

國立臺灣大學醫學院微生物學研究所



碩士論文

Graduate Institute of Microbiology

College of Medicine

National Taiwan University

Master thesis

探討無莢膜之 M4 血清型 A 型鏈球菌躲避免疫系統的機制

Characterization of the Immune Evasion Mechanisms of the

Nonencapsulated M4 Group A *Streptococcus*

陳逸萱

Yi-Hsuan Chen

指導教授：張永祺 博士

Advisor : Yung-Chi Chang, Ph. D.

中華民國 107 年 7 月

July 2017

國立臺灣大學 (碩) 博士學位論文
口試委員會審定書

中文題目：探討無莢膜之M4血清型A型鏈球菌躲避免疫系統的機制

英文題目：Characterization of the Immune Evasion Mechanisms of
the Nonencapsulated M4 Group A Streptococcus

本論文係陳逸萱君 (學號R05445126) 在國立臺灣大學微生物學
所完成之碩 (博) 士學位論文，於民國107 年 7 月 10 日承下列考
試委員審查通過及口試及格，特此證明


口試委員：

張永祺 (簽名)
(指導教授)

朱清良 賴家綺

系主任、所長 蔡錦華 (簽名)

致謝




終於要畢業了，能夠這麼順利畢業真的是我從來沒想過的事情!雖然大學時期就有做專題研究的經驗，但是當時表現並不理想，也一度想過自己不適合合作研究，因此下定決心要念研究所對我而言是一件艱難的事情。所幸考上了微生物所並加入了 YC lab，現在即將從台大微生物所畢業。這兩年的時間非常感謝張永祺老師，如果不是遇到這麼有耐心又認真教導學生的老師，我想靠自己的努力也無法有這些進步和成果吧!謝謝老師在我慌張無措的時候冷靜地指引我，給予我肯定並鼓勵我要對自己有信心，也很感謝老師在我就算經過大腦思考還是說出蠢話的時候跟我討論實驗，老師的幫忙和鼓勵讓我能夠在實驗、研讀論文、思考和報告上有所進步。另外，也謝謝老師給予的心理諮商，讓我對未來的計畫更周全。

感謝朱清良老師和顧家綺老師擔任我的口試委員，從第一次進度報告開始就給了我很多建議與鼓勵，幫助我思考以及改善報告時的缺失，讓我的研究更加完整。


也要感謝 R1418/R736 大家的幫助，有你們的陪伴讓碩士生活有趣很多。感謝曜誠學長帶著我做實驗以及接受我不經意的白目，感謝紹曄學姐和鈞棋學長雖然常常嗆我但給予我實驗與人生很多的建議而且還在撥穗典禮的時候現身給我們驚喜，感謝昭賢就算被我雷了也還是會繼續幫助我，也感謝佩昀和育彰給我帶來很多實驗以外的歡樂。雖然平常沒有表現出來，但是實驗室是我生活的重心，能夠有你們一起做實驗、聊天舒壓，並且在我實驗不如意的時候鼓勵我，真的很感謝你們!除此之外，也感謝 R1420、微生物所的同學們在實驗上給予的幫助，讓我的實驗能順利完成。也要感謝大學、高中和國中的同學替我分擔煩惱，陪我度過心裡面自己過不去的難關。

最後，當然要感謝我的家人，因為有你們我才能夠無後顧之憂地完成碩士學業，謝謝你們!希望之後也有大家繼續相伴，一起加油!

中文摘要



Streptococcus pyogenes 又稱為 A 型鏈球菌 (Group A *Streptococcus*)，是一以人類為唯一天然宿主，可以引起咽喉炎、壞死性筋膜炎及菌血症的細菌。已知莢膜能幫助 A 型鏈球菌造成侵入性感染，是一重要的毒力因子。而 M4 血清型 A 型鏈球菌雖然缺少莢膜，卻是主要造成 A 型鏈球菌侵入性感染的血清型，顯示 M4 血清型 A 型鏈球菌可能有其他毒力因子能夠抵抗宿主的免疫系統。我們實驗室與其他研究均發現，由 fibronectin-binding, collagen-binding, T antigen (FCT) region 所編碼的線毛 (Pilus) 能幫助 A 型鏈球菌貼附到宿主的皮膚和咽喉細胞、形成生物膜並造成小鼠的皮膚感染。除此之外，實驗室之前的研究進一步發現，以腹腔注射 M4 血清型 A 型鏈球菌感染小鼠時，野生株較缺乏線毛的 *spy0116* 突變株更能引起小鼠的死亡，且野生株在人類全血中有較佳的存活率，顯示線毛的存在對 M4 血清型 A 型鏈球菌躲避免疫攻擊，並造成系統性感染有其必要性。血紅素結合蛋白 (haptoglobin) 是一種急性期蛋白，先前有研究指出可藉由與白血球表面的受器結合來調控細胞的反應。實驗室發現 M4 血清型 A 型鏈球菌的線毛能與 haptoglobin 結合，因此我的實驗主軸在研究 (1) 線毛本身是否能幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌抵抗宿主的免疫系統，(2) M4 血清型 A 型鏈球菌是否可以藉由鍵結 haptoglobin 來抑制宿主抗菌反應。實驗發現野生株在血清中有存活較好的趨勢，但是野生株及突變株被補體標記的程度相當且野生株對於抗菌肽較敏感，顯示線毛本身不足以使野生株較利於存活。然而預先與 haptoglobin 結合的野生株較能抵抗血清、血小板和嗜中性白血球胞外網狀結構 (Neutrophil extracellular traps, NETs) 的殺菌作用，進而使 M4 血清型 A 型鏈球菌野生株在全血中存活較好。Siglec-9 是一種能和唾液酸結合的抑制受器 (inhibitory receptor)，主要表現在人類巨噬細胞和嗜中性白血球表面。我們先前發現 Siglec-9 可以和其 β 鏈具有大量的唾液酸修飾的 haptoglobin 結合，因此我們推測 M4 血清型 A 型鏈球菌可能利用 haptoglobin 去與 Siglec-9 鍵結並抑制免疫反應。為了驗證我們的假說，我們建立了能夠穩定表現人類 Siglec-9



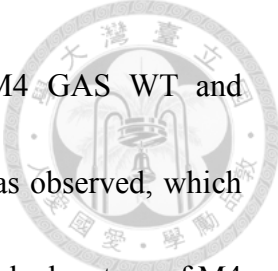
的 RAW/Sig9 細胞株及及控制組 RAW/vector，之後將同時使用人類嗜中性白血球為實驗模型來驗證我們的假說，確認 M4 血清型 A 型鏈球菌與 haptoglobin 結合後是否能透過與 Siglec-9 結合來增加存活率。雖然尚無法確認 M4 血清型 A 型鏈球菌是否可利用 haptoglobin 與免疫細胞上的 Siglec-9 結合來幫助存活，但是我們的實驗結果仍顯示 M4 血清型 A 型鏈球菌利用線毛與 haptoglobin 結合是 M4 血清型 A 型鏈球菌能造成侵入性疾病的重要機轉。

關鍵字：A 型鏈球菌；線毛；侵入性感染；血紅素結合蛋白；Siglecs

Abstract



Streptococcus pyogenes (group A streptococcus, GAS) is a human pathogen causing various diseases such as pharyngitis, necrotizing fasciitis and bacteremia. It is known that hyaluronic acid capsule (HA capsule) of GAS is an important virulence factor contributing to its invasive infection. GAS serotype M4 (M4 GAS), lacking the important HA capsule, is one of the major serotype causing invasive GAS infection. These observations indicate that M4 GAS may have alternative virulence factors to counteract host defense mechanisms. We and others found that pilus encoded by the fibronectin-binding, collagen-binding, T antigen (FCT) region is dedicated in host skin and pharynx adherence, biofilm formation and mice skin infection. Our previous data further demonstrated that M4 GAS wild-type (WT) causes more mortality in mice intraperitoneal infection and survives better in human blood compare to M4 GAS Δ *spy0116* mutant deficient in pilus formation. These data suggest that the pilus of M4 GAS contributes to host immune evasion and systemic infection. Haptoglobin is an acute phase protein that have been reported to regulate leukocyte functions. Our previous data showed that M4 GAS binds haptoglobin via its protruding pilus; therefore, my specific aims of this project are to investigate whether (1) M4 GAS pilus its self can counteract host immune system, (2) haptoglobin bound M4 GAS can downregulate host antibacterial responses. Our data showed that M4 GAS WT survives better in human serum than the M4 GAS Δ *spy0116*



mutant. However, comparable complement deposition between M4 GAS WT and Δ *spy0116* mutant and increased AMP sensitivity in M4 GAS WT was observed, which suggests that pilus itself is not sufficient to confer to the whole survival advantage of M4 GAS WT. When precoated with haptoglobin, M4 GAS WT was more resistant to serum antimicrobials, platelets and NET-mediated killing, which together resulted in the better survival in the human whole blood. We previously found that Siglec-9, a sialic acid-binding inhibitory receptor expressed primarily on human macrophages and neutrophils, can bind to the heavily sialylated β chain of haptoglobin, which lead to the hypothesis that M4 GAS may suppress immune activation via engaging Siglec-9 with pilus bound haptoglobin. To address this question, we generated Siglec-9-expressing RAW264.7 stable cell line, and will apply this system together with human primary neutrophil system to directly address the role of Siglec-9 and haptoglobin in the immune suppression upon GAS infection. Although the detailed mechanism has not been fully elucidated, our results clearly demonstrated the binding of haptoglobin to M4 GAS pilus is essential to provide the beneficial survival advantage to subvert host antibacterial immune responses.

Keywords : Group A Streptococcus ; pilus ; invasive infection ; haptoglobin ; Siglecs

目錄



口試委員審定書.....	i
致謝.....	ii
中文摘要.....	iii
Abstract.....	v
目錄.....	vii
第一章、研究背景與動機.....	1
一、A型鏈球菌.....	1
1. A型鏈球菌 (Group A <i>Streptococcus</i> , GAS).....	1
2. A型鏈球菌之流行病學.....	1
3. A型鏈球菌之毒力因子.....	2
4. A型鏈球菌之線毛 (pilus).....	3
5. A型鏈球菌之莢膜.....	4
二、急性期蛋白 (Acute phase proteins , Apps).....	5
1. 急性期蛋白.....	5
2. 血紅素結合蛋白 (haptoglobin , Hp).....	5
三、Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) 受體.....	6
1. Siglec 受體.....	6
2. Siglec-9.....	7
四、研究動機.....	8
第二章、研究材料與實驗方法.....	10
一、研究材料.....	10
1. 實驗菌株 (Bacteria strain).....	10
2. 細胞株 (Cell lines).....	11
3. 引子 (Primer).....	11
4. 質體 (Plasmid).....	12
5. 抗體 (Antibody).....	13
6. 抗菌胜肽 (Antimicrobial peptide).....	14



7. 酵素免疫分析法試劑組	14
8. 萃取細菌細胞壁之試劑	14
9. 銀染 (Silver stain) 之試劑.....	14
二、 實驗方法	15
1. 核酸萃取	15
2. DNA 洋菜膠電泳 (DNA agarose electrophoresis).....	16
3. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction , PCR).....	16
4. 勝任細胞的製備及電穿孔作用	17
5. 同源置換 (Homologous recombination).....	18
6. 預先結合 GAS 與 haptoglobin	18
7. 預先使用唾液酸酶處理 GBS.....	18
8. GAS 與血清中之 haptoglobin 結合試驗	19
9. 流式細胞儀分析與流式細胞分選	19
10. 生物膜 (biofilm)生成試驗.....	21
11. 全血殺菌試驗	22
12. 血清與血漿殺菌試驗	22
13. 血小板殺菌試驗	23
14. 抗菌胜肽抑菌試驗	23
15. 組織蛋白抑菌試驗	23
16. 嗜中性白血球殺菌試驗	24
17. NETs 殺菌試驗.....	24
18. 細胞感染之基因表現量測定	25
19. RAW 細胞之細胞激素表現量測定	26
20. RAW 細胞之殺菌試驗	26
21. 細胞壁萃取物之分析	26
22. 小鼠皮下感染	27
23. RAW/vector、RAW/Sig9、RAW/R120K 細胞株的建立	28
第三章、 研究結果	30

一、 建立 M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株和臨床分離 M4 血清型 A 型鏈球菌之 $\Delta spy0116$ 突變株.....	30
1. 建立 M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株並確認其表現.....	30
2. 建立剔除 $spy0116$ 的臨床分離菌株並確認其表現型	31
二、 線毛在 M4 血清型 A 型鏈球菌抵抗免疫系統之角色	32
1. 具線毛之 M4 血清型 A 型鏈球菌野生株在人類全血中存活較佳	32
2. 線毛不會增加 M4 血清型 A 型鏈球菌對補體、抗菌肽和組織蛋白的抗性	32
3. 線毛不影響 M4 血清型 A 型鏈球菌與 NETs 反應後之存活率	34
4. 線毛不影響 M4 血清型 A 型鏈球菌與血小板反應後之存活率沒有差別	34
5. M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株和臨床分離之 M4 血清型 A 型鏈球菌野生株在人類全血中之存活率.....	34
6. M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株及控制組之 LL-37 結合能力沒有差別.....	35
三、 M4 血清型 A 型鏈球菌利用線毛與血紅素結合蛋白結合來抵抗免疫系統攻擊	35
1. M4 血清型 A 型鏈球菌的線毛能與人類血清中之 haptoglobin 結合	35
2. 預先與 haptoglobin 結合能幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌在人類全血和血清中存活	36
3. Haptoglobin 無法幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌抵禦 C3 補體標記和抗菌肽.....	36
4. 預先與 haptoglobin 結合能幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌抵抗 NETs 和血小板的殺菌作用	37
四、 M4 血清型 A 型鏈球菌與血紅素結合蛋白結合後，可能藉由與 Siglec-9 鍵結來調控免疫反應.....	37
1. 建立 RAW/vector 和 RAW/Sig9 細胞株	37
2. 與 haptoglobin 結合可增加 M4 血清型 A 型鏈球菌之存活率，但 RAW 細胞是否表現 Siglec-9 不影響 M4 血清型 A 型鏈球菌之存活	39
第四章、 討論與未來研究方向	40
參考文獻.....	44
圖表目錄.....	50
附錄.....	68

