424.002.html>

proteins, are poorly understood. In this review, we summarize the fluoroquinolone drug development, and the molecular genetics of fluoroquinolone resistance in mycobacteria. Comprehensive understanding of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis* will open a new view on understanding drug resistance in mycobacteria and lead to novel strategies to develop new accurate diagnosis methods.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*; fluoroquinolone; drug-resistance; DNA gyrase

结核病(Tuberculosis, TB)是由病原菌结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)引起的慢性传染性疾病。目前仍是全球人类所面临的重大健康威胁。据世界卫生组织调查,全球有超过 20 亿人携带有结核分枝杆菌,约占世界总人口的 1/3<sup>[1]</sup>,是新发病例的巨大储藏库。在临床上,常规治疗是包括异烟肼、利福平、吡嗪酰胺和乙胺丁醇一线药物的鸡尾酒化学疗法,治疗需持续 6~9 个月。当结核病患者感染的结核分枝杆菌对异烟肼和利福平一线药物产生耐药,则被定义为耐多药结核(Multidrug-resistant MDR-TB)。如果除对两种一线抗结核药物异烟肼和利福平外,还对任何氟喹诺酮抗生素产生耐药,以及抗结核注射药物中的至少一种耐药,则被定义为广泛耐多药结核(Extensively drug-resistant XDR-TB)<sup>[2]</sup>。2014 年全球有 960 万人感染活动性结核,其中有 150 万人死亡,其死亡率高达 15.6%,成为单一感染死亡率最高的传染病之一。而造成这一严重疫情重要原因则是多耐药菌株和广泛耐药菌株的出现和不断增多<sup>[3]</sup>。新近的统计数据显示,有 10%左右的病例至少对一种药物有抗性,1%病例是多耐药。相对于敏感型 TB,治疗多药耐药 MDR-TB 和广泛耐药 XDR-TB 的花费则要高达 25 倍之多<sup>[4]</sup>,并且其药物的用量也高达 3 倍以上。例如,2011 年南非国家仅占结核病例 2%的多耐药 TB,其花费则超过了国家结核病治疗总预算的 30%。此外,据估计被确诊的多耐药 TB 只有大约 20%,不当的治疗方案降低了治愈率和增加了死亡率,同时为耐药菌株的传播提供了更大的机会和空间。耐药菌株肆虐的现状突显长期对结核分枝杆菌的基础研究忽略的恶果,同时也让人们认识到对于细菌耐药机制的形成不清楚、缺乏高相关的耐药指标及相应的高效精准的检测技术、在治疗中也匮乏药物的选择,以及在研发新的药物时也缺乏筛选药物的模型和筛选药靶等系统的理论。尤其是目前诊断、治疗和预防用疫苗沿用的

仍是 50 年甚至 100 年前的方法,所以深入研究结核分枝杆菌的耐药机理,促进对结核分枝杆菌多耐药菌株及泛耐药菌株的精准诊断和制定相应的治疗方案已迫在眉睫。

氟喹诺酮(Fluoroquinolone)是全球广泛应用的处方抗生素,应用于呼吸道、尿道感染,在 40 年前作为新的抗生素引入到结核治疗方案。氟喹诺酮类药物是耐药结核治疗的中流砥柱,此类药物因此也被尝试是否可以作为一线抗 TB 药物,与最近新的药物 PA-824、TMC207 联用<sup>[5~8]</sup>,以降低结核病治疗的时间。抗氟喹诺酮结核分枝杆菌的出现与耐多药结核治疗失败的风险和患者死亡几率具有高相关<sup>[9,10]</sup>。因此,研究结核分枝杆菌的耐药产生机制能够为设计改造氟喹诺酮药物的衍生物提供理论基础,也能为发展快速检测氟喹诺酮抗药菌提供科学指导。

本文在介绍目前结核应用的氟喹诺酮药物的基础上,对其与靶点的相互作用、作用方式、靶点突变引起的抗药,以及其他可能的氟喹诺酮耐药的作用机制进展综述,旨在为耐多药结核的治疗以及药物的研发提供科学依据和指导。

## 1 氟喹诺酮类药物与结核治疗

### 1.1 氟喹诺酮类药物

1962 年,世界上第一个喹诺酮药物萘啶酸(Nalidixic acid)被合成<sup>[11]</sup>,在 1967 年被引入治疗革兰氏阴性菌引起的尿道感染。萘啶酸是 60 年代 George Lesher 与合作者在生产 Chloroquine 时获得的副产品<sup>[12]</sup>,其结构包括 4-oxo-1,4-dihydroquinolone 环状结构,在 3 位链是 Carboxylic acid。之后发现在 6 位增加 Fluorine 基团大大增加了抗菌活性,例如环丙沙星(Ciprofloxacin)、恩氟沙星(Enrofloxacin)、氧氟沙星(Ofloxacin)、诺氟沙星(Norfloxacin)、左氧氟沙星(Levofloxacin)都带有 Fluorine 基团。

20 世纪 90 年代早期 MDR-TB 出现时, 对新抗生素的选择十分有限, 临床医生开始尝试应用环丙沙星。体外实验显示环丙沙星具有抗结核菌能力<sup>[13]</sup>, 但是相应的抗性菌株很快出现。环丙沙星在血清中的浓度约为  $1.5 \mu\text{g/mL}$ , 是结核分枝杆菌 MIC 的 2~3 倍; 在此浓度下产生突变菌株的频率突变高达  $10^6 \sim 10^7$ <sup>[14]</sup>, 且大多数的突变体会形成对其他类氟喹诺酮的交叉抗性, 因此不建议在临床中使用。临床医院一般采用 Ofloxacin 和 Levofloxacin 治疗耐药结核患者, 这两种药物与环丙沙星有相近的最低抑菌浓度 (Minimum inhibitory concentration, MIC), 但是可以避免高突变耐药菌的产生<sup>[15]</sup>。化合物结构研究显示氟喹诺酮在第 8 位形成甲氧基 (Methoxy) 具有更好抗结核活性, 相应改造的莫西沙星被建议应用于治疗耐药结核的方案<sup>[16]</sup>。