第一章、研究背景與動機




一、A 型鏈球菌

1. A 型鏈球菌 (Group A *Streptococcus*, GAS)

鏈球菌屬 (*Streptococcus*) 是革蘭氏陽性 (Gram-positive)、無運動性 (nonmotile) 的鏈球菌，多數為兼性厭氧菌且須培養於較營養的培養基中。將鏈球菌培養於血瓊脂平板 (blood agar plate, BAP) 後，可由溶血性將鏈球菌作分類，分別為 α 溶血 (不完全溶血)、 β 溶血 (完全溶血) 和 γ 溶血 (不溶血)¹。鏈球菌屬中常見的致病菌有 GAS、B 型鏈球菌 (Group B *Streptococcus*, GBS)、肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 和草綠色鏈球菌 (Viridans streptococci)。其中的 GAS 又稱為 *Streptococcus pyogenes*，培養於 BAP 時呈現 β 溶血，特色為多數的 GAS 會表現玻尿酸莢膜 (hyaluronic acid capsule)¹。人類是 GAS 唯一的天然宿主，GAS 能夠感染咽部和皮膚，輕微的 GAS 感染可能造成咽喉炎 (pharyngitis) 和膿皰瘡 (impetigo)，嚴重感染則可能造成需要通報疾管局的侵入性疾病，例如壞死性筋膜炎 (necrotizing fasciitis) 和毒性休克症候群 (streptococcal toxic shock syndrome)。除此之外，GAS 感染也可能造成與自體免疫有關的後遺症，包含急性腎小球腎炎 (acute poststreptococcal glomerulonephritis)、急性風濕熱 (acute rheumatic fever) 和風濕性心臟病 (rheumatic heart disease)²。雖然持續有研究使用 GAS 表面的抗原進行疫苗開發，但目前尚無合適的 GAS 疫苗可使用³，因此目前的治療方式為施以適當劑量的抗生素來治療 GAS 感染⁴。

2. A 型鏈球菌之流行病學

先前研究估計每年因 GAS 輕微感染而產生膿皮症 (pyoderma) 或咽喉炎的人數高達 7 億人且每年約有 180 萬個嚴重 GAS 感染的新案例。除此之外，每年至少有 50 萬人會死於 GAS 感染，且在因感染性疾病而死亡的統計中排名在第 9 名，顯示 GAS 是臨床上重要的致病菌⁵。GAS 的感染以及相關後遺症主要發生在兒童



及青少年，並可能造成爆發感染，過去在台灣、香港、澳洲和英國等地區都曾有過疾病爆發⁶⁻⁹。多數的 GAS 感染發生在低收入國家，且 GAS 感染在不同地區造成的疾病不盡相同，在高收入國家主要是造成咽喉炎和侵入性疾病，在低收入國家則主要是風濕熱、風濕性心臟病和侵入性疾病。除此之外，不同地區流行的血清型也不相同¹⁰。GAS 可依照其表面的 M 蛋白 (M protein) 或是 T 抗原 (T antigen) 做血清型分型，由於負責編碼 M protein 之 *emm* 基因在 5' 端的部分變異度很高，因此現在是以 *emm* 基因做為 GAS 的分型標準，目前已知有超過 200 種的 *emm* 型^{10,11}。雖然不同型別的 GAS 因會表現不同的毒力因子 (virulence factor) 而有不同的流行地區和組織向性 (tissue tropism)，但是 *emm1*、*emm3*、*emm12* 和 *emm28* 型別之 GAS 造成的感染最為常見，其中 *emm1* 為流行率最高之 GAS 型別並造成過多次疾病爆發^{2,6-10,12}。

3. A 型鏈球菌之毒力因子

GAS 能表現多種的毒力因子來幫助 GAS 感染宿主以及存活。M protein、線毛和纖維粘連蛋白-結合蛋白 (fibronectin-binding proteins) 可幫助 GAS 貼附到宿主；M protein、鏈球菌溶血素 O 及 S (streptolysin O、S，SLO、SLS) 和莢膜等毒力因子能夠幫助 GAS 躲避或分解宿主的免疫攻擊²。M protein 是一大量表現在 GAS 表面上的蛋白，已知能抵抗免疫細胞的吞噬作用 (phagocytosis)、抵抗調理作用 (opsonization) 以及與纖溶酶原 (plasminogen) 結合來調節宿主的凝血反應¹³。另外，M protein 露出的 N 端部分是高度變異的，因此不同型別之 M protein 的構形會有不同且功能和組織向性也會有所不同。就組織向性而言，M protein 模式 A-C 常感染咽喉、模式 D 常感染皮膚，而模式 E 則沒有特定的組織向性¹⁴。SLO 是一種溶於水的外毒素 (exotoxin)，可以藉由和細胞膜上裸露的膽固醇 (cholesterol) 結合，形成寡聚物 (oligomer) 來穿透非極性的細胞膜¹⁵。SLS 是一種只有 2.7-kDa 的胜肽，雖然確切作用機制尚不清楚，但推測是透過堆積在宿主細胞膜上來造成膜穿孔

16。因此 SLO 和 SLS 能夠裂解血球、血小板和細胞內的顆粒，幫助 GAS 逃避免疫攻擊。GAS 有兩類能夠和纖維粘連蛋白結合的蛋白，可分成具有或不具有纖維粘連蛋白-結合重複序列的蛋白，例如 Fba、Fbp54 和 sfbX 等等，可以幫助 GAS 貼附和侵入細胞，不同 M 血清型的 GAS 會表現不同的纖維粘連蛋白-結合蛋白^{2,17}。

4. A 型鏈球菌之線毛 (pilus)

線毛是一種表現在細菌表面的非鞭毛聚合物 (non-flagellar polymeric cell-surface organelles)，但過去對於線毛的了解主要是與革蘭氏陰性的細菌有關，對於革蘭氏陽性細菌的線毛了解則不多，直到 2005 年 Mora 等人發表的研究才知道了在 GAS 的表面也會有線毛的存在¹⁸。該研究比對序列後發現 GAS 有一段 10~16 kb 的高度變異的致病島 (pathogenicity island)，也就是 fibronectin-binding, collagen-binding, T antigen (FCT) region，會編碼與細胞外基質-結合蛋白 (extracellular matrix (ECM)-binding protein) 相似的蛋白。與過去在 M6 血清型 GAS 發現的結果相同，FCT region 也能夠編碼其他種血清型之 GAS 的 T 抗原，且每種血清型會對應到特定的 T 血清型；以免疫金染色 (immunogold labelling) 還發現，T 抗原會在 GAS 表面形成線毛樣的構造 (pilus-like structures)¹⁹。目前已知有九種 FCT region 且在不同血清型的 GAS 會由不同的基因組成，主要包含調控 FCT region 轉錄的 RofA 或 Nra、構成線毛本體的基幹蛋白 (backbone protein) 和輔助蛋白 (ancillary protein) 以及負責組裝線毛和將線毛遷入到細胞壁的轉肽酵素 (sortases)^{20,21}。以不同血清型的 GAS 進行研究皆發現，線毛能夠幫助 GAS 貼附以及入侵宿主細胞、幫助 GAS 形成生物膜 (biofilm) 以及小鼠的皮膚感染；但是在人血存活 (human blood survival)、腹腔注射感染 (peritoneal infection) 小鼠和針對免疫系統各種成分分析的結果顯示不同血清型的 GAS 所表現的線毛功能不同，有些線毛能增加 GAS 的毒力，有些線毛反而會減少 GAS 的毒力²²⁻²⁵。



5. A 型鏈球菌之莢膜

玻尿酸是一種黏多醣 (mucopolysaccharide)，由重複的 D-葡萄糖醛酸 (D-glucuronic acid, GlcUA) 和 N-乙醯葡萄糖胺 (N-acetylglucosamine, GlcNAc) 構成。人體的細胞外基質中含有玻尿酸，能夠潤滑關節和肌肉、影響水分的運輸以及調節發炎反應。由於玻尿酸是人體本來就有的物質而不會使人體產生免疫反應，因此玻尿酸常使用於關節潤滑和幫助術後恢復²⁶。而除了人體有玻尿酸之外，有些致病菌也能產生玻尿酸來保護自己免於宿主的免疫攻擊，例如金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、大腸桿菌 (*Escherichia coli*)、肺炎鏈球菌和 GAS。能產生玻尿酸之致病菌的基因組中會有 *has* 操縱子 (operon)，由 *hasA*、*hasB* 和 *hasC* 組成，分別編碼透明質酸合成酶 (hyaluronate synthase)、尿苷二磷酸-葡萄糖-脫氫酶 (UDP-glucose-dehydrogenase) 和尿苷二磷酸-葡萄糖-焦磷酸化酶 (UDP-glucose-pyrophosphorylase)，且只要有 *hasA* 和 *hasB* 就足以使細菌產生玻尿酸莢膜²⁷。研究發現，使用透明質酸酶 (hyaluronidase) 處理能夠降低 GAS 感染小鼠的毒力以及使白血球能吞噬更多的 GAS^{28,29}。此外，使用腹腔或皮下注射的方式感染小鼠以及將 GAS 與人血或嗜中性白血球胞外網狀結構 (neutrophil extracellular traps, NETs) 反應，皆會看到沒有莢膜的 GAS 突變株毒力和存活較差³⁰⁻³²。以 anti-G-related a2-macroglobulin-binding protein (GRAB) 進行 GAS 染色，還可看到有莢膜的 GAS 被抗體辨認到的程度明顯低於沒有莢膜的突變株³³。以上研究皆顯示莢膜是 GAS 的重要毒力因子。然而有研究分析了 491 株臨床分離的 M4 和 M22 血清型 GAS，發現這兩種血清型的 GAS 無法測得玻尿酸莢膜、沒有 *has* 操縱子和也沒有其他能生成莢膜的基因，因此 M4 和 M22 血清型的 GAS 是沒有莢膜的。除此之外，研究中還發現 M4 和 M22 血清型 GAS 能夠造成侵入性疾病且能在人血中增殖，顯示莢膜不是 M4 和 M22 血清型 GAS 必要的毒力因子³⁴。



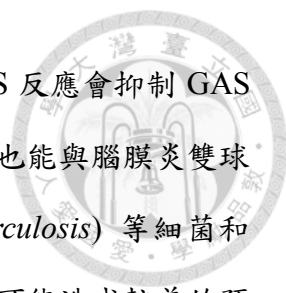
二、急性期蛋白 (Acute phase proteins, APPs)

1. 急性期蛋白

當身體受到感染、組織損傷、有免疫相關疾病或是腫瘤生長的時候，便會產生系統性的反應，稱為急性期反應 (acute phase responses, APR)。從被感染或是損傷的地方開始釋出促發炎細胞激素 (pro-inflammatory cytokines) 使得血管和免疫系統被活化，接著促使更多的細胞激素 (cytokines) 產生刺激各種不同的細胞，造成全身性的反應，例如血液中蛋白和賀爾蒙表現量的改變以及補體系統 (complement system) 的活化³⁵。其中血液中特定中介物 (mediators) 的表現量的改變可能為增加或減少，由於這些中介物主要組成蛋白，因此被稱作急性期蛋白 (acute phase proteins, APPs)，主要是由肝細胞 (hepatocyte) 經腫瘤壞死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白細胞介素-1 (interleukin-1, IL-1)、IL-6 和干擾素- γ (interferon- γ , IFN- γ) 等細胞激素刺激所產生的³⁶。表現量會下降的 APPs 有白蛋白 (albumin)、鋅 (zinc) 和鐵 (iron) 等中介物，這些中介物的表現量下降會使原本與之結合的賀爾蒙被釋出。而表現量會上升的 APPs 包含 C-反應蛋白 (C-reactive protein, CRP)、血清澱粉樣蛋白 (serum amyloid A, SAA) 和血紅素結合蛋白 (haptoglobin, Hp) 等，可以藉由做為調理素 (opsonin)、吸引白血球或是抑制白血球的呼吸爆發 (respiratory burst) 等方式來調控發炎反應³⁷。

2. 血紅素結合蛋白 (haptoglobin, Hp)

Hp 是一種主要由肝臟合成的糖蛋白 (glycoprotein)，肝細胞在急性期受到 IL-1、IL-6 和糖皮質激素 (glucocorticoid) 刺激時，會大量產生 Hp³⁸。Hp 是由兩個 α 鏈和兩個 β 鏈次單元組成，其中的 α 鏈依照是否有基因內複製 (intergenic duplication) 可分成兩種等位基因 (allele)，因此 Hp 有 Hp 1-1、Hp 2-1 和 Hp 2-2 三種表現型 (phenotype)，不同地區的流行不同的 Hp 表現型³⁹。有研究發現特定表現型的 Hp 能與病原結合，例如 Hp 2-1 和 Hp 2-2 能和 GAS 的 T4 抗原結合，且該篇

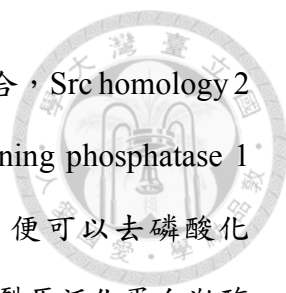


研究結果顯示 *in vitro* 時將含有 Hp 2-1 或 Hp 2-2 的血清與 GAS 反應會抑制 GAS 生長，但對於實際 *in vivo* 的影響尚不清楚^{40,41}。除此之外，Hp 也能與腦膜炎雙球菌 (*Nisseria meningitidis*) 和結核分枝桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 等細菌和病毒結合，而 Hp 與病原的結合對於宿主可能是保護的效果，也可能造成較差的預後^{42,43}。Hp 最著名的功能就是與血紅素 (hemoglobin, Hb) 形成不可逆的結合，結合後的 Hb-Hp 複合體會被單核球 (monocyte) 和巨噬細胞 (macrophage) 表面的 CD163 辨識並內吞，促使細胞產生血紅素加氧酶-1 (hemeoxygenase-1) 和 IL-10^{44,45}。Hp 也能以單獨存在的形式與其他免疫細胞上的接受器結合，例如 CD11b/CD18、CD22 (Siglec-2) 和嗜中性白血球上的接受器等等，可以調控細胞的成熟、貼附、遷移 (migration)、趨化作用 (chemotaxis)、吞噬作用 (phagocytosis) 和殺菌能力等的免疫反應，因此被視為是具有抗發炎功能的 APP⁴⁶⁻⁵⁰。

三、 Sialic acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) 受體

1. Siglec 受體

免疫細胞表面的受體在細胞內的區域通常會有 immunoreceptor tyrosine-based activation (or inhibitory) motifs (ITAMs 或 ITIMs)，因此可以傳遞活化或是抑制的訊號來調控細胞的反應⁵¹，Siglecs 就是其中一種會表現在免疫細胞表面的受體。目前已知人類和老鼠分別會表現 16 和 9 種 Siglecs，而這些 Siglecs 可依照基因在不同物種間的相似度和演化程度分類，第一類是保留度較高的 Siglec-1、-2、-4 和 -15；第二類則是 CD33-related Siglecs，包含人類的 Siglec-3、-5~-14 和 -16 以及老鼠的 Siglec-3、-E、-F、-G 和 -H⁵²。Siglecs 的結構是由可以和唾液酸 (sialic acids, Sias) 結合的 V-set immunoglobulin domain 以及重複的 C2-set immunoglobulin domains 所組成，有些 Siglec 的細胞質尾端 (cytoplasmic tail) 還會有 ITIM 及 ITIM-like 結構⁵³，ITIM 的胺基酸序列為 (Ile/Val/Leu/Ser)-X-Tyr-X-X-(Leu/Val)，其中 X 可以是任一種胺基酸⁵⁴。Sias 和 Siglec 的結合有 *cis* 和 *trans* 兩種形式，分別代表



與自己表面或與非自己表面的 Sias 結合⁵³。當 Sias 和 Siglec 結合，Src homology 2 (SH2) family kinases 便會磷酸化 ITIM，使得 SH2 domain-containing phosphatase 1 和 2 (SHP1 和 SHP2) 被吸引過來並且活化。活化的 SHPs 便可以去磷酸化 (dephosphorylate) 其他的訊號分子 (signaling molecules)，例如絲裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 或核因子活化 B 細胞 κ 輕鏈增強子 (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells, NF- κ B)，進而抑制細胞的活化⁵⁵。

2. Siglec-9

嗜中性白血球和巨噬細胞是抵抗病原入侵的第一道防線⁵⁶，而 Siglec-9 是一種在嗜中性白血球及單核球會高度表現以及在自然殺手細胞 (natural killer cells, NK cells) 會稍微表現的受器，於 2000 年經基因和胺基酸序列比對後所發現，其基因和其他 CD33-related Siglecs 同樣位於 19 號染色體上面。不同的 Siglecs 能辨認的 Sias 不盡相同，Siglec-9 能辨認的是 α 2,3- 和 α 2,6-linked Sias；此外，糖的結構會影響 Sias 與 Siglec 的結合能力，且有 R120K 突變的 Siglec-9 與 Sia 的結合能力也會大幅減低^{57,58}。研究發現 Siglec-9 的細胞質尾端有一個 ITIM 和一個 ITIM-like 結構，當 ITIM 或 ITIM-like 有突變時便會影響到與 SHP1 或 SHP2 的結合，且 ITIM 是主要造成影響的結構，證明了 Siglec-9 確實是一個抑制受器 (inhibitory receptor)⁵⁹。研究還發現 Siglec-9 及 Siglec-E (Siglec-9 的老鼠直系同源) 可以抑制多種類鐸受體 (toll-like receptor, TLR) 誘發生成的 TNF- α 和 IL-6，而且 Siglec-9 還能增強 IL-10 的生成^{60,61}。除了在脊椎動物的細胞表面會有 Sias 之外，許多病原的表面也有 Sias 因而能與 Siglecs 結合⁶²。先前研究發現 GBS 的多醣莢膜能和 CD33-related Siglecs 結合，GAS 的玻尿酸莢膜則能夠和 Siglec-9 結合，且病原與 CD33-related Siglecs 的結合能夠抑制免疫細胞的殺菌的能力以及降低促發炎細胞激素的分泌，顯示有些病原能夠與 Siglecs 結合來幫助其在宿主當中存活⁶³⁻⁶⁵。




四、研究動機

由文獻已經知道了玻尿酸莢膜是 GAS 的重要毒力因子，然而我們想要研究的 M4 血清型 GAS (M4 GAS) 因為基因組中沒有 *has* 操縱子且沒有其他替代的莢膜，所以是一株沒有莢膜的 GAS。雖然 M4 GAS 沒有莢膜，但仍能造成侵入性疾病且臨床分離菌株能夠在人血中增殖^{6,34}。除此之外，先前統計結果顯示 M4 GAS 在高收入國家是主要的造成感染的血清型，也曾造成過爆發感染，顯示 M4 GAS 在臨床上有其重要性^{8,10,66,67}。過去研究已知 M4 GAS 具有特殊的致病機轉，例如 fibronectin-binding protein 可以幫助 M4 GAS 貼附到宿主細胞以利造成感染和具有和 C4BP 結合的能力而可以阻止補體系統的活化^{17,68}，但這些尚不足以解釋為何 M4 GAS 缺少莢膜卻仍能在人血中存活並造成侵入性感染。

實驗室先前建立了剔除掉基幹蛋白的 $\Delta spy0116$ 突變株，且以流式細胞儀以及免疫金染色確認了此突變株無法形成線毛。初步結果顯示 $\Delta spy0116$ 突變株與野生株相比，其生物膜生成、細胞貼附及入侵的能力皆明顯較弱，且以皮下注射感染小鼠造成的傷口也明顯較小。以腹腔注射之方式感染小鼠造成系統性感染可以看到野生株會造成較高的死亡率；將 M4 GAS 與人血反應還能看到野生株能存活的比 $\Delta spy0116$ 突變株好。以上結果顯示 M4 GAS 的線毛除了能幫助 GAS 造成皮膚感染之外，還是造成系統性感染以及抵抗免疫攻擊的重要毒力因子。

過去的研究顯示，GAS 的 T4 抗原能夠和 Hp 結合，而我們研究的 M4 GAS 在 T 血清型分類中正是屬於 T4 血清型^{21,40}；實驗室先前也發現了 Hp 能與組成 M4 GAS 線毛的基幹蛋白 (spy0116 蛋白) 結合，並以流式細胞儀確認了 $\Delta spy0116$ 突變株無法與 Hp 結合。除此之外，由於 Hp 的 β 鏈有大量的唾液酸修飾⁶⁹，因此 Hp 能與 Siglecs 結合⁴⁷。實驗室先前也確認了 Hp 確實能與 Siglec-9 結合，且預先和 Hp 結合的 M4 GAS 能和 Siglec-9 有較佳的結合。因此我們推測 M4 GAS 能藉由線毛與 Hp 結合，並透過 Hp 與 Siglec-9 結合來抑制免疫細胞的活性，進而幫助 M4 GAS 抵抗免疫攻擊並造成系統性感染。



因此我的實驗目的為探討 (1) 線毛是否能幫助 M4 GAS 抵禦免疫系統的攻擊，(2) M4 GAS 是否可利用線毛與 Hp 結合來抵抗免疫攻擊，(3) M4 GAS 是否可透過 Hp 與 Siglec-9 結合來抑制免疫細胞的活性。我會將 M4 GAS 野生株與 Δ spy0116 突變株分別與免疫系統中的各成分進行反應，例如人血、血清和抗菌胜肽 (antimicrobial peptide, AMP) 等，藉由實驗來驗證假說並找出 M4 GAS 是如何利用線毛來抵抗免疫系統攻擊的。此外，我們建立了會表現 Siglec-9 的 RAW264.7 細胞以探討 M4 GAS 與 Hp 結合後，是否能藉由 Siglec-9 去負調控免疫細胞來幫助存活。

第二章、研究材料與實驗方法



一、研究材料

1. 實驗菌株 (Bacteria strain)

菌株	培養條件	來源
M4 <i>Streptococcus pyogenes</i> (M4 GAS WT)	THY, 37 °C培養箱	CDC 4063-05
M4 <i>Streptococcus pyogenes</i> Δspy0116 突變株 (M4 GAS Δspy0116)	THY, 37 °C培養箱	Lab construct
臨床分離菌株 M4 <i>Streptococcus pyogenes</i> 3 號 (CG#3 WT)	THY, 37 °C培養箱	長庚兒童內科部 邱政洵主任實驗室
臨床分離菌株 M4 <i>Streptococcus pyogenes</i> 3 號 Δspy0116 突變株 (CG#3 Δspy0116)	THY, 37 °C培養箱	Lab construct
M4 <i>Streptococcus pyogenes</i> spy0116 突變株::pLZ12Km2-P23R-TA (M4 GAS Δspy0116+vector)	THY + 200 μg/ml kanamycin, 37 °C培養箱	Lab construct
M4 <i>Streptococcus pyogenes</i> spy0116 突變株::pLZ12Km2-P23R-TA-N116 (M4 GAS Δspy0116+spy0116)	THY + 200 μg/ml kanamycin, 37 °C培養箱	Lab construct
human serotype III <i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS COH-1 WT)	THY, 37 °C培養箱	Nizet lab
human serotype III <i>Streptococcus agalactiae</i> ΔneuA 突變株 (GBS COH-1 ΔneuA)	THY, 37 °C培養箱	Nizet lab

THY : Todd Hewitt Broth (THB) (Acumedia, Cat#7161) + 2 % Yeast extract (BD, Cat#212750)



2. 細胞株 (Cell lines)

使用的培養液為含有 10 % fetal bovine serum (FBS) 的 RPMI 1640 培養液 (Hyclone, Cat#SH30027.02)，並將細胞置於含有 5 % CO₂ 的 37 °C 培養箱中培養。

(1) RAW 264.7 細胞

RAW 264.7 細胞為老鼠的巨噬細胞，是研究細菌感染的細胞膜型。

(2) RAW/vector

以 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/Cas9 系統將質體 pROSA26-Vector CAG promoter 導入 RAW 264.7 細胞的基因組中，是實驗的控制組。

(3) RAW/Sig9

以 CRISPR/Cas9 系統將質體 pROSA26-pCAG-hSiglec9 導入 RAW 264.7 細胞的基因組中，是能夠表現人類 Siglec-9 的 RAW 264.7 細胞。

(4) THP-1/ctrl

以慢病毒 (lentivirus) 轉染人類單核球細胞株 THP-1 所建立之實驗控制組。(來自中研院 Angata lab)

(5) THP-1/Sig9

以慢病毒轉染 THP-1 細胞所建立之能持續過度表現人類 Siglec-9 的 THP-1 細胞。(來自中研院 Angata lab)

3. 引子 (Primer)

引子	序列 (5'→3')	目標
Cat-For	ATGGAGAAAAAATCACTGGATATA CC	<i>cat</i> (cam acetyltransferase)
Cat-Rev	TTACGCCCCGCCCCTGCCACTCATCG CA	<i>cat</i> (cam acetyltransferase)
UpUp-For-spy0116	CAGGGGATAGTAACGTCGACG	upstream of <i>spy0116</i>

DnDn-Rev-spy0116	GATTTAAACGATGCCGTTTG	downstream of <i>spy0116</i>
For-PstI-spy0116	CAGCTGCAGTTGAAAACGAAG	<i>spy0116</i>
Rev-BglII-spy0116	CAGAGATCTCTATTCCGATTT	<i>spy0116</i>
isp	CCGTATCTTTAGCGCACTCGAGGAC AATTTGCGAGATTAG	<i>isp</i> genes
emm1	TTCTATAACTTCCCTAGGATTACCAT CACC	<i>emm1</i> (M1 protein)
emm4	CCACGCTGAATCAGCCTCAGGCTTT TTAAT	<i>emm4</i> (M4 protein)
DnDn of Rosa26-R	GCGTGTTTTGGTTGGCGTA	Downstream of Rosa26
mCherry of pRosa26	CTACGACGCTGAGGTCAAG	Downstream of Rosa26
newUpUp-F	ATTGGGGGAGGAGACATCCA	Upstream of Rosa26
newCAG-R	AGAGTGAAGCAGAACGTGGG	Upstream of Rosa26
qPCR mTNF-F	ATGCACAGCCTTCCTCACAG	Mouse TNF- α
qPCR mTNF-R	ACAAGGTAGAGAGGCCAGGT	Mouse TNF- α
m IL-6_F	ACAAGAAAGACAAAGCCAGAGTC	Mouse IL-6
m IL-6_R	ATTGGAAATTGGGGTAGGAAG	Mouse IL-6
m IL-10_F	TGGGTTGCCAAGCCTTATCGG	Mouse IL-10
m IL-10_R	ACCTGCTCCACTGCCTTGCTC	Mouse IL-10

4. 質體 (Plasmid)

質體	備註	培養條件
pHY-0116	pHY 304+ <i>spy0116</i> 基因的上游和下游	含 500 μ g/ml erythromycin 的 LB, 37 °C 培養
pLZ12Km2-P23R-TA	空的載體	含 50 μ g/ml kanamycin 的 LB, 37 °C 培養
pLZ12Km2-P23R-TA-N116	pLZ12Km2-P23R-TA 加上 N116 (M4 GAS 的 <i>spy0115</i> 基因尾端 ~ <i>spy0116</i> 基因)	含 50 μ g/ml kanamycin 的 LB, 37 °C 培養

pX330-ROSA26 sgRNA1	具有 hSpCas9 和 sgRNA (single guide RNA)	含 100 µg/ml ampicillin 的 LB, 37 °C 培養
pROSA26-Vector CAG promoter	空的載體, 帶有 mCherry 螢光	含 100 µg/ml ampicillin 的 LB, 37 °C 培養
pROSA26-pCAG-hSiglec9	pROSA26-Vector CAG promoter 加上完整的 <i>Siglec-9</i> 基因, 帶有 mCherry 螢光	含 100 µg/ml ampicillin 的 LB, 37 °C 培養

LB : LB broth (Millier) (Bioshop , Cat#LBL407.1)

5. 抗體 (Antibody)

抗體名稱	品系	來源
Anti-Streptococcus group A T4 protein antibody	Rabbit , polyclonal	Abcam , Cat#ab79418
Goat anti-rabbit AF647 antibody	Goat , polyclonal	Life technology , Cat#A-21244
Fluorescein-Conjugated Goat F(ab')₂ Fragment To Human Complement C3	Goat , polyclonal	MP Biomedicals , Cat#55191
Purified anti-mouse CD16/32 Antibody	Rat , monoclonal (93)	Biolegend , Cat#101302
APC anti-human Siglec-9 Antibody	Mouse , monoclonal (K8)	Biolegend , Cat#351505
APC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody	Mouse , monoclonal (MOPC-21)	Biolegend , Cat#400120
IRDye® 800CW Donkey anti-Rabbit IgG (H + L) Haptoglobin antibody	Donkey , polyclonal	LI-COR , Cat#926-32213
Purified anti-human Siglec-9 Antibody	Mouse , monoclonal (K8)	Genetex Cat#GTX112962
Purified Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl Antibody	Mouse , monoclonal (MOPC-21)	Biolegend Cat#351502
		Biolegend Cat#400102