目前临床上用于抗结核治疗的氟喹诺酮类药物主要有: 莫西沙星、环丙沙星、左氧氟沙星、氧氟沙星、司帕沙星等。氟喹诺酮类药物具有半衰期长、杀菌活性强等特点<sup>[17]</sup>, 是缩短治疗周期、治疗多耐药结核的理想候选药物。在 20 世纪 90 年代初, 刚开始出现多耐药菌株时, 临床上尝试使用环丙沙星取得了良好的治疗效果<sup>[18]</sup>。但是一个重要的问题是其抗性菌株也迅速产生。广泛耐药菌即被定义为同时耐氟喹诺酮类等多种药物的多重耐药菌。药物的不合理使用或长期使用造成的氟喹诺酮类药物的耐药性已成为亟待解决的问题。因此近年来, 针对结核分枝杆菌与氟喹诺酮类药物的相互作用及耐药机制的问题引起了越来越多人的兴趣, 其相关报道也不断涌现。

## 1.2 氟喹诺酮类药物的作用靶点

氟喹诺酮类药物的作用靶点是 II 型 DNA 拓扑异构酶。众所周知, DNA 具有双螺旋结构, 在基本的生物过程中如复制、转录和重组等, 都涉及解决互补双链 DNA 分离。例如, 在复制过程中, 互补的两条链解开, 然后以每条链为模版合成新的互补链。整个染色体是由数千万的、多环状的 DNA 组成的紧密结构, 在复制时其双链的分离成为一个拓扑结构问题。在几乎所有的涉及 DNA 组成的紧密结构, 包括转录、重组、染色体的压缩以及解压缩, 均会涉

及 DNA 的解环, 都需要解决 DNA 拓扑结构问题。拓扑异构酶则主要负责生物过程中 DNA 拓扑结构的变化。拓扑异构酶根据作用方式分为两类: I 型和 II 型。I 型 DNA 拓扑异构酶引入临时单链断裂, 另一条单链从断裂处穿过此链; II 型 DNA 拓扑异构酶引入临时双链断裂, 另外一条双链穿过断裂的双链。在所有的生物中至少有一个 II 型 DNA 拓扑异构酶和一个 I 型 DNA 拓扑异构酶。在大多数的细菌中含有两类 II 型 DNA 拓扑异构酶 - DNA 旋转酶 (DNA gyrase) 和 II 型拓扑异构酶 (Topoisomerase)。在细菌中 II 型 DNA 拓扑异构酶是氟喹诺酮的基本作用靶点。DNA 旋转酶是唯一的可以引入 DNA 负超螺旋的拓扑异构酶, 在 DNA 复制叉移动时对 DNA 的解开起重要的作用。虽然与 DNA 旋转酶有许多的相似性, II 型 DNA 拓扑异构酶还具有解开连锁的染色体, 确保细菌的快速分裂的功能<sup>[19]</sup>。少数几个菌, 如梅毒螺旋体 (*Treponema pallidum*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 和结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 只有一种 II 型 DNA 拓扑异构酶——DNA 旋转酶。因此, 在这些细菌中, DNA 旋转酶是氟喹诺酮唯一的靶点<sup>[20]</sup>。

II 型 DNA 拓扑异构酶分为 A、B 两个亚家族。

A 亚家族包括细菌的 DNA 旋转酶与拓扑异构酶、真核和病毒的拓扑异构酶<sup>[21]</sup>, 以及在植物的线粒体与叶绿体中的 DNA 旋转酶<sup>[22,23]</sup>。IIB 亚家族包括古细菌旋转酶的拓扑异构酶, 一些原生动物的 II 型 DNA 拓扑异构酶<sup>[21]</sup>。II 型 DNA 拓扑异构酶都是 ATP 依赖的。细菌中的 II 型 DNA 拓扑异构酶、DNA 旋转酶和旋转酶与拓扑异构酶都是由两个亚基构成, 分别是 GyrA 和 GyrB, ParC 和 ParE 构成四聚体复合物 ( $A_2B_2$  或者  $C_2E_2$ )。A 型拓扑异构酶 B 亚基由 N 端的 ATPase 结构域和 TOPRIM 结构域组成, A 亚基由 Breakage-reunion 结构域和 C 端结构域 (CTD) 结构域组成。

蛋白结构解析在拓扑异构酶的研究中起着重要的作用。到目前为止, A 型拓扑异构酶的各个亚基都获得了较高分辨率的解析结构, 为深入了解其催化机制奠定了科学基础。关于 A 型拓扑异构酶的催化机理 James C. Wang 在综述中已有详细的描述<sup>[24]</sup>。简单概述其催化的分子模型——双门控制机制 (图 1)<sup>[25]</sup>:

酶分子首先在 G 门处结合 G-片段, ATP 的结合使 ATPase 结构域发生二聚化, 入口门关闭, T-片段被捕获到蛋白钳子中。一个 ATP 分子发生水解, 这时 G-片段被切割, ATP 水解产物无机磷酸的释放伴随着 T-片段从打开的 G 门处穿过, 另外一个 ATP 分子还没发生水解, 阻止入口门的打开与 T-片段的倒回。切割的 G-片段连接, 出口门打开, 使 T-片段从酶分子中释放出来, 剩下的一个 ATP 分子发生水解, 水解产物的释放促使入口门打开, 酶分子重新设定, 以进行下一轮的穿链。

## 2 结核分枝杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药机制

### 2.1 氟喹诺酮类药物靶点的关键基因位点突变

氟喹诺酮类药物的作用靶点是细菌 II 型拓扑异构酶 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV, 活性的氟喹诺酮类药物则通过与 B 亚基的 Toprim 结构域和 A 亚

基的 N 端断裂再连接结构域结合, 嵌入到断裂的 DNA 链, 形成 DNA 旋转酶-DNA-氟喹诺酮类药物三元复合物<sup>[26]</sup>, 破坏 DNA 旋转酶的催化活性中心, 阻碍 DNA 的复制, 导致细菌的生长停滞; 另外缺少了活性再连接结构域, 断裂的双链 DNA 不能重新闭合, 最后导致细菌死亡。

DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV 的单点氨基酸突变引起的氟喹诺酮药物抗性中, 突变热点集中在编码 GyrA 的基因序列, 称为喹诺酮类药物抗性决定区(Quinolone resistance determining region, QRDR)。这个区域是 DNA 旋转酶 A 亚基的 *gyrA* 基因中高度保守的区域, 位于 *gyrA* 的外围<sup>[27]</sup>, 是喹诺酮类药物结合袋的重要组成部分。临床菌株测序的分析显示, 在耐药结核分枝杆菌中, 最常见的突变位点是在 94 位(Asp→Gly), *gyrA* 基因中发生突变频率其他较高的位点是 88 位(Gly→Cys), 90 位(Ala→Val), 91 位(Ser→Pro)<sup>[28,29]</sup>。最近的 GyrA 蛋白晶体结构研究发

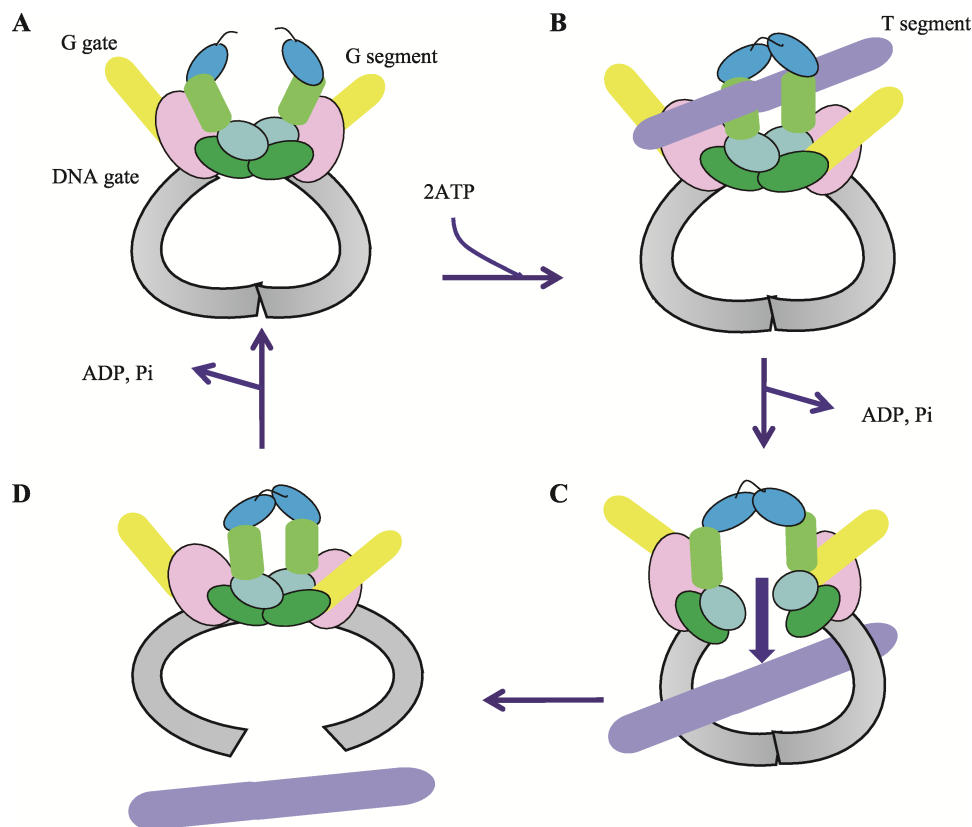


图 1 II A 拓扑异构酶的双门控机制

Fig. 1 The proposed model of the two-gate DNA transfer by type II topoisomerase

A: II A 拓扑异构酶在 G 门(G gate)处与 G-片段(G segment)结合。B: II A 拓扑异构酶与 2 个 ATP 分子结合, 入口门关闭, T-片段(T segment)被捕获到蛋白钳子中。C: 第 1 个 ATP 分子水解, T-片段穿过 G 门。D: 第 2 个 ATP 分子水解, T-片段释放, 入口门重新打开。



现突变的临床菌株在 90 位和 94 位的突变位点是通过打断药物与 DNA 旋转酶相互作用,降低与药物的亲和力<sup>[30]</sup>。目前唯一的商业耐药检测试剂是 Probe assay MTBDRsl<sup>[31]</sup>,其检测的突变位点包括 A90V、S91P、D94A、D94N/Y、D94G 和 D94H。通过体外筛选系统证明 *GyrB* 的氨基酸突变可以产生细菌的对氟喹诺酮抗性<sup>[32]</sup>。但是在临床中一直未检测到 *gyrB* 突变引起的抗氟喹诺酮的临床菌株。Takkiff 等<sup>[27]</sup>和 Guillemin 等<sup>[33]</sup>利用耐药测定、基因序列分析以及序列同源比对的策略分析,获得的结论是喹诺酮类药物的耐药仅和 *gyrA* 基因的突变相关。但是,随着氟喹诺酮类药物的广泛使用,临床抗喹诺酮药物菌株的大量收集,在临床菌株中越来越多的 *gyrB* 基因的位点突变被报道<sup>[34]</sup>。*gyrB* 基因突变多发生在第 500、538、539 和 540 位<sup>[35,36]</sup>,与 *gyrA* 相比,*gyrB* 基因的突变率相对较低,而且一般只与低水平的耐药性的发生相关,高水平的耐药性主要是通过 *gyrA* 基因的位点突变产生的。在结核分枝杆菌喹诺酮临床耐药菌株中,*gyrA* 的突变率检出率在 50%~100%,*gyrB* 的基因突变率检出率在 2%~20%<sup>[37,38]</sup>,这些数据也显示结核分枝杆菌氟喹诺酮类药物的抗药性的产生主要是由于 *gyrA* 的突变所导致。目前,对于 *gyrB* 突变产生对喹诺酮耐药性的作用机制尚不清楚,推测其突变位点的氨基酸可能是喹诺酮类药物与 DNA 旋转酶的结合及稳定的关键位点,但还需要进一步研究和证实。

## 2.2 药物外排泵与氟喹诺酮类药物的抗药性

临床数据报道显示大部分的抗氟喹诺酮临床菌株具有 QRDRs 区域突变的位点,0~50%的临床菌株中未在 *gyrA* 和 *gyrB* 中发现基因突变位点<sup>[8]</sup>。这些数据表示还有其他耐药机制的存在。

大部分细菌都具有针对不同类型药物的外排泵<sup>[39]</sup>。细菌通过特异的外排泵将相应的药物排出体外,降低胞内药物的浓度,避免或减轻药物对于自身的伤害,这是细菌耐药性产生的重要机制之一<sup>[10,40,41]</sup>。一般来说,外排泵都不是组成型、高水平的表达,而是诱导表达,因此药物的处理浓度以及时间等条件影响外排泵的表达水平。外排泵的表达水平会影响细菌的耐药性,在启动子上发生点突变影响外排

泵的表达,例如,在 *inhA* 的启动子上发生点突变,提高了异烟肼靶点蛋白的表达,产生异烟肼抗药菌<sup>[42]</sup>。目前逐渐接受的观点是细菌发展成为抗药菌的第一步是先诱导表达外排泵使细菌能对药物产生相对耐受存活下来,然后再发生在基因水平的突变,产生高抗药细菌。

反向运输子(Antiporter) LfrA 是结核分枝杆菌中第一个鉴定的喹诺酮类药物外排泵<sup>[43]</sup>,它的表达使细菌产生低水平的耐药:LfrA 可以使细菌对环丙沙星和左氧氟沙星的最小抑菌浓度增加 4 倍以上,但是对司帕沙星和莫西沙星的药物敏感性未发生改变。目前研究显示,在耻垢分枝菌(*Mycobacterium smegmatis*)存在 4 种类型的外排泵,增加细菌的低度抗氟喹诺酮抗性<sup>[44]</sup>。Rv1634 属于转运蛋白超家族(Major facilitator family),其在耻垢分枝杆菌中表达可以增加环丙沙星、诺氟沙星以及氧氟沙星的 MIC 2~4 倍;另外 3 种外排泵属于不同的 ATP 酶<sup>[45]</sup>。研究发现 ABC 转运蛋白复合体 Rv2686c-Rv2627c-Rv2688c 在耻垢分枝杆菌表达时,环丙沙星的 MIC 增加了 8 倍,诺氟沙星、司帕沙星和莫西沙星的 MIC 分别增加了 2 倍,对左氧氟沙星及氧氟沙星的敏感性没有改变<sup>[46]</sup>。在结核分枝杆菌中表达结核分枝杆菌的 DrrAB ATPase 增加了诺氟沙星的 MIC 4 倍,用 ATPase 抑制剂 verapamil 可以抑制抗性的增加<sup>[46]</sup>。耻垢分枝杆菌的磷酸盐特异转运蛋白 PST 是 ABC 外运泵也参与抗诺氟沙星<sup>[47]</sup>。抗药相关转运蛋白的性质和作用机制不同,对于结核分枝杆菌喹诺酮抗性作用机制还需要进行系统的研究和分析。

## 2.3 细菌细胞壁与氟喹诺酮类药物的抗药性

细胞壁是细菌第一道重要的保护屏障。任何种类抗生素发挥杀菌作用首先需要通过细胞壁进入细胞内。结核分枝杆菌具有独特的细胞壁结构,细胞壁的脂类含量高。实验研究发现缺乏孔蛋白 MspA 和 Msp4 增加了莫西沙星、西他沙星、左氧氟沙星和氧氟沙星的 MIC 2~4 倍。可能是由于孔蛋白在亲水性氟喹诺酮进入细菌中起着重要的作用。而疏水性氟喹诺酮如莫西沙星是否能够直接渗透细胞膜进入细胞还有待确证。有报道结核分枝杆菌有外膜蛋白形成的孔道<sup>[48]</sup>,但其蛋白性质还有待进

一步鉴定。细菌细胞壁的厚度的增加、通透性的降低,均可以从一定程度上减少氟喹诺酮类药物的渗透,表现耐药性<sup>[49]</sup>。由于细胞壁性质改变产生的耐药都是低水平的耐药,在喹诺酮的耐药中可能并不是主要的作用。

#### 2.4 DNA 旋转酶蛋白水平调控与氟喹诺酮类药物抗性

结核分枝杆菌在胁迫条件下可以进入潜伏状态,与之相应的结核分枝杆菌的 DNA 旋转酶需要行使不同的酶活来反应调控 DNA 拓扑结构(如超螺旋,解链和松弛)从而适应不同的生理状态;提示 DNA 旋转酶的活性被严格的调控。在不同的生理或胁迫调节下, DNA 旋转酶携带不同的修饰,与不同的蛋白相互作用,行使不同的酶活反应。最近研究显示,与 DNA 旋转酶相互作用并能调控其活性的蛋白,能够影响细菌的耐药性<sup>[50]</sup>。但是目前关于结核分枝杆菌 DNA 旋转酶相互作用的蛋白只有零星的相关报道。例如,谷氨酸消旋酶(Glutamate racemase)通过影响与 DNA 的结合抑制酶活性<sup>[51]</sup>;将结核分枝杆菌的基因组文库转入耻垢分枝杆菌,带有编码氟喹诺酮抗性蛋白 MfpA(*Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein A*)的质粒可以促进细菌对氟喹诺酮类药物的抗性<sup>[52]</sup>。蛋白晶体结构研究显示, MfpA 模拟 DNA 结构,可能直接与旋转酶相互作用从而阻断氟喹诺酮的结合(图 2)<sup>[53]</sup>。MfpA 广泛存在于分枝杆菌属细菌基因组,包括致病菌和非致病菌,与氟喹诺酮的抗性相关。与前面介绍的药物靶点突变、药物外排泵以及细菌细胞壁的改变等耐氟喹诺酮类药物的作用机制不同的是, MfpA 对分枝杆菌氟喹诺酮类药物的抗性调控是分枝杆菌本身固有的,而非在药物胁迫条件下筛选获得的;而前者主要是药物治疗过程中,在药物胁迫条件下而导致的基因编码的突变。MfpA 与质粒上的 Qnr(Quinolone resistance gene)所编码的蛋白均属于五肽重复序列蛋白家族(Pentapeptide protein family)。喹诺酮抗性基因 Qnr,在自然界的环境细菌和临床中病原菌中广泛存在。大多数 Qnr 由质粒编码,通过质粒的转移作用可以在细菌间传递喹诺酮类药物的抗性。一些 Qnr 由染色体编码,至少发现有 92 种细菌的基因组中有 Qnr