6. 抗菌胜肽 (Antimicrobial peptide)

名稱	來源	胺基酸序列
LL-37	AnaSpec , Cat#AS-61302	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQ RIKDFLRNLVPRTEs
Cathelicidin-related antimicrobial peptides (CRAMP)	Bachem , Cat#H-6526.0001	GLLRKGGEKIGEKLLKKIGQKIK NFFQKLVPQPEQ
5-FAM-LC-LL-37	AnaSpec , Cat# AS-63694	5-FAM-LC-LGDFFRKSKEKIGKE FKRIVQRIKDFLRNLVPRTEs

7. 酵素免疫分析法試劑組

細胞激素	試劑名稱	功能
Mouse CXCL1/KC	R&D system , Cat#MKC00B	吸引和活化嗜中性白血球
Mouse CCL2 (MCP-1)	eBioscience , Cat#88-7391-88	吸引單核球
Mouse TNF-α	eBioscience , Cat#88-7324-88	促發炎細胞激素
Mouse IL-10	eBioscience , Cat#88-7105-88	負調控細胞反應

8. 萃取細菌細胞壁之試劑

(1) ex-proplasting buffer

成分	stock	加入之體積
0.1 M KH₂PO₄ (pH 6.2)	1M	1 ml
10 mM MgCl₂	1M	100 μ l
40 % sucrose	X	4 g
補水	X	4.9 ml

(2) Cell wall extract buffer

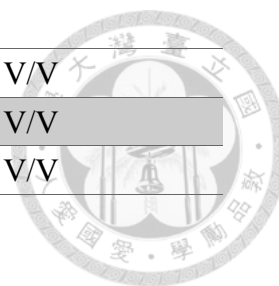
成分	stock	加入之體積
ex-proplasting buffer	X	1 ml
2 mg/ml lysozyme	50 mg/ml	40 μ l
400 U mutanolysin	25000 U/ml	1.6 μ l

9. 銀染 (Silver stain) 之試劑

(1) Fixative solution

成分	加入之體積	最後濃度
methanol	200 ml	50 % V/V

acetic acid	40 ml	10 % V/V
fixative cenhancer concentrate	40 ml	10 % V/V
ddH₂O	120 ml	30 % V/V



(2) Staining solution

成分	加入之體積
ddH₂O	17.5 ml
silver complex	2.5 ml
reduction moderator	2.5 ml
image development reagent	2.5 ml
development accelerator (含 1.25g development accelerator powder 之 25 ml ddH₂O)	25 ml

(3) Stop solution : 5 % 醋酸溶液

二、實驗方法

1. 核酸萃取

(1) 細菌的 genomic DNA (genomic DNA, gDNA) 萃取

使用 Geneaid DNA isolation kit (Geneaid, Cat#GEE150) 萃取 gDNA, 詳細步驟參見 kit 說明書。

(2) 質體萃取

根據質體拷貝數不同以不同方式萃取。拷貝數多的質體使用 Plasmid Miniprep Plus Purification kit (GeneMark, Cat#DP01-Plus) 萃取, 詳細步驟如 kit 說明書。拷貝數少的質體使用 NucleoBond® Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Cat# 740410.10) 萃取, 詳細步驟見 kit 說明書

(3) 細胞的 gDNA 萃取

使用 Genomic DNA Mini Kit Blood Cultured Cell kit (Geneaid, Cat#GB100) 萃取 gDNA, 詳細步驟參見 kit 說明書。

(4) 細胞的 RNA 萃取

以 PBS 清洗細胞一次後, 依照細胞數加入適當體積的 Trizol Reagent (ambion,)



Cat#15596018) 混勻，於室溫反應10分鐘。接著依照Direct-zol™ RNA MiniPrep (ZYMO RESEARCH, Cat#R2052) 之說明書進行RNA萃取。

2. DNA 洋菜膠電泳 (DNA agarose electrophoresis)

使用 Tris/Borate/EDTA 緩衝液 (TBE 緩衝液，1 L 的 TBE 緩衝液含有 10.8 g 的 Tris、5.5 g 的 Boric acid、4 ml 的 0.5 M EDTA) 配製 1% agarose (UniRegion Bio-Tech, Cat#UR-AGA001)，並且加入 TOOLS DNA View 染劑 (TOOLS, Cat#TTDNA01) 稀釋 25000 倍。先把洋菜膠和 TBE 緩衝液放在水平式電泳槽內，再將欲分析的 DNA 樣本以及 ExcelBand 1 KB DNA Ladder (SMOBIO, Cat#DM3100) 加入洋菜膠中，於 100 伏特電壓下進行電泳。完成電泳後，將洋菜膠置於 Benchtop 2UV Transilluminators (UVP) 拍攝由 302 nm 紫外光照射的結果，再與 DNA Ladder 比對 DNA 大小。

3. 聚合酶連鎖反應 (Polymerase Chain Reaction, PCR)

使用程式溫度控制儀 (BIO-RAD T100™ Thermal Cycler) 進行反應，並依照引子以及目標基因的特性設定不同的反應條件。依照實驗需求使用 EmeraldAmp® Max PCR Master Mix (TaKaRa, Cat#RR320A) 或 2X KAPA2G Fast HotStart Genotyping Mix with dye (KAPA, Cat#kk7351) 進行 PCR，反應得到的產物會以 DNA 洋菜膠電泳分析。

(1) GAS M protein 分型

分型方法參考 Vitali 等人的發表內容⁷⁰，反應條件為 95 °C 1 分鐘、(95 °C 15 秒、60 °C 2 分鐘、68 °C 6 分鐘) 20 cycles、68 °C 10 分鐘。

(2) 確認 pHY-0116 質體與 M4 GAS 基因組發生單點交換 (single crossover)



使用 UpUp-For-spy0116 配 Cat-Rev 以及 DnDn-Rev-spy0116 配 Cat-For 進行 PCR，反應條件為 95 °C 5 分鐘、(95 °C 30 秒、58 °C 30 秒、72 °C 45 秒) 25 cycles、72 °C 5 分鐘。

(3) 確認 pHY-0116 質體與 M4 GAS 基因組發生雙點交換 (double crossover)

使用 Cat-For 配 Cat-Rev、For-PstI-spy0116 配 Rev-BglII-spy0116 以及 UpUp-For-spy0116 配 DnDn-Rev-spy0116 進行 PCR，反應條件為 95 °C 5 分鐘、(95 °C 30 秒、58 °C 45 秒、72 °C 90 秒) 25 cycles、72 °C 5 分鐘。

(4) 確認 pROSA26-Vector CAG promoter 或 pROSA26-pCAG-hSiglec9 已嵌入 RAW 264.7 細胞基因組的 Rosa26 前端

使用 newUpUp-F 配 newCAG-R 進行 PCR，反應條件為 95 °C 3 分鐘、(95 °C 15 秒、62 °C 30 秒、72 °C 90 秒) 35 cycles、72 °C 5 分鐘。

(5) 確認 pROSA26-Vector CAG promoter 或 pROSA26-pCAG-hSiglec9 已嵌入 RAW 264.7 細胞基因組的 Rosa26 後端

使用 DnDn of Rosa26-R 配 mCherry of pRosa26 進行 PCR，反應條件為 95 °C 5 分鐘、(95 °C 30 秒、58 °C 30 秒、72 °C 90 秒) 35 cycles、72 °C 5 分鐘。

4. 勝任細胞的製備及電穿孔作用

將 M4 GAS 隔夜培養於含有 20 mM 之 glycine (Bioshop, Cat#GLN011.1) 的 THY 中，稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.1 後再培養到 OD₆₀₀ 為 0.3 (早期對數期)。勝任細胞的製備須全程在冰上操作。於 4 °C 以 4000 rpm 離心 10 分鐘將 GAS 沉澱下來，以 25 ml 含 0.625 M sucrose (Sigma, Cat#S1888) 的 ddH₂O 清洗兩次後，再分別以 15 ml 和 10 ml 含 0.625 M sucrose 的 ddH₂O 清洗一次。最後將 GAS 回溶在 300 μl 含 10 % glycerol (Sigma, Cat#5516) 的 ddH₂O 中。

取 50 μl 勝任細胞與 2 μg 的質體混勻後，轉移至 1 mm gap Electroporation cuvette Plus (BTX, Cat#Model No.610)，再使用 BTX/Harvard Apparatus ECM 630

Exponential Decay Wave Electroporation System (BTX) 以 $400\ \Omega$ 、 $25\ \mu\text{F}$ 、 $1.75\ \text{kV}$ 電擊細胞。將電擊後的細胞回溶於 2 ml 的 THY 中，在 $30\ ^\circ\text{C}$ 培養 2 小時。再把菌液均勻塗在含 $2\ \mu\text{g/ml}$ 之 erythromycin (erm2) 的 THA (THB + 1.5% Agar) (THA/erm2)，於 $30\ ^\circ\text{C}$ 培養進行篩選。

5. 同源置換 (Homologous recombination)

將 THA/erm2 長出的 GAS 培養於 THY/erm5 中，置於 $37\ ^\circ\text{C}$ 生長，等待 GAS 與質體發生同源置換，再以 PCR 確認已發生單點交換。挑選已發生單點交換的菌株在 $30\ ^\circ\text{C}$ 培養於 THY 中，每 5 代塗盤一次並挑選單一菌落分別培養於 THY 和 THY/erm5 中，篩選出只能生長於 THY 之發生雙點交換的 GAS，再以 PCR 確認是否為 *spy0116* 剔除的菌株。

6. 預先結合 GAS 與 haptoglobin

用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD_{600} 為 0.1 後，培養到 OD_{600} 為 0.4 (對數期)，再以 PBS (phosphate buffered saline) 清洗 GAS。取 2×10^8 的 GAS 回溶於 $100\ \mu\text{l}$ 含有 $1\ \text{mg/ml}$ 之 haptoglobin 的 ddH_2O 中，於 $37\ ^\circ\text{C}$ 反應 15 分鐘，每五分鐘輕拍微量離心管使細菌能與 haptoglobin 反應均勻。不與 haptoglobin 結合的菌則回溶於 PBS 中，其餘處理皆相同。

7. 預先使用唾液酸酶處理 GBS

用 THY 將培養隔夜的 GBS 稀釋至 OD_{600} 為 0.1 後，培養到 OD_{600} 為 0.4，再以 PBS 清洗 GBS。將 GBS 回溶於 $100\ \text{mM}$ sodium acetate (pH 5.5) 溶液中，並調整為 6×10^8 CFU/ml，再加入 $100\ \text{mU/ml}$ 的 Sialidase from *Arthrobacter ureafaciens* (AUS)，於 $37\ ^\circ\text{C}$ 旋轉反應 3 小時。反應過後以 PBS 清洗一次，再回溶於 RPMI+10% FBS 中。



8. GAS 與血清中之 haptoglobin 結合試驗

用 THY 將培養隔夜的 GBS 稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.1 後，培養到 OD₆₀₀ 為 0.4，再以 PBS 清洗 GBS。取 2×10^8 的 GAS 回溶於 125 μ l RPMI 或是以 RPMI 稀釋過的 10% 或 50% 血清當中，於 37°C 旋轉反應 15 分鐘。反應後以 RPMI 清洗兩次後，將 GAS 回溶於 PBS 中並加入 6X sample dye。配製 10% running gel 以及 15% stacking gel 進行 sodium dodecyl sulfate polyacryl-amide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 來分離蛋白樣品，再將蛋白轉染至 Immobilon-FL PVDF membrane (Millipore, Cat#IPFL00010) 上。以等體積的 PBS 與 Odyssey blocking buffer (LI-COR, Cat#927-40000) 配製 blocking buffer 後，將 blocking buffer 與膜在室溫反應 1 小時，再以含有 0.1% Tween 20 及 Haptoglobin antibody (1:2000 稀釋) 之 blocking buffer 與膜在 4°C 雜交反應過夜。隔日以 PBST (含有 0.1% Tween 20 之 PBS) 清洗 3 次，再以含有 0.1% Tween 20、0.02% SDS 及二級抗體 Donkey anti-Rabbit 之 blocking buffer 與膜在室溫避光反應 1 小時。反應完以 PBST 清洗 3 次後，再以含有 0.02% SDS 的 ddH₂O 清洗 1 次，將膜置於 PBS 中保存再以 LI-COR Odyssey Infrared Imaging System 掃描膜。

9. 流式細胞儀分析與流式細胞分選

依照實驗需求使用 FACS Calibur (BD) 或 LSR Fortessa (BD) 流式細胞分析儀進行分析，細胞分選則使用 FACS Aria IIIu (BD)。

(1) 確認 T4 表現量

用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.1 後，培養到 OD₆₀₀ 為 0.4，再以 PBS 清洗兩次，並回溶於 PBS 中。在尖底 96 孔盤中加入 5×10^7 CFU/100 μ l 的 GAS 和 2 μ l 的 anti-T4 抗體，於 4°C 反應 20 分鐘。反應後用 1% 的 BSA (bovine serum albumin) (Sigma, Cat#A7906)/PBS 清洗兩次後，回溶於 100 μ l 之 1000 倍 1



% 的 BSA/PBS 稀釋的 goat anti-rabbit AF647 抗體中，於 4 °C 反應 20 分鐘。1 % 的 BSA/PBS 清洗兩次後，回溶在 500 μ l PBS 以 FACS Calibur 流式細胞分析儀分析。

(2) GAS 與不同蛋白結合能力之分析

依照 Dylight 488 Microscale Antibody Labeling kit (Thermo, Cat#53025) 的說明分別在 haptoglobin (MyBioSource, Cat#MBS135642) 以及 human serum albumin (HSA) (Sigma, Cat#A3782) 加上螢光標記。用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.1 後，培養到 OD₆₀₀ 為 0.4，再以 PBS 清洗生長靜止期和對數期的 GAS 兩次，並回溶於 PBS 中。在尖底 96 孔盤中加入 5X10⁷ CFU/100 μ l 的 GAS 和 10 μ l 帶有螢光標記的 haptoglobin 或 HSA，於 4 °C 反應 20-30 分鐘。反應後用 PBS 清洗 2 次後，回溶於 500 μ l 之 PBS 中，以 FACS Calibur 流式細胞分析儀分析。