基因<sup>[54]</sup>,特别是在许多重要的病原菌中都有发现,例如单细胞增多性李斯特菌(*Listeria monocytogenes*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)以及梭状芽孢杆菌(*Clostridium*)(表 1)。由于氟喹诺酮是人工合成的药物, Qnr 是氟喹诺酮药物出现之前已经在自然界中存在,从理论上讲其属于细菌本身的功能性基因,到目前为止其具体的生理功能还不是很清楚。由于 Qnr 和 MfpA 是通过与 DNA 旋转酶互作影响其活性<sup>[53,55]</sup>,进而影响喹诺酮类药物的杀菌活性的,推断其生物功能与调控 DNA 旋转酶相关。Qnr 所提供的 DNA 旋转酶的保护,缓解喹诺酮类药物对 DNA 旋转酶的毒性,使细菌能够耐受氟喹诺酮药物,进而通过基因突变获得高耐药菌株。MfpA 与 Qnr 虽然也是通过调节 DNA 旋转酶的活性影响喹诺酮类药物的抗性的,但是其调节机制不同。Qnr 独自可以保护 DNA 旋转酶免受药物的损伤;然而, MfpA 独自不能保护 DNA 旋转酶免受药物的损伤<sup>[56]</sup>,需要其他因子的协助。进一步研究发现了与 MfpA 互作的蛋白,被命名为 MfpB。MfpB 是一个小 GTP 酶,其编码基因与 MfpA 编码基因位于同一个操纵子, MfpB 以 GTP 结合的形式与 MfpA 直接互作。体内和体外实验表明, MfpB 通过抑制 MfpA 活性来调控 DNA 旋转酶的活性和保护 DNA 旋转酶免受氟喹诺酮的影响(图 3)<sup>[50]</sup>。但是 MfpB 和 MfpA 相互作用的机制以及调控 DNA 旋转酶活性的具体分子机制目前还不清楚,需要进一步通过结构解析以及生化实验进行研究。

在真核生物中,拓扑异构酶在翻译后发生各种形式的蛋白修饰,这些蛋白修饰改变拓扑异构酶在细胞中的定位和细胞周期中各时期的酶活性<sup>[57,58]</sup>。目前,对于原核异构酶的修饰研究报道很少。最近的研究显示,毒素抗毒素(Toxin-antitoxin, TA)蛋白在细菌扩增中起重要的作用,毒素蛋白 cA44 诱导的丝状蛋白(Filamentation induced by cAMP, FIC)介导将 AMP 共价转移到 II 型拓扑异构酶,从而抑制酶的活性<sup>[59]</sup>。FIC 蛋白是 TA 系统中的毒素蛋白,该研究认为 TA 系统可能调控耐药的持留子(persister)形成,即 FIC 蛋白介导的腺苷酰化 DNA 拓扑异构酶,形成耐药持留子,对于这个假设还需要相关实验的验证。但是,相关修饰在结核分枝杆菌中还未见报道。

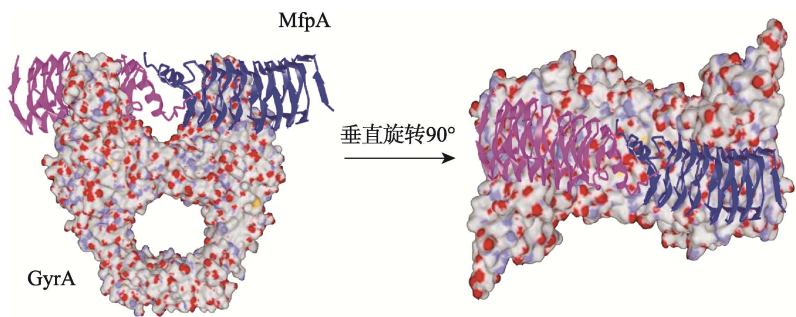


图 2 MfpA 模拟 DNA 结构与 DNA 旋转酶相互作用  
Fig. 2 Molecular Model of MfpA, a DNA mimic protein, bound to GyrA of DNA gyrase  
根据参考文献[53]修改绘制。

表 1 MfpA 和 Qnr 蛋白种类和分布  
Table 1 Species and distribution and the Qnr and MfpA protein

蛋白名称	亚类	细菌名称
Qnr	QnrA	海藻希瓦菌( <i>Shewanella algae</i> )、鱼肠道弧菌( <i>Vibrio ichthyoenteri</i> )等
	QnrB	肺炎克雷伯菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )、粘质沙雷氏菌( <i>Serratia marcescens</i> )等
	QnrC	霍乱弧菌( <i>Vibrio cholerae</i> )等
	QnrD	产碱普罗威登斯菌( <i>Providencia alcalifaciens</i> )等
	QnrS	光伏希瓦氏菌( <i>Shewanella loihica</i> )、鳃发光杆菌( <i>Photobacterium leiognathi</i> )等
MfpA		结核分枝杆菌( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )、鸟型结核分枝杆菌( <i>Mycobacterium avium</i> )、海鱼分枝杆菌( <i>Mycobacterium marinum</i> )、包皮垢分枝杆菌( <i>Mycobacterium smegmatis</i> )等

注：表格内容根据文献[54]整理。

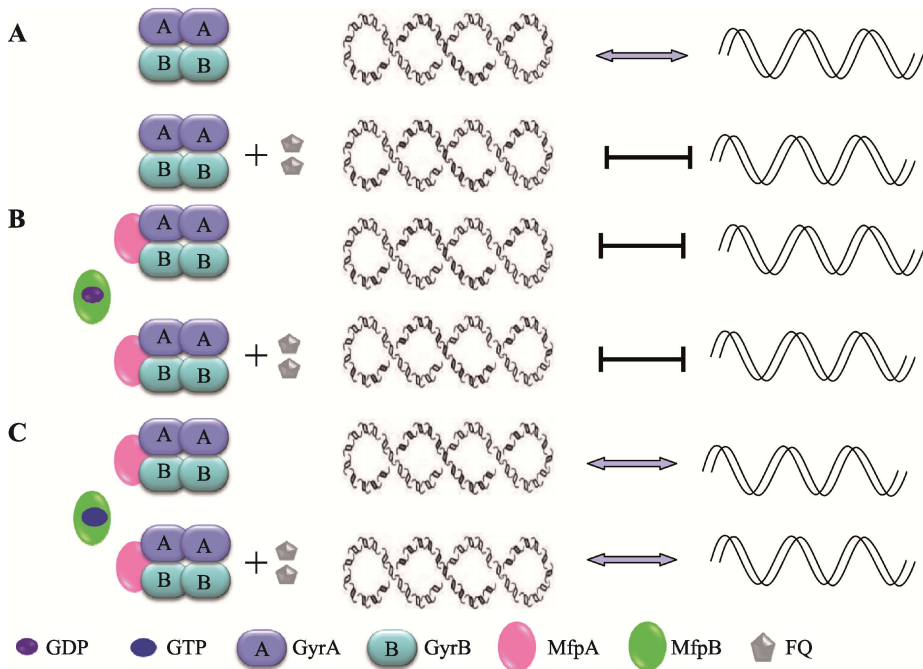


图 3 MfpB 作为小 GTP 酶，与 MfpA 互作调节 DNA 旋转酶活性  
Fig. 3 Cooperative action of MfpB, a small GTPase, and MfpA regulates DNA gyrase  
A：氟喹诺酮抑制 DNA 旋转酶活性；B：无 GTP 的条件下，MfpB 蛋白不能调节 DNA 旋转酶活性；C：MfpB 分解 GTP 与 MfpA 共同作用保护 DNA 旋转酶活性。



### 3 结语与展望

深入理解和解析结核分枝杆菌耐药形成机制和耐药机制是结核病防治的基石。氟喹诺酮类药物作为治疗多耐药结核的中流砥柱,目前在临床上也在尝试是否可以作为一线药物,缩短 TB 治疗的疗程,氟喹诺酮类药物在长期的一段时间都会被使用。它们的使用会伴随着抗药性的产生,需要发展早期、灵敏、准确的检测技术进行监测。因此,深入了解其相关的耐药机制问题在理论和实践中都具有重大的意义。目前研究显示结核分枝杆菌具有以下 4 种耐药机制途径:DNA 旋转酶特异性位点的突变、药物外排泵系统、增加细菌胞壁的厚度以及相互作用蛋白(如 MfpA/MfpB)保护和调控 DNA 旋转酶。但是在许多领域仍近乎空白,例如目前发现多种 DNA 旋转酶的修饰,包括磷酸化、乙酰化、腺苷酰化修饰,这些修饰与耐药的相关性还没有研究报道。另外,各种耐药机制之间是否有联系,是否存在着彼此之间的先后顺序、相互调控以及如何调控都需要进一步的研究才能证明。解析氟喹诺酮类药物的使用如何产生抗药性,产生何种类型的抗药性等基础问题,将为发展精准诊断技术和发掘新的作用药物靶点提供科学理论基础。

### 参考文献(References):

- [1] Ginsburg AS, Grosset JH, Bishai WR. Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance. *Lancet Infect Dis*, 2003, 3(7): 432–442. [DOI]
- [2] Gandhi NR, Nunn P, Dheda K, Schaaf HS, Zignol M, van Soolingen D, Jensen P, Bayona J. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *Lancet*, 2010, 375(9728): 1830–1843. [DOI]
- [3] Manjelienskaia J, Erck D, Piracha S, Schragar L. Drug-resistant TB: deadly, costly and in need of a vaccine. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 2016, 110(3): 186–191. [DOI]
- [4] Marks SM, Flood J, Seaworth B, Hirsch-Moverman Y, Armstrong L, Mase S, Salcedo K, Oh P, Graviss EA, Colson PW, Armitige L, Revuelta M, Sheeran K. Treatment practices, outcomes, and costs of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis, United States, 2005–2007. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(5): 812–821. [DOI]
- [5] O'Donnell MR, Jarand J, Loveday M, Padayatchi N, Zelnick J, Werner L, Naidoo K, Master I, Osburn G, Kvasnovsky C, Shean K, Pai M, Van der Walt M, Horsburgh CR, Dheda K. High incidence of hospital admissions with multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis among South African health care workers. *Ann Intern Med*, 2010, 153(8): 516–522. [DOI]
- [6] Nuermberger E, Tyagi S, Tasneen R, Williams KN, Almeida D, Rosenthal I, Grosset JH. Powerful bactericidal and sterilizing activity of a regimen containing PA-824, moxifloxacin, and pyrazinamide in a murine model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 52(4): 1522–1524. [DOI]
- [7] Veziris N, Ibrahim M, Lounis N, Andries K, Jarlier V. Sterilizing activity of second-line regimens containing TMC207 in a murine model of tuberculosis. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17556. [DOI]
- [8] Takiff H, Guerrero E. Current prospects for the fluoroquinolones as first-line tuberculosis therapy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(12): 5421–5429. [DOI]
- [9] An DD, Duyen NTH, Lan NTN, Hoa DV, Ha DTM, Kiet VS, Thu DDA, Van Vinh Chau N, Dung NH, Sy DN, Farrar J, Caws M. Beijing genotype of *Mycobacterium tuberculosis* is significantly associated with high-level fluoroquinolone resistance in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53(11): 4835–4839. [DOI]
- [10] Sun ZG, Zhang JY, Zhang XX, Wang SM, Zhang Y, Li CY. Comparison of *gyrA* gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 2008, 31(2): 115–121. [DOI]
- [11] Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1, 8-naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *J Med Chem*, 1962, 5(5): 1063–1065. [DOI]
- [12] Emmerson AM, Jones AM. The quinolones: decades of development and use. *J Antimicrob Chemother*, 2003, 51 (Suppl. 1): 13–20. [DOI]
- [13] Sullivan EA, Palumbo L, Ebrahimzadeh A, Frieden TR, Sullivan EA, Frieden TR, Kreiswirth BN, Kapur V, Musser JM. Emergence of fluoroquinolone-resistant tuberculosis in New York City. *Lancet*, 1995, 345(8958): 1148–1150. [DOI]
- [14] Ängeby KA, Jureen P, Giske CG, Chryssanthou E, Sturegård E, Nordvall M, Johansson AG, Werngren J, Kahlmeter G, Hoffner SE, Schön T. Wild-type MIC distributions of four fluoroquinolones active against *Mycobacterium tuberculosis* in relation to current critical concentrations and available pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(5): 946–952. [DOI]
- [15] Shandil RK, Jayaram R, Kaur P, Gaonkar S, Suresh BL, Mahesh BN, Jayashree R, Nandi V, Bharath S, Balasu-