(3) 補體沉積試驗

將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 Hepes++/0.1 % BSA (Hepes++ 含有 20 mM 的 Hepes (Hyclone, Cat#SH30237)、5 mM 的 CaCl₂、2.5 mM 的 MgCl₂、140 mM 的 NaCl, pH 7.3) 清洗一次後，回溶於 Hepes++ 中。以 Hepes++ 分別稀釋 normal human serum (NHS) 和 heat inactivated serum (HIS) 後，與菌液等體積混和，於 37 °C 水浴槽中反應 20-30 分鐘。反應完後，以 1 ml 的 1 % BSA/PBS 清洗一次，加入 100 μ l 以 1 % BSA/PBS 稀釋 500 倍之 goat-anti-human C3-FITC (MP Biomedicals, Cat#885191) 於 4 °C 反應 30 分鐘。反應完後，以 1 ml 的 1 % BSA/PBS 清洗，再回溶於 1 ml 的 PBS 中以 FACS Calibur 流式細胞分析儀分析。

(4) 抗菌肽結合試驗

將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 PBS 清洗兩次後，回溶於 PBS 中。取 5X10⁷ CFU/100 μ l 的 GAS 與 1 μ g 之 5-FAM-LC-LL-37 均勻混合，在 4 °C 反應 30 分鐘。反應完後以 PBS 清洗兩次，再回溶於 500 μ l 的 PBS 中以 FACS Calibur 流式細胞分析儀分析。



(5) Poly-L-lysine (多聚離胺酸) 結合試驗

用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.1 後，培養到 OD₆₀₀ 為 0.4，再以 PBS 清洗兩次，並回溶於 PBS 中。在尖底 96 孔盤中加入 5X10⁷ CFU/100 μl 的 GAS 和 5 μg Poly-L-lysine-FITC labeled (PLL) (Sigma, Cat#P3069) (stock 濃度為 10mg/ml，回溶在 ddH₂O)，於 4 °C 反應 20-30 分鐘。反應後用 PBS 清洗 2 次後，回溶於 500 μl 之 PBS 中，以 FACS Calibur 流式細胞分析儀分析。

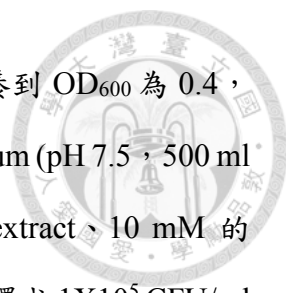
(6) 細胞分選 (sorting)

使用 DPBS 將欲進行分選的細胞清洗一次，加入 0.25 % trypsin-EDTA (Corning, Cat#25200056) 反應 5 分鐘，再加入培養液將細胞從培養皿上打下來並計算細胞數。細胞離心後回溶於 sorting buffer (sorting buffer 為 1X PBS 中加入 1 mM EDTA、25 mM HEPES 和 1 % FBS，pH 值為 7.0) 中，調整細胞濃度至 2X10⁷ cells/ml。將細胞加入 5mL Sterile Polystyrene Round Bottom Test Tubes With Cell Strainer Cap (Falcon, Cat#352235) 過濾掉細胞團塊，插冰上保存再以 FACS Aria IIIu 分選出帶有 mCherry 螢光的細胞。

(7) 確認 RAW 細胞之 Siglec-9 表現量

將 RAW 264.7 細胞於 24 孔盤中培養兩天。PBS 清洗一次，再加入 1 ml 含有 5 mM EDTA 的 PBS 於 37 °C 反應 5 分鐘，反應後將細胞打下並轉移至微量離心管中。以 1 ml FACS buffer (含有 1 % FBS 及 0.1 % NaN₃ 之 PBS) 清洗一次後，將細胞回溶於 50 μl FACS buffer 中，加入 2 μl Purified anti-mouse CD16/32 Antibody 在 4 °C 反應 10 分鐘把細胞表面上的 Fc 受器擋住。接著直接加入 3 μl APC Mouse IgG1, κ Isotype Ctrl (FC) Antibody 或 APC anti-human Siglec-9 antibody 於 4 °C 反應 20 分鐘，再以 1 ml FACS buffer 清洗兩遍。清洗後將細胞回溶於 500 μl FACS buffer，再以 LSR Fortessa 流式細胞儀分析。

10. 生物膜 (biofilm) 生成試驗



將 GAS 隔夜培養於 THY 中，稀釋至 OD_{600} 為 0.1 後再培養到 OD_{600} 為 0.4，以 PBS 清洗一次之後，回溶於含有 30 mM 之 glucose 的 C medium (pH 7.5, 500 ml 的 C medium 含有 0.5 % 的 proteose peptone、1.5% 的 yeast extract、10 mM 的 K_2HPO_4 、0.4 mM 的 $MgSO_4$ 和 17 mM 的 NaCl) 中，並且將菌液稀釋成 1×10^5 CFU/ml 或 1×10^6 CFU/ml，取 100 μ l 的菌液加入 96 孔盤 (Falcon, Cat#353072) 中，在 37 °C 培養箱培養。72 小時後倒掉多餘的培養液，用 PBS 清洗兩次後將液體倒乾淨。加入 125 μ l 之甲醇 (Sigma, Cat#32213) 固定生物膜，10 秒後倒掉並陰乾 96 孔盤。96 孔盤陰乾後，加入 125 μ l 的 0.2 % 結晶紫 (Sigma, Cat#C0775) 於室溫染色 15 分鐘，再以 PBS 清洗兩次並將孔盤內的液體完全吸乾。最後加入 125 μ l 的 1 % Sodium dodecyl sulfate (Sigma, Cat#75746) 反應 10 分鐘將結晶紫溶出後，測量 OD_{540} 。

11. 全血殺菌試驗

用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD_{600} 為 0.1 後，培養到 OD_{600} 為 0.4。使用 PBS 清洗一次後，將 GAS 回溶於 PBS 中並稀釋至 2×10^6 CFU/ml。將捐獻者的全血加入含有 heparin 的採血管後，分裝 450 μ l 的全血到 2 ml 微量離心管中，裝在試管混合器於 37 °C 混勻。10 分鐘後將 50 μ l 的菌液加入 2 ml 微量離心管中混合均勻，並分別在 0 和 120 分鐘的時候取出來滴種在 THA 上計算菌數。

12. 血清與血漿殺菌試驗

將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 PBS 和 RPMI 清洗一次後，回溶於 RPMI 中並調整濃度為 2×10^4 CFU/ml。在沒有 coating 的 96 孔盤中加入等量的 GAS 以及血清或血漿於 37 °C 反應。二小時後取出，滴種於 THA 上計算菌數。



13. 血小板殺菌試驗

使用 19 或 21 G 的針搭配針筒抽取捐獻者的血後，以 1:6 體積比混合與 Citrate-dextrose solution (ACD) (Sigma, Cat#C3821) 與血液後，以 1000 rpm 離心 15 分鐘 (no brake)。取出上層的富血小板血漿 (platelet rich plasma, PRP) 以 1500 rpm 離心 15 分鐘 (no brake)。去除上清液後，將血小板回溶於 RPMI 後以血球計數器計算血小板的數量，調整成 1×10^8 platelets/ml。將血小板靜置 20-30 分鐘後再使用。

將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 PBS 和 RPMI 清洗一次後，回溶於 RPMI 中並調整濃度為 1×10^6 CFU/ml。在沒有 coating 的 96 孔盤中加入 100 μ l 的 GAS 以及 100 μ l 的血小板於 37 °C、5% CO₂ 的培養箱反應。分別在一和二小時的時候取出，滴種於 THA 上。

14. 抗菌肽抑菌試驗

將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 PBS 和 DMEM (Hyclone, Cat#SH30022) 清洗一次後，回溶於 DMEM+20 % THY 中並調整濃度為 1×10^5 CFU/ml。在沒有 coating 的 96 孔盤中加入 90 μ l 的 GAS 以及 10 μ l 序列稀釋過後的 LL-37 或 CRAMP (stock 濃度為 640 μ M) 於 37 °C 反應。24 小時後，取出 96 孔盤觀察 DMEM + 20% THY 顏色的變化並塗盤觀察 GAS 的 MIC (Minimal inhibitory concentration, 最小抑制生長濃度)。

15. 組織蛋白抑菌試驗

用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.1 後，培養到 OD₆₀₀ 為 0.4，再以 PBS 和 RPMI 清洗一次後，回溶於 RPMI+5 % THY 中並調整濃度為 1×10^5 CFU/ml。在沒有 coating 的 96 孔盤中加入 90 μ l 的 GAS 以及 10 μ l 序列稀釋過後的組織蛋白 (stock 濃度為 10 mg/ml) 於 37 °C 反應。24 小時後，取出 96 孔盤觀察 RPMI+5 % THY 顏色的變化並塗盤觀察 GAS 的 MIC。



16. 嗜中性白血球殺菌試驗

將捐獻者的全血加入含有 heparin 的採血管混勻，再將全血緩慢加到與全血等量之 Polymorphprep (Axis-Shield, Cat#1114683) 的上方，以 1600 rpm 離心 30 分鐘 (no brake)。吸除不需要的血漿和單核球後，將多形核白血球 (多數為嗜中性白血球) 取出轉移至新的離心管中，加入 DPBS 清洗並以 1800 rpm 離心 10 分鐘。去除上清液後，加入 ddH₂O 將多餘的紅血球裂解，再加入 DPBS 清洗一次，並視情況增加一次 ddH₂O 裂解的步驟。最後將嗜中性白血球回溶於含有 2% FBS 的 RPMI 中計算細胞數目，再將細胞濃度調整為 2×10^6 cells/ml。每 2×10^6 的細胞加入 8 μ g 的 mouse IgG1 或是 anti-Siglec-9 阻斷抗體，於 37 °C 培養箱中旋轉反應 15 分鐘。反應後以 RPMI+2% FBS 清洗一次。

將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 PBS 和 RPMI+2% FBS 清洗一次後，回溶於 RPMI+2% FBS 並調整濃度為 2×10^6 CFU/ml 和 1×10^7 CFU/ml。取 100 μ l 的細胞和 100 μ l 的 GAS 置於 96 孔盤中，以 1200 rpm 離心 5 分鐘。將 96 孔盤放置於 37 °C 培養箱中培養 2 小時後，取出滴種於 THA 上計算菌數。

17. NETs 殺菌試驗

將分離自健康捐獻者之嗜中性白血球細胞回溶於 RPMI 中，調整細胞濃度成 2×10^6 cells/ml 並加入 25 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)，在 96 孔盤中每孔加入 100 μ l 的細胞，於含有 5% CO₂ 的 37 °C 培養箱中培養 4 小時，使嗜中性細胞形成 NETs。將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 PBS 和 RPMI+4% FBS (70 °C heat-inactivated) 清洗一次後，回溶於 RPMI+4% FBS (70 °C heat-inactivated) 並調整濃度為 2×10^5 CFU/ml。在 96 孔盤中加入 100 μ l 的 GAS 後，以 1600 rpm 離心 5 分鐘，再將 96 孔盤置於 37 °C 培養箱中培養。



30 或 60 分鐘後加入最後濃度為 100 U/ml 的 DNase I ，於 37 °C 培養箱反應 10 分鐘將 NETs 分解掉，再加入 5 mM EDTA 終止 DNase I 的作用。取出液體以 PBS 序列稀釋後，滴種於 THA 上計算存活的菌數。

18. 細胞感染之基因表現量測定

(1) RAW 細胞

實驗前 2 天將 1×10^6 顆細胞種在 6 孔盤中，以 PBS 清洗一次後加入 1×10^7 CFU/ml 的 GBS，再以 1500 rpm 離心 5 分鐘。於含 5 % CO₂ 的 37 °C 培養箱培養 1 小時後萃取細胞 RNA。

(2) THP-1 細胞

實驗當天以 PBS 清洗細胞一次後，將細胞回溶於 RPMI+2 % FBS 中，並將細胞濃度調整為 $5 \times 10^6/500 \mu\text{l}$ 。將事先與 haptoglobin 結合的 GAS 以及沒有與 haptoglobin 結合的 GAS 以 PBS 和 RPMI+2 % FBS 清洗一次後，回溶於 RPMI+2 % FBS 並調整濃度為 5×10^7 CFU/500 μl 。於 2 ml 微量離心管中加入 500 μl 的細胞和 500 μl 的 GAS 後，在 37 °C 旋轉反應 1 小時。反應時間到後萃取細胞的 RNA。

將細胞 RNA 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa, Cat#RR037A) 的說明書將 RNA 反轉錄成 complementary DNA (cDNA)，反轉錄好的 cDNA 以 ddH₂O 稀釋 10 倍保存。於 BIO-RAD 的 96 孔盤中加入 4 μl 1 μM forward primer、4 μl 1 μM reverse primer、2 μl cDNA 和 10 μl iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD, Cat#1708884)，以 3000 rpm 離心 1 分鐘。將 96 孔盤置於 C1000 Touch™ Thermal Cycler (BIO-RAD) 以 CFX96™ Real-Time System (BIO-RAD) 測定細胞 RNA 表現量。Real-time PCR 之反應條件為 95 °C 3 分鐘、95 °C 3 秒、60 °C 1 分鐘，共 35 cycles。反應完成後數據會和 hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) 基因的表現量做比較，經軟體計算後呈現基因的相對表現量。



19. RAW 細胞之細胞激素表現量測定

實驗前 2 天將 5×10^4 顆細胞種在 96 孔盤中，實驗前將細胞培養液更換為新鮮的細胞培養液。用 THY 將培養隔夜的 GAS 或 GBS 稀釋至 OD_{600} 為 0.1 後，培養到 OD_{600} 為 0.4，再以 PBS 和 RPMI+10 % FBS 清洗一次後，回溶於 RPMI + 10 % FBS 中並調整濃度。在 96 孔盤中每孔加入 100 μ l 的 1.5×10^6 CFU/ml 或 5×10^6 CFU/ml 的 GAS 或 GBS，以 1500 rpm 離心 5 分鐘後，將 96 孔盤放回含 5 % CO_2 的 37 °C 培養箱。30 分鐘後加入 50 μ l 的 5 倍抗生素 (含 50 μ g/ml gentamycin 和 25 μ g/ml penicillin 的細胞培養液)，放回含 5 % CO_2 的 37 °C 培養箱繼續培養，總共培養 3 或 24 小時。3 或 24 小時後將上清液轉移至 U 底 96 孔盤以 3000 rpm 離心 5 分鐘，再將離心後的上清液轉移至平底 96 孔盤放 -80 °C 保存，之後再以酵素免疫分析法分析細胞激素的表現量，詳細步驟參考 kit 說明書。