- bramanian V. Moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and Ciprofloxacin rofloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*: evaluation of in vitro and pharmacodynamic indices that best predict in vivo efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(2): 576–582. [DOI]
- [16] Yadav V, Deopujari K. Gatifloxacin and dysglycemia in older adults. *New Engl J Med*, 2006, 354(25): 2725–2726. [DOI]
- [17] Renau TE, Gage JW, Dever JA, Roland GE, Joannides ET, Shapiro MA, Sanchez JP, Gracheck SJ, Domagala JM, Jacobs MR, Reynolds RC. Structure-activity relationships of quinolone agents against mycobacteria: effect of structural modifications at the 8 position. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(10): 2363–2368. [DOI]
- [18] Mayer C, Takiff H. The molecular genetics of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr*, 2014, 2(4): 2–9. [DOI]
- [19] Espeli O, Levine C, Hassing H, Mariani KJ. Temporal regulation of topoisomerase IV activity in *E. coli*. *Mol Cell*, 2003, 11(1): 189–201. [DOI]
- [20] Mdluli K, Ma ZK. *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase as a target for drug discovery. *Infect Disord Drug Targets*, 2007, 7(2): 159–168. [DOI]
- [21] Forterre P, Gadelle D. Phylogenomics of DNA topoisomerases: their origin and putative roles in the emergence of modern organisms. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(3): 679–692. [DOI]
- [22] Wall MK, Mitchenall LA, Maxwell A. *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(20): 7821–7826. [DOI]
- [23] Cho HS, Lee SS, Kim KD, Hwang I, Lim JS, Park YI, Pai HS. DNA gyrase is involved in chloroplast nucleoid partitioning. *Plant Cell*, 2004, 16(10): 2665–2682. [DOI]
- [24] Wang JC. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart Rev Biophys*, 1998, 31(2): 107–144. [DOI]
- [25] Schoeffler AJ, Berger JM. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quart Rev Biophys*, 2008, 41(1): 41–101. [DOI]
- [26] Hiasa H, Yousef DO, Mariani KJ. DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J Biol Chem*, 1996, 271(42): 26424–26429. [DOI]
- [27] Takiff HE, Salazar L, Guerrero C, Philipp W, Huang WM, Kreiswirth B, Cole ST, Jacobs WR Jr, Telenti A. Cloning and nucleotide sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* genes and detection of quinolone resistance mutations. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(4): 773–780. [DOI]
- [28] Yin XM, Yu ZX. Mutation characterization of *gyrA* and *gyrB* genes in levofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates from Guangdong Province in China. *J Infect*, 2010, 61(2): 150–154. [DOI]
- [29] Lau RW, Ho PL, Kao RY, Yew WW, Lau TCK, Cheng VCC, Yuen KY, Tsui SKW, Chen XC, Yam WC. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional analysis of *gyrA* mutation at position 74. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55(2): 608–614. [DOI]
- [30] Aldred KJ, Blower TR, Kerns RJ, Berger JM, Osheroff N. Fluoroquinolone interactions with *Mycobacterium tuberculosis* gyrase: enhancing drug activity against wild-type and resistant gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113(7): E839–E846. [DOI]
- [31] Feng Y, Liu SJ, Wang QG, Wang L, Tang SW, Wang JM, Lu W. Rapid diagnosis of drug resistance to fluoroquinolones, amikacin, capreomycin, kanamycin and ethambutol using genotype MTBDRsl assay: a meta-analysis. *PLoS One*, 2013, 8(2): e55292. [DOI]
- [32] Kocagöz T, Hackbarth CJ, Unsai I, Rosenberg EY, Nikaido H, Chambers HF. Gyrase mutations in laboratory-selected, fluoroquinolone-resistant mutants of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40(8): 1768–1774. [DOI]
- [33] Guillemain I, Jarlier V, Cambau E. Correlation between quinolone susceptibility patterns and sequences in the A and B subunits of DNA gyrase in mycobacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(8): 2084–2088. [DOI]
- [34] Cui ZL, Wang J, Lu JM, Huang XC, Hu ZY. Association of mutation patterns in *gyrA/B* genes and ofloxacin resistance levels in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East China in 2009. *BMC Infect Dis*, 2011, 11: 78. [DOI]
- [35] Malik S, Willby M, Sikes D, Tsodikov OV, Posey JE. New insights into fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: functional genetic analysis of *gyrA* and *gyrB* mutations. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39754. [DOI]
- [36] Pantel A, Petrella S, Veziris N, Brossier F, Bastian S, Jarlier V, Mayer C, Aubry A. Extending the definition of the GyrB quinolone resistance-determining region in *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase for assessing fluoroquinolone resistance in *M. tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(4): 1990–1996. [DOI]
- [37] Sulochana S, Narayanan S, Paramasivan CN, Suganthi C, Narayanan PR. Analysis of fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from India. *J Chemother*, 2007, 19(2): 166–171. [DOI]
- [38] Cheng AFB, Yew WW, Chan EWC, Chin ML, Hui MMM, Chan RCY. Multiplex PCR amplicon conformation analysis for rapid detection of *gyrA* mutations in fluoroquinolone-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2): 596–601. [DOI]