20. RAW 細胞之殺菌試驗

實驗前 2 天將 2.5×10^5 顆細胞種在 24 孔盤中，實驗前將細胞培養液更換為新鮮的 400 μ l 細胞培養液。用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD_{600} 為 0.1 後，培養到 OD_{600} 為 0.4，再以 PBS 和 RPMI+1 % FBS 清洗一次後，回溶於 RPMI+1 % FBS 中並調整濃度。每孔加入 100 μ l 的 2.5×10^6 CFU/ml 的 GAS，以 1500 rpm 離心 5 分鐘後，將 24 孔盤放回含 5 % CO_2 的 37 °C 培養箱培養。2 小時後取出 24 孔盤，加入 50 μ l 0.6 % Triton X-100/PBS 裂解細胞，再滴種於 THA 上計算 GAS 的存活率。

21. 細胞壁萃取物之分析

(1) 萃取細胞壁

用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD_{600} 為 0.1 後，培養到 OD_{600} 為 0.4，以 PBS 清洗一次後，並將 GAS 調整至同一濃度。以 3000 rpm 離心 5 分鐘後，將 GAS



回溶於冰的 cell wall extract buffer 中，於 37°C 搖晃反應 3 小時。3 小時後以 13000g 離心 15 分鐘，將上清液保存於 -80 °C。

(2) 西方墨點法 (Western blot) 分析

依照使用說明配製梯度膠 (gradient gel) (F1 Western, Cat#F1GRAD500) 以及 15 % stacking gel 進行 SDS-PAGE 來分離蛋白樣品，再將蛋白轉染至 Immobilon-FL PVDF membrane 上。以等體積的 PBS 與 Odyssey blocking buffer 配製 blocking buffer 後，將 blocking buffer 與膜在室溫反應 1 小時，再以含有 0.1 % Tween 20 及 anti-T4 (1:500 稀釋) 之 blocking buffer 與膜在 4 °C 雜交反應過夜。隔日以 PBST 清洗 3 次，再以含有 0.1 % Tween 20、0.02 % SDS 及二級抗體 Donkey anti-Rabbit 之 blocking buffer 與膜在室溫避光反應 1 小時。反應完以 PBST 清洗 3 次後，再以含有 0.02 % SDS 的 ddH₂O 清洗 1 次，將膜置於 PBS 中保存再以 LI-COR Odyssey Infrared Imaging System 掃描膜。

(3) 銀染 (silver stain)

依照使用說明配製梯度膠以及 15 % stacking gel 進行 SDS-PAGE 來分離蛋白樣品，再以 ddH₂O 搖晃清洗膠體 10 分鐘 2 次。接著加入 fixative solution 於室溫搖晃反應 30 分鐘。反應後倒掉 fixative solution，以 ddH₂O 搖晃清洗膠體 10 分鐘 2 次後，加入 staining solution，於室溫搖晃反應。膠體呈色後立刻倒掉 staining solution，加入 stop solution 於室溫搖晃反應 15 分鐘。ddH₂O 搖晃清洗膠體 5 分鐘後，將膠體置於 ddH₂O 中保存再使用 Bio-Rad ChemiDoc Imaging System 照膠。

22. 小鼠皮下感染

實驗使用的動物模型為六週大的 ICR 雌鼠，來源為台大醫學院動物中心繁殖組。感染兩天前將小鼠下背的毛剃光，再以除毛膏去處多餘的毛根。感染當天先用 THY 將培養隔夜的 GAS 稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.1 後，培養到 OD₆₀₀ 為 0.4。以 4000 rpm 離心十分鐘，再用 10 ml 的 DPBS 清洗一次，將 GAS 回溶於 1300 μl 的 DPBS。將

GAS 稀釋為 1×10^{10} 、 4×10^9 和 2×10^9 CFU/ml，再使用胰島素針 (BD, Cat#326769) 吸取 50 μ l 的菌液，以皮下注射的方式感染小鼠的下背。感染期間每天拍照紀錄。

感染第三天時以 CO₂ 麻醉機犧牲小鼠，剪下感染的傷口，放進 10% 之福馬林固定。固定完成後使用石蠟包埋組織，切片後使用 H&E 染色 (hematoxylin and eosin stain) 的方式染切片，再使用顯微鏡觀察切片。

感染第五天時以 isoflurane 犧牲小鼠。事前先準備好研磨組織用的研磨管 (BioSpec, Cat#10832)，裡面加入適量的 1 mm 震盪珠 (BioSpec, Cat#1107911 0z) 和 1 ml 的 DPBS。剪下小鼠的傷口並裝進研磨管中，由組織均質機 (Roche, MagNaLyser) 以 6000 rpm 震盪三次，每次三十秒。研磨完後，吸取部分上清液滴種於 THA 上以計算傷口上的菌量。剩餘的上清液以 15000 rpm 在 4°C 離心十分鐘後，再取出的上清液並使用酵素免疫分析法依照說明書分析細胞激素的濃度。

23. RAW/vector、RAW/Sig9、RAW/R120K 細胞株的建立

(1) 挑選基因敲入成功之細胞株

使用 Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) / Cas9 的系統將特定基因敲入 RAW 264.7 細胞基因組中，建立當作控制組的 RAW/vector 細胞以及表現人類 Siglec-9 的 RAW/Sig9 細胞。首先，用 Neon Transfection System (Thermo) 將質體 (pX330-ROSA26 sgRNA1 和 pROSA26-Vector CAG promoter / pROSA26-pCAG-hSiglec9) 送入 RAW 264.7 細胞中，並將電過的細胞置於 6 孔盤中培養。將細胞逐步放大並培養超過三星期後，以 FACS Aria IIIu 進行第一次的細胞分選。將會表現 mCherry 的細胞分選出來，收集於含有 1X Penicillin-Streptomycin (Corning, Cat#30-002-CI) 的培養液中，再培養於 24 孔盤，待細胞長滿後全部轉移至 6 孔盤中培養。待 6 孔盤中的細胞長滿，再進行單一細胞分選，並將分選出的單一細胞直接培養於 96 孔盤中，每一孔分入 1 或 2 顆細胞。等 96 孔盤中的細胞長成聚落時，便將之轉移至 24 孔盤中培養，原 96 孔盤加入培養液繼續培養。24 孔

盤中的細胞長滿後，將細胞收集下來萃取 gDNA 進行 PCR，確認質體的特定片段是否已敲入基因組 chromosome 6 GRCm38.p4 上。

(2) 細胞株表現型的確認

先前的研究知道了在 RAW 264.7 細胞表現 Siglec-9 能夠抑制 TLRs 誘發之 TNF- α 表現並能夠促進 IL-10 的生成，且過去有研究發現 GBS 的多醣莢膜能夠與 Siglec-E 結合去調節細胞反應，因此我們將經 PCR 確認過的細胞以 GBS 感染，再測其 TNF- α 、IL-6 和 IL-10 的基因及蛋白表現量來確認挑選出之細胞株的表現型。

第三章、研究結果



一、建立 M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株和臨床分離 M4 血清型 A 型鏈球菌之 $\Delta spy0116$ 突變株

1. 建立 M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株並確認其表現

研究指出 GAS 的線毛能幫助其貼附到宿主細胞，而生物膜成的第一步即為細菌的貼附⁷¹，因此細菌的貼附能力還會影響到生物膜的生成。實驗室先前比對基因序列後發現 *spy0116* 基因所轉錄出的蛋白是組成線毛的基幹蛋白，從前人的研究也確認了 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株貼附到咽喉及上皮細胞的能力較差且生物膜生成量顯著低於 M4 GAS 野生株。實驗室先前的研究結果已知剔除 *spy0116* 基因不會影響到其他 FCT region 之共轉錄基因的表現，但為了確認實驗室之前觀察到的 A 型鏈球菌野生株與 $\Delta spy0116$ 突變株之間的差異是因為剔除 *spy0116* 基因所造成的，我們將一會表現 *spy0116* 基因 (附錄一) 的質體送入 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株，建立 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株 (簡稱 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$)。另外還建立了帶有空的質體的 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株做為控制組 (簡稱 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$)。

為了確認建立的 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 能表現線毛，我們以 T4 抗原表現量、與 Hp 結合的能力和生物膜的生成量來確認 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 和 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 的表現型。以 T4 抗體染色的結果顯示 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 的 T4 抗原表現量、與 Hp 的結合量和生物膜的生成量皆顯著高於 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ (圖一 A、B 和 C)，顯示剔除 *spy0116* 基因所觀察到之現象的確是由 *spy0116* 所調控，而非影響到其他基因造成的。除了以流式細胞儀分析之外，我們將 M4 GAS 的細胞壁萃取下來，並以 western blot 分析其中的蛋白，圖一 D 為 anti-T4 抗體與膜雜交反應後的結果，顯示 M4 GAS 野生株的細胞壁上有包含 T4 抗原之高分子結構，而 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株則無。此外 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 與 M4 GAS $\Delta spy0116$ 相同，沒有包含 T4 抗原之高分子結構，而 M4 GAS $\Delta spy0116$



+ *spy0116* 則會形成包含 T4 抗原之高分子結構，顯示此 complement strain 確實能表現線毛。

2. 建立剔除 *spy0116* 的臨床分離菌株並確認其表現型

為了確認目前實驗所觀察到的現象亦可在的台灣的 M4 GAS 之臨床分離菌株觀察到，我們從長庚兒童內科部邱政洵主任實驗室取得了 25 株臨床分離的 A 型鏈球菌，進行臨床分離 A 型鏈球菌的 M protein 分型。實驗是藉由編碼 M protein 之 *emm* 基因的 5'端具有特異性的特性，使用不同的特異性引子與高度保留的 *isp* 基因的引子進行 PCR 分型⁷⁰。M1 和 M12 GAS 會得到大約 3 kb 的產物，M4 GAS 則會得到大約 5 kb 的產物。最後從這 25 株臨床分離的 A 型鏈球菌中找到了 2 株 M4 血清型、1 株 M12 血清型和 1 株 M1 血清型的 A 型鏈球菌，其餘臨床分離株血清型為未知 (圖二 A)。

以電穿孔作用將 pHY-0116 質體送入製備好的臨床分離株 3 號 (CG#3) GAS 勝任細胞後，開始利用抗生素進行篩選，再利用 PCR 確認 pHY-0116 質體確實與 GAS 發生同源置換。當 GAS 能在 37 °C 生長於 THY/erm5 時，表示質體已與 GAS 基因組發生單點置換。若質體是在 *spy0116* 上游與染色體發生交換，UpUp-For-*spy0116* 配 Cat-Rev 會得到 1529 bp 的產物，但是 DnDn-Rev-*spy0116* 配 Cat-For 不會得到產物；若質體是在 *spy0116* 下游與染色體發生交換，DnDn-Rev-*spy0116* 配 Cat-For 會得到 1475 bp 的產物，但 UpUp-For-*spy0116* 配 Cat-Rev 不會得到 1529 bp 的產物。挑選出已發生單點置換的 GAS 進行繼代後，再使用 PCR 找出發生雙點置換而剔除 *spy0116* 的菌株 (圖二 B)。若挑選出的 GAS 為 *spy0116* 剔除菌株，Cat-For 配 Cat-Rev 會得到 660 bp 的產物，UpUp-For-*spy0116* 配 DnDn-Rev-*spy0116* 可得到 2305 bp 的產物，For-PstI-*spy0116* 配 Rev-BglII-*spy0116* 則不會有產物；若挑選出的 GAS 不是 *spy0116* 剔除菌株，For-PstI-*spy0116* 配 Rev-BglII-*spy0116* 會得到 2160 bp 的產物，UpUp-For-*spy0116* 配 DnDn-Rev-*spy0116* 可得到 3805 bp 的產物，Cat-For



配 Cat-Rev 則不會有產物(表一和圖二 C)。

除了用 PCR 確認臨床分離的 M4 GAS 已經剔除 *spy0116* 基因之外，也利用 T4 抗體確認 GAS 的線毛表現量、與 Hp 的結合量以及生物膜的生成量輔助判斷 GAS 是否已剔除 *spy0116* 基因。而以流式細胞儀分析的結果顯示挑出的臨床分離 *spy0116* 突變株的 T4 表現量、與 Hp 的結合以及生物膜生成量都低於臨床分離野生株 (臨床分離 WT) (圖三 A、B 和 C)，表示我們已成功建立了臨床分離株 3 號之 *spy0116* 突變株 (臨床分離 Δ *spy0116* 突變株)。


先前實驗室的研究已經知道，將 GAS 以皮下注射的方式感染 ICR 小鼠，野生株能使小鼠產生較大的傷口，顯示 *in vivo* 下缺少 *spy0116* 確實會影響到 M4 GAS 的毒力，因此我們接著再使用皮下感染確認前述建立的臨床分離 Δ *spy0116* 突變株之毒力已下降。由圖三 D 可以看到臨床分離野生株確實會造成皮下感染的 ICR 小鼠有較大的傷口。但是組織切片的結果看起來臨床分離野生株和 Δ *spy0116* 突變株都沒有造成明顯的血球浸潤，且兩者的切片看起來沒有差別 (圖三 E)。而在第五天時收下小鼠的傷口測量其細胞激素 CCL2 和 KC 同樣可以看到臨床分離野生株和 Δ *spy0116* 突變株沒有差別 (圖三 F)。

二、線毛在 M4 血清型 A 型鏈球菌抵抗免疫系統之角色

1. 具線毛之 M4 血清型 A 型鏈球菌野生株在人類全血中存活較佳

實驗室先前的研究已知在全血中 M4 GAS 野生株的存活率比 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株高，因此我先重複實驗確認會表現線毛的 M4 GAS 野生株在全血中是否存活較好。實驗結果如圖四所示，與之前的研究結果相同在全血中 M4 GAS 野生株的存活率比 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株高，但詳細機制尚不清楚，因此接下來會針對血液中的各成分進行實驗以找出可能的機制。

2. 線毛不會增加 M4 血清型 A 型鏈球菌對補體、抗菌肽和組織蛋白的抗性



由於血清中含有許多抗菌物質，例如抗菌肽和補體，因此我先以 HIS (heat-inactivated serum)、NHS (normal human serum) 或血漿與 GAS 反應兩小時來比較 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株的存活率，想知道血清和血漿中的抗菌因子是否會造成 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株存活的差異。從實驗結果 (圖五 A) 可以看到 M4 GAS 野生株在 HIS 和 NHS 中皆比 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株存活還好，顯示補體可能不會影響 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株的存活。由於補體參與在抵抗病原菌入侵的第一道防線，其中的 C3 補體又對於整個補體路徑的活化很重要，因此想確認在血中 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株被 C3 補體標記的程度是否因 *spy0116* 基因之存在與否而受到影響，進而影響 M4 GAS 在血中的存活。使用流式細胞儀分析 C3 補體染色結果後可以看到 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株被 C3 補體標記的程度沒有差別 (圖五 B)，顯示 M4 GAS 有無表現線毛並不會影響到 C3 補體沉積的程度，因此 C3 補體沉積應不是影響 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株在血中存活的因素。

接著我們想知道 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株的抗菌肽 (MIC) 是否不同，因此我們將 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株分別與人類和老鼠的抗菌肽反應 24 小時後再塗盤觀察。從實驗結果 (表二) 可以看到 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株對於 LL-37 和 CRAMP 的抵抗力皆高於 M4 GAS 野生株。以流式細胞儀分析還可以看到 M4 GAS 野生株和 LL-37 會有較多的結合 (圖五 C)，我們推測這可能是造成 M4 GAS 野生株對於抗菌肽較敏感的原因。血清中的抗菌物質除了抗菌肽外，還包含了組織蛋白，先前研究已知組織蛋白具有殺菌的功能⁷²，因此我們將 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株與組織蛋白反應 24 小時後再塗盤觀察。實驗結果顯示 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株對於組織蛋白的抵抗力沒有差異 (表三)。以上結果皆顯示線毛本身無法幫助 M4 GAS 抵抗血清中的抗菌物質。



3. 線毛不影響 M4 血清型 A 型鏈球菌與 NETs 反應後之存活率

嗜中性白血球為人類血液中數量最多之白血球，且其為抵抗入侵之細菌的第一道防線。實驗室之前將 M4 GAS 與分離自人血的嗜中性白血球反應，結果顯示 M4 GAS 野生株只比 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株存活略多。嗜中性白血球的其中一項殺菌作用為吐出 NETs 來殺菌，因此我們接著將 M4 GAS 野生株和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株與 NETs 反應來看存活率是否有差異。從實驗結果 (圖六) 可以看到，M4 GAS 野生株和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株與 NETs 反應 30 分鐘後的存活率沒有差異，而反應 60 分鐘後 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株的存活率則高於 M4 GAS 野生株，顯示線毛無法幫助 M4 GAS 抵抗 NETs 的殺菌作用。

4. 線毛不影響 M4 血清型 A 型鏈球菌與血小板反應後之存活率沒有差別

由於血小板內含有陽離子蛋白 (cationic protein) 和活性氧化物質 (reactive oxygen species) 等殺菌物質⁷³，且血小板活化時可將殺菌物質釋放出來，因此我們接著想知道將 M4 GAS 野生株和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株與血小板反應是否會看到存活率有差異。從實驗結果 (圖七) 可以看到 M4 GAS 野生株和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株與血小板反應兩小時後的存活率沒有差異，顯示線毛無法幫助 M4 GAS 抵抗血小板的殺菌作用。

5. M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株和臨床分離之 M4 血清型

A 型鏈球菌野生株在人類全血中之存活率

為了確認線毛能夠幫助 M4 GAS 在血液中存活，因此以人類全血殺菌試驗來檢測 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 和 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 以及臨床分離野生株和臨床分離 $\Delta spy0116$ 突變株的存活率。實驗結果如圖八所示，M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 和 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 的存活率沒有差異，而臨床分離野生株和臨



床分離 $\Delta spy0116$ 突變株的存活率在不同捐獻者結果不同。Complement strain 和臨床分離菌株的全血殺菌試驗結果與實驗室的 M4 GAS 的實驗結果不同，但目前尚不清楚原因。

6. M4 血清型 A 型鏈球菌 $\Delta spy0116$ 突變株之互補菌株及控制組之 LL-37 結合能力沒有差別

以 M4 GAS 野生株和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株進行的實驗結果顯示線毛能幫助 M4 GAS 在血液中存活，但是 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 和 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 在血液中的存活率沒有差異。表二和圖五 C 顯示具有線毛的 M4 GAS 野生株對 LL-37 較敏感且其 LL-37 結合能力較佳，因此我們想知道過度表現線毛的 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 是否會與 LL-37 有較多的結合，進而影響其在血液中的存活。實驗結果如圖九所示，M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 和 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 與 LL-37 結合的能力沒有差別。

從上述實驗結果可以看到雖然 M4 GAS 野生株能在人類全血和血清中存活較好，但是不管是跟血清中的抗菌物質、NETs 或是血小板反應都不會有 M4 GAS 野生株存活較 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株好的現象。因此接下來將探討 M4 GAS 的線毛是否可利用其他血液中的成分來幫助其在血液中存活。

三、 M4 血清型 A 型鏈球菌利用線毛與血紅素結合蛋白結合來抵抗免疫系統攻擊

1. M4 血清型 A 型鏈球菌的線毛能與人類血清中之 haptoglobin 結合

由過去的研究我們推測 M4 GAS 可以利用線毛與血液中的 Hp 結合，來抑制免疫系統的反應，進而幫助其在血液中存活。因此我們首先以 *ex vivo* 的方式來確認 M4 GAS 確實能利用線毛與 Hp 結合。將 M4 GAS 野生株和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突

變株與人類血清反應 15 分鐘後離心下來，以 western blot 分析 M4 GAS 是否有與 Hp 結合。從圖十可以看到沒有與人類血清反應之 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ spy0116 突變株不會和 Hp 結合在一起，與人類血清反應後 M4 GAS 野生株能和 Hp 結合，但是與人類血清反應之 M4 GAS Δ spy0116 突變株則不會和 Hp 結合。

上述結果顯示 M4 GAS 的線毛確實能與人類血清中的 Hp 結合，因此接下來的實驗會將 M4 GAS 先與 Hp 反應 15 分鐘後再進行實驗。

2. 預先與 haptoglobin 結合能幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌在人類全血和血清中存活

首先從圖十一 A 可以看到 M4 GAS 野生株預先和 Hp 結合後能夠在全血中存活更好。另外如圖十一 B 所示，M4 GAS 野生株預先和 Hp 結合後在血清和血漿中的存活率也顯著提升了，而且 M4 GAS Δ spy0116 突變株預先與 Hp 反應並不會使其存活率提升，顯示只有 M4 GAS 野生株能夠藉由 Hp 來增加存活率。

3. Haptoglobin 無法幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌抵禦 C3 補體標記和抗菌肽

使用流式細胞儀分析染色結果後，可以看到 M4 GAS 野生株、M4 GAS 野生株+Hp 和 M4 GAS Δ spy0116 被 C3 補體標記的程度沒有差別 (圖十二 A)，顯示與 Hp 結合無法幫助 M4 GAS 野生株抵抗 C3 補體的標記。除此之外，將 M4 GAS 野生株、M4 GAS 野生株+Hp 和 M4 GAS Δ spy0116 分別與人類和老鼠的抗菌肽反應 24 小時後再塗盤觀察，可以看到 M4 GAS 野生株預先與 Hp 結合並不會明顯增加對於 LL-37 和 CRAMP 的抵抗力 (表二)。以流式細胞儀分析染色結果，顯示 M4 GAS 野生株預先與 Hp 結合並不會影響其與 LL-37 的結合 (圖十二 B)。由於 LL-37 為一帶正電的抗菌肽，而 M4 GAS 有無表現線毛會影響其與 LL-37 的結合，因此我們想知道是否是由於線毛會影響 M4 GAS 表面電荷所造成的。我們以帶正

電的 PLL 進行染色再以流式細胞儀分析，結果顯示 M4 GAS 野生株和 M4 GAS Δ spy0116 突變株與 PLL 結合的程度沒有差別 (圖十二 C)，表示線毛並不會影響 M4 GAS 表面的電荷，且線毛與 LL-37 的結合並不是藉由電荷吸引所造成的。

4. 預先與 haptoglobin 結合能幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌抵抗 NETs 和血小板的殺菌作用

接著我們想知道 Hp 是否能幫助 M4 GAS 抵抗 NETs 和血小板的殺菌作用，因此我們將預先與 Hp 反應的 M4 GAS 與 NETs 或血小板反應，再塗盤觀察存活率。由圖十三 A 和 B 可以看到，M4 GAS 野生株預先與 Hp 結合後再與 NETs 或血小板反應的存活率皆顯著提升了，而 M4 GAS Δ spy0116 突變株則無存活率改變的現象，再次確認 M4 GAS 是藉由線毛與 Hp 結合來幫助存活的。


由上述結果我們知道了 M4 GAS 可以利用線毛和 Hp 結合來幫助其在人類全血和血清中存活，但是 M4 GAS 有無線毛不會影響對抗菌肽的抗性和 C3 補體沉澱的程度，而是藉由與 Hp 結合來抵抗血清中其他抗菌物質以及 NETs 和血小板的殺菌作用來存活。

四、 M4 血清型 A 型鏈球菌與血紅素結合蛋白結合後，可能藉由與 Siglec-9 鍵結來調控免疫反應

由於 Hp 的 β 鏈有大量的唾液酸修飾⁶⁹，實驗室先前的實驗也確認了 Hp 能與 Siglec-9 結合，且預先和 Hp 結合的 M4 GAS 能和 Siglec-9 有較佳的結合。因此我們推測 M4 GAS 能藉由線毛與 Hp 結合，並透過 Hp 與 Siglec-9 結合來抑制免疫細胞的活性，進而幫助 M4 GAS 抵抗免疫攻擊並造成系統性感染。

1. 建立 RAW/vector 和 RAW/Sig9 細胞株

為了要驗證我們的假說，我們使用 CRISPR/Cas9 的系統建立 RAW/vector 和



RAW/Sig9 細胞株，將質體 (附錄二) 送入細胞後再使用流式細胞分選儀進行單一細胞分選 (single-cell sorting)，篩選出帶有 mCherry 螢光的細胞進行培養。分選之細胞經過培養放大後，萃取其 gDNA 以 PCR 確認質體是否嵌入基因組上的特定位置 (圖十四 A)。若質體已嵌入 RAW 264.7 細胞基因組之 Rosa26 前端使用 newUpUp-F 配 newCAG-R 可得到 1290 bp 的產物；若質體已嵌入 RAW 264.7 細胞基因組之 Rosa26 後端則可得到 1073 bp 的產物。除了使用 PCR 確認質體已嵌入基因組之外，我們還使用流式細胞儀分析細胞表面 Siglec-9 表現情形來確認是否有挑到可使用之細胞株 (表四、附錄三和附錄四)。由 PCR 分析挑出了 6 株質體有嵌入到 Rosa26 後端的細胞株，分別為 V D11、V D9、V E5、V F3、Sig9 E6 和 Sig9 G1，但其中只有 V D11 和 Sig9 E6 能夠以 PCR 分析到質體有嵌入到 Rosa26 前端 (附錄三)。以流式細胞儀分析細胞表面上 Siglec-9 表現情形則可看到只有 Sig9 E6 和 Sig9 G1 會表現 Siglec-9，V D11、V D9、V E5 和 V F3 則不會有 Siglec-9 表現。接著我們挑選了 mCherry 表現量較相近的 V E5、V F3、Sig9 E6 和 Sig9 G1 進行表現型確認 (附錄四)。

由文獻我們知道了 GBS 的多醣莢膜可以與 Siglec-E 結合進而去抑制細胞活化⁶⁴，因此我們以 GBS 做為模型來確認上述挑到之細胞的表現型。圖十三 B 可以看到 GBS 感染後 9X2 E6 相較於其他三株細胞所產生之 TNF- α 和 IL-10 皆較少，但從圖十四 C 可以看到其實 GBS 感染 1 小時後 Sig9 E6 的 TNF- α 基因表現和另外兩株細胞相當，IL-10 基因表現則明顯高於其他兩株細胞。除此之外，以 GBS WT 與 GBS Δ neuA 以及給予 AUS 處理為模型的結果顯示不管 GBS 表面是否有唾液酸，在控制組細胞和表現 Siglec-9 的細胞所引起的反應沒有差別。綜合細胞激素及基因表現的結果，我們認為 Sig9 E6 相較於其他細胞株的反應較不同，不適合做為實驗模型。最後我們選擇 V E5 做為 RAW/vector 細胞株；Sig9 G1 做為 RAW/Sig9 細胞株。

2. 與 haptoglobin 結合可增加 M4 血清型 A 型鏈球菌之存活率，但 RAW 細胞是否表現 Siglec-9 不影響 M4 血清型 A 型鏈球菌之存活

選定細胞株後，我們接著想知道 Siglec-9 的表現是否如我們預期影響到 M4 GAS 的存活率。從圖十五可以看到 M4 GAS 野生株事先與 Hp 結合能存活更好，但是不管是在 RAW/vector 或是 RAW/Sig9 都可以看到此現象，顯示在我們的 RAW/vector 和 RAW/Sig9 系統中無法看到 M4 GAS 野生株與 Hp 結合是利用 Siglec-9 來提升存活率的。除此之外，M4 GAS 野生株和 M4 GAS 野生株+Hp 與 V E5 或 Sig9 E6 反應後的存活率也沒有差異。

第四章、討論與未來研究方向

過去已發表之研究顯示 A 型鏈球菌造成的死亡人數在因感染性疾病而死亡的人數中排名在第九名⁵，意味著了解 A 型鏈球菌的致病機轉是很重要的。A 型鏈球菌有許多毒力因子可增加其貼附及入侵宿主細胞的能力或是幫助 A 型鏈球菌躲避免疫系統的攻擊²，其中的玻尿酸莢膜在過去研究被指出能幫助 A 型鏈球菌躲避免疫系統的攻擊，且缺少玻尿酸莢膜的 A 型鏈球菌毒力和存活率皆較差^{30,32}，顯示莢膜是 A 型鏈球菌一重要的毒力因子。而 M4 GAS 雖然沒有莢膜，在臨床上仍能造成侵入性疾病，並且是主要造成感染的血清型之一^{8,10}，因此我們想探討 M4 GAS 的致病機轉。實驗室先前的研究發現了線毛能夠幫助 M4 GAS 造成小鼠皮膚及系統性感染，並且提升 M4 GAS 在人血中的存活率，因此我們想進一步了解線毛是如何幫助 M4 GAS 造成感染的。實驗發現 M4 GAS 的線毛能夠與人類的 Hp 結合來提升其在人血中的存活率，且此為 M4 血清型特有的現象。除此之外，實驗室先前發現與 Hp 結合後的 M4 GAS 可和 Siglec-9 有較佳的結合，而 M4 GAS 與 Hp 的結合可能透過 Siglec-9 來調節細胞反應進而幫助其存活，我們推測這可能是 M4 GAS 雖然缺少莢膜卻仍能造成侵入性感染的致病機制。