- [39] Piddock LJ. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 2006, 19(2): 382–402. [DOI]
- [40] Colangeli R, Helb D, Sridharan S, Sun JC, Varma-Basil M, Hazbón MH, Harbacheuski R, Megjugorac NJ, Jacobs WR Jr, Holzenburg A, Sacchettini JC, Alland D. The *Mycobacterium tuberculosis* *iniA* gene is essential for activity of an efflux pump that confers drug tolerance to both isoniazid and ethambutol. *Mol Microbiol*, 2005, 55(6): 1829–1840. [DOI]
- [41] De Rossi E, Aínsa JA, Riccardi G. Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev*, 2006, 30(1): 36–52. [DOI]
- [42] Vilchèze C, Wang F, Arai M, Hazbón MH, Colangeli R, Kremer L, Weisbrod TR, Alland D, Sacchettini JC, Jacobs WR Jr. Transfer of a point mutation in *Mycobacterium tuberculosis* *inhA* resolves the target of isoniazid. *Nat Med*, 2006, 12(9): 1027–1029. [DOI]
- [43] Liu J, Takiff HE, Nikaido H. Active efflux of fluoroquinolones in *Mycobacterium smegmatis* mediated by LfrA, a multidrug efflux pump. *J Bacteriol*, 1996, 178(13): 3791–3795. [DOI]
- [44] De Rossi E, Arrigo P, Bellinzoni M, Silva PA, Martín C, Aínsa JA, Guglierame P, Riccardi G. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Med*, 2002, 8(11): 714–724. [DOI]
- [45] Zhang CY, Feng YX, Li P, Fu SB. Study on the relationship between the resistance to MTX and the transport protein superfamily of ATP-binding cassette that induces multiple drug resistance. *Hereditas (Beijing)*, 2006, 28(10): 1201–1205.  
张春玉, 冯源熙, 李璞, 傅松滨. 介导多药耐药的 ABC 转运蛋白超家族与 MTX 耐药性的关系研究. *遗传*, 2006, 28(10): 1201–1205. [DOI]
- [46] Choudhuri BS, Bhakta S, Barik R, Basu J, Kundu M, Chakrabarti P. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drdA* and *drdB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J*, 2002, 367(Pt 1): 279–285. [DOI]
- [47] Banerjee SK, Bhatt K, Misra P, Chakraborti PK. Involvement of a natural transport system in the process of efflux-mediated drug resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Gen Genet*, 2000, 262(6): 949–956. [DOI]
- [48] Siroy A, Mailaender C, Harder D, Koerber S, Wolschendorf F, Danilchanka O, Wang Y, Heinz C, Niederweis M. Rv1698 of *Mycobacterium tuberculosis* represents a new class of channel-forming outer membrane proteins. *J Biol Chem*, 2008, 283(26): 17827–17837. [DOI]
- [49] Velayati AA, Farnia P, Ibrahim TA, Haroun RZ, Kuan HO, Ghanavi J, Farnia P, Kabarei AN, Tabarsi P, Omar AR, Varahram M, Masjedi MR. Differences in cell wall thickness between resistant and nonresistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*: using transmission electron microscopy. *Chemotherapy*, 2009, 55(5): 303–307. [DOI]
- [50] Tao J, Han J, Wu HY, Hu XL, Deng JY, Fleming J, Maxwell A, Bi LJ, Mi KX. Mycobacterium fluoroquinolone resistance protein B, a novel small GTPase, is involved in the regulation of DNA gyrase and drug resistance. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(4): 2370–2381. [DOI]
- [51] Sengupta S, Shah M, Nagaraja V. Glutamate racemase from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits DNA gyrase by affecting its DNA-binding. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(19): 5567–5576. [DOI]
- [52] Montero C, Mateu G, Rodriguez R, Takiff H. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smegmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(12): 3387–3392. [DOI]
- [53] Hegde SS, Vetting MW, Roderick SL, Mitchenall LA, Maxwell A, Takiff HE, Blanchard JS. A fluoroquinolone resistance protein from *Mycobacterium tuberculosis* that mimics DNA. *Science*, 2005, 308(5727): 1480–1483. [DOI]
- [54] Jacoby GA, Hooper DC. Phylogenetic analysis of chromosomally determined qnr and related proteins. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(4): 1930–1934. [DOI]
- [55] Tran JH, Jacoby GA, Hooper DC. Interaction of the plasmid-encoded quinolone resistance protein Qnr with *Escherichia coli* DNA gyrase. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(1): 118–125. [DOI]
- [56] Mérens A, Matrat S, Aubry A, Lascols C, Jarlier V, Soussy CJ, Cavallo JD, Cambau E. The pentapeptide repeat proteins MfpA<sub>Mt</sub> and QnrB4 exhibit opposite effects on DNA gyrase catalytic reactions and on the ternary gyrase-DNA-quinolone complex. *J Bacteriol*, 2009, 191(5): 1587–1594. [DOI]
- [57] Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science*, 2009, 325(5942): 834–840. [DOI]
- [58] Mao Y, Sun M, Desai SD, Liu LF. SUMO-1 conjugation to topoisomerase I: a possible repair response to topoisomerase-mediated DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(8): 4046–4051. [DOI]
- [59] Harms A, Stanger FV, Scheu PD, De Jong IG, Goepfert A, Glatzer T, Gerdes K, Schirmer T, Dehio C. Adenylation of gyrase and topo IV by FicT toxins disrupts bacterial DNA Topology. *Cell Rep*, 2015, 12(9): 1497–1507. [DOI]