先前實驗室學姐的研究發現雖然 FCT region 上的 *spy0115~spy0118* 基因是一起轉錄的，但是剔除 *spy0116* 基因不會影響到 *spy0117* 和 *spy0118* 基因的轉錄。除此之外，我們還建立了 M4 GAS Δ *spy0116* 突變株之互補菌株，且由 T4 抗原表現量和生物膜生成量確認了補回 *spy0116* 基因後 M4 GAS Δ *spy0116* + *spy0116* 便能夠表現線毛，再次確認剔除 *spy0116* 基因不會影響到 M4 GAS 其他基因 (圖一)。接著發現雖然線毛能幫助 M4 GAS 在人類全血和血清中存活(圖四和圖五 A)，但將 M4 GAS 與單獨與血液中的抗菌肽、組織蛋白、NETs 和血小板各別反應並不會看到線毛有幫助 M4 GAS 存活的情形 (表二、表三、圖六和圖七)。而由文獻和實驗室前人的研究我們得知 M4 GAS 之線毛可以和 Hp 結合^{21,40}，又過去文獻指出 Hp 能夠和多種免疫細胞的接受器結合來調節免疫反應³⁹，因此我

們推測 M4 GAS 或可透過線毛與 Hp 結合來調控宿主的免疫系統。從本篇實驗可以看到 M4 GAS 確實可與人類血清中的 Hp 結合，且 M4 GAS 與 Hp 結合後與全血、血清、血小板或 NETs 反應皆能有較佳之存活率 (圖十一、圖十二和圖十三)。

雖然以 M4 GAS 野生株和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 突變株進行的研究顯示線毛能夠提升 M4 GAS 在人類全血中之存活，但是將 *spy0116* 基因回補到 $\Delta spy0116$ 突變株後卻無法提升 $\Delta spy0116$ 突變株在全血中的存活率 (圖八)。之前研究顯示 GAS 轉錄因子的表現會受到細菌密度、環境中營養成分的多寡和血液中成分等因素影響，進而影響到 GAS 毒力因子的表現⁷⁴。研究發現細胞壁相關的毒力因子，例如 M protein、C5a 肽酶 (peptidase) 和莢膜，這些毒力因子的基因表現在對數期時最高，在生長靜止期時則不會表現。毒力因子在不同時期基因表現程度不同可能幫助 GAS 節省能量以渡過養分相對較少的生長靜止期，因此適當的基因表現是相當重要的⁷⁵。先前就有研究發現肺炎鏈球菌在剛開始移生 (colonization) 的時候會表現較多的線毛，顯示線毛表現的多寡和細菌的生長期有關⁷⁶。我們推測 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 可能因線毛過度表現反而無法幫助 $\Delta spy0116$ 突變株在全血中存活。由於使用 5-FAM-LL-37 染色顯示具有線毛的 M4 GAS 野生株會和 LL-37 有較多的結合 (圖五 C)，且 M4 GAS 野生株對於 LL-37 較為敏感 (表二)，因此我們也使用 5-FAM-LL-37 進行 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 染色。但是結果顯示與 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 相比，M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 不會與 5-FAM-LL-37 有較多結合 (圖九)，因此抗菌肽可能並不參與在回補 *spy0116* 基因無法提升 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 在血液中存活的因素。

另外，與實驗室的 M4 GAS 相比，臨床分離菌株的線毛表現量明顯較低，全血殺菌試驗的結果亦顯示該臨床菌株是否表現線毛並不是主要影響其在血液中存活的因素 (圖八)。先前有研究分析了臨床分離之 *Kingella kingae* 的線毛表現，發現從不同患部分離出之 *Kingella kingae* 的線毛表現量是不同的，從呼吸道和非心內膜炎之血液分離出的 *Kingella kingae* 通常有較高的線毛表現⁷⁷，顯示線毛表現的多寡也和細菌的組織向性有關。我們使用的實驗室 M4 GAS 是分離自病患

的血液，其有較高的線毛表現且線毛能幫助其在血液中存活，因此我們推測對於會造成侵入性感染的 M4 GAS 而言線毛是重要的致病因子。

過去研究顯示在 RAW 264.7 細胞過度表現 Siglec-9 能使細胞在受到 TLR 配體刺激時產生較少的 TNF- α 和 IL-6，但是產生較多的 IL-10⁶⁰。此外還有研究指出 M1 GAS 和 GBS 表面的唾液酸能藉由與人類 Siglec-9 或老鼠 Siglec-E 結合，影響細胞的殺菌機制並增加存活率^{64,65}。又先前報導發現 Hp 可調節免疫反應，且實驗室發現 Hp 能和 Siglec-9 結合，因此我們推測 M4 GAS 可藉由和 Hp 結合來鍵結免疫細胞面上的 Siglec-9 來抑制其活化以躲避免疫系統的攻擊，因此我們建立了會表現 Siglec-9 的 RAW 264.7 細胞以探討 M4 GAS 是否能夠透過 Siglec-9 來幫助存活。與預期不同的是，實驗結果顯示 M4 GAS 與 RAW/vector 或 RAW/Sig9 反應存活率沒有差別，且 M4 GAS 和 Hp 結合後不管是與 RAW/vector 或 RAW/Sig9 反應皆能存活較佳(圖十五)。過去有研究發現老鼠的 bone marrow-derived macrophages (BMDMs) 在受到 TLR 配體刺激時會造成 Siglec-E 表現量大幅上升，並且活化 Siglec-E⁷⁸。而我們以 GAS 感染細胞之後，並未檢測 RAW 細胞其他 Siglecs 的表現量，因此我們無法確定受到 GAS 刺激的細胞是否會表現其他的 Siglecs。若 RAW/vector 細胞有表現其他 Siglecs，可能會使得 Hp 與之結合並影響到細胞的反應，因此我們無法看到 M4 GAS WT 與 Hp 結合後可以在 RAW/Sig9 存活較好。

由於我們建立之細胞株無法用於觀察 Siglec-9 是否參與在 M4 GAS 線毛及 Hp 後對免疫細胞的調控，因此我們之後將會使用 anti-Siglec-9 的抗體事先將嗜中性白血球表面的 Siglec-9 阻斷後再使用 M4 GAS 感染，以確認 M4 GAS 與 Hp 結合後是否會如 GBS 和 M1 GAS 一般透過 Siglec-9 去影響嗜中性白血球的殺菌作用來幫助存活^{64 65}。此外我們也將檢測 M4 GAS 預先與 Hp 結合後，是否影響嗜中性白血球的 reactive oxygen species 或 NETs 生成以及嗜中性白血球的吞噬作用，來闡明 M4 GAS 在血液中存活的可能機制。

雖然尚不清楚 M4 GAS 與 Hp 結合後是否可透過 Siglec-9 來抑制細胞反應，

但是我們的結果能確定 M4 GAS 與 Hp 的結合能幫助其抵抗免疫系統的攻擊。



參考文獻



- 1 Patterson, M. J. in *Medical Microbiology* (eds Th & S. Baron) (1996).
- 2 Walker, M. J. *et al.* Disease manifestations and pathogenic mechanisms of Group A Streptococcus. *Clin Microbiol Rev* **27**, 264-301, doi:10.1128/CMR.00101-13 (2014).
- 3 Dale, J. B. *et al.* in *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations* (eds J. J. Ferretti, D. L. Stevens, & V. A. Fischetti) (2016).
- 4 Shulman, S. T. *et al.* Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **55**, e86-102, doi:10.1093/cid/cis629 (2012).
- 5 Carapetis, J. R., Steer, A. C., Mulholland, E. K. & Weber, M. The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* **5**, 685-694, doi:10.1016/S1473-3099(05)70267-X (2005).
- 6 Su, Y. F. *et al.* Changing epidemiology of Streptococcus pyogenes emm types and associated invasive and noninvasive infections in Southern Taiwan. *J Clin Microbiol* **47**, 2658-2661, doi:10.1128/JCM.01078-09 (2009).
- 7 Luk, E. Y. *et al.* Scarlet fever epidemic, Hong Kong, 2011. *Emerg Infect Dis* **18**, 1658-1661, doi:10.3201/eid1810.111900 (2012).
- 8 Whitehead, B. D., Smith, H. V. & Nourse, C. Invasive group A streptococcal disease in children in Queensland. *Epidemiol Infect* **139**, 623-628, doi:10.1017/S0950268810001378 (2011).
- 9 Turner, C. E. *et al.* Scarlet Fever Upsurge in England and Molecular-Genetic Analysis in North-West London, 2014. *Emerg Infect Dis* **22**, 1075-1078, doi:10.3201/eid2206.151726 (2016).
- 10 Steer, A. C., Law, I., Matatolu, L., Beall, B. W. & Carapetis, J. R. Global emm type distribution of group A streptococci: systematic review and implications for vaccine development. *Lancet Infect Dis* **9**, 611-616, doi:10.1016/S1473-3099(09)70178-1 (2009).
- 11 Facklam, R. F. *et al.* Extension of the Lancefield classification for group A streptococci by addition of 22 new M protein gene sequence types from clinical isolates: emm103 to emm124. *Clin Infect Dis* **34**, 28-38, doi:10.1086/324621 (2002).
- 12 Bessen, D. E. & Lizano, S. Tissue tropisms in group A streptococcal infections. *Future Microbiol* **5**, 623-638, doi:10.2217/fmb.10.28 (2010).
- 13 Metzgar, D. & Zampolli, A. The M protein of group A Streptococcus is a key virulence factor and a clinically relevant strain identification marker. *Virulence*

- 2, 402-412, doi:10.4161/viru.2.5.16342 (2011).
- 14 Bessen, D. E. Tissue tropisms in group A Streptococcus: what virulence factors distinguish pharyngitis from impetigo strains? *Curr Opin Infect Dis* **29**, 295-303, doi:10.1097/QCO.0000000000000262 (2016).
- 15 Bhakdi, S., Trantum-Jensen, J. & Sziegoleit, A. Mechanism of membrane damage by streptolysin-O. *Infect Immun* **47**, 52-60 (1985).
- 16 Molloy, E. M., Cotter, P. D., Hill, C., Mitchell, D. A. & Ross, R. P. Streptolysin S-like virulence factors: the continuing saga. *Nat Rev Microbiol* **9**, 670-681, doi:10.1038/nrmicro2624 (2011).
- 17 Terao, Y. *et al.* Fba, a novel fibronectin-binding protein from Streptococcus pyogenes, promotes bacterial entry into epithelial cells, and the fba gene is positively transcribed under the Mga regulator. *Mol Microbiol* **42**, 75-86 (2001).
- 18 Telford, J. L., Barocchi, M. A., Margarit, I., Rappuoli, R. & Grandi, G. Pili in gram-positive pathogens. *Nat Rev Microbiol* **4**, 509-519, doi:10.1038/nrmicro1443 (2006).
- 19 Mora, M. *et al.* Group A Streptococcus produce pilus-like structures containing protective antigens and Lancefield T antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 15641-15646, doi:10.1073/pnas.0507808102 (2005).
- 20 Kratovac, Z., Manoharan, A., Luo, F., Lizano, S. & Bessen, D. E. Population genetics and linkage analysis of loci within the FCT region of Streptococcus pyogenes. *J Bacteriol* **189**, 1299-1310, doi:10.1128/JB.01301-06 (2007).
- 21 Falugi, F. *et al.* Sequence variation in group A Streptococcus pili and association of pilus backbone types with lancefield T serotypes. *J Infect Dis* **198**, 1834-1841, doi:10.1086/593176 (2008).
- 22 Nakata, M. *et al.* Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region-encoded proteins in Streptococcus pyogenes serotype M49. *Infect Immun* **77**, 32-44, doi:10.1128/IAI.00772-08 (2009).
- 23 Crotty Alexander, L. E. *et al.* M1T1 group A streptococcal pili promote epithelial colonization but diminish systemic virulence through neutrophil extracellular entrapment. *J Mol Med (Berl)* **88**, 371-381, doi:10.1007/s00109-009-0566-9 (2010).
- 24 Becherelli, M. *et al.* The ancillary protein 1 of Streptococcus pyogenes FCT-1 pili mediates cell adhesion and biofilm formation through heterophilic as well as homophilic interactions. *Mol Microbiol* **83**, 1035-1047, doi:10.1111/j.1365-2958.2012.07987.x (2012).
- 25 Tsai, J. C., Loh, J. M., Clow, F., Lorenz, N. & Proft, T. The Group A Streptococcus serotype M2 pilus plays a role in host cell adhesion and immune evasion. *Mol Microbiol* **103**, 282-298, doi:10.1111/mmi.13556 (2017).

- 26 Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P. & Kolar, J. Hyaluronic acid (hyaluronan):
a review. *Veterinarni medicina* **53**, 397-411 (2008).
- 27 Crater, D. L. & van de Rijn, I. Hyaluronic acid synthesis operon (has) expression
in group A streptococci. *J Biol Chem* **270**, 18452-18458 (1995).
- 28 Kass, E. H. & Seastone, C. V. The Role of the Mucoïd Polysaccharide
(Hyaluronic Acid) in the Virulence of Group a Hemolytic Streptococci. *J Exp
Med* **79**, 319-330 (1944).
- 29 Foley, M. J. & Wood, W. B., Jr. Studies on the pathogenicity of group A
streptococci. II. The antiphagocytic effects of the M protein and the capsular gel.
J Exp Med **110**, 617-628 (1959).
- 30 Cole, J. N. *et al.* M protein and hyaluronic acid capsule are essential for in vivo
selection of covRS mutations characteristic of invasive serotype M1T1 group A
Streptococcus. *MBio* **1**, doi:10.1128/mBio.00191-10 (2010).
- 31 Schragar, H. M., Rheinwald, J. G. & Wessels, M. R. Hyaluronic acid capsule
and the role of streptococcal entry into keratinocytes in invasive skin infection.
J Clin Invest **98**, 1954-1958, doi:10.1172/JCI118998 (1996).
- 32 Wessels, M. R., Moses, A. E., Goldberg, J. B. & DiCesare, T. J. Hyaluronic acid
capsule is a virulence factor for mucoïd group A streptococci. *Proc Natl Acad
Sci U S A* **88**, 8317-8321 (1991).
- 33 Dinkla, K. *et al.* Upregulation of capsule enables Streptococcus pyogenes to
evade immune recognition by antigen-specific antibodies directed to the G-
related alpha2-macroglobulin-binding protein GRAB located on the bacterial
surface. *Microbes Infect* **9**, 922-931, doi:10.1016/j.micinf.2007.03.011 (2007).
- 34 Flores, A. R., Jewell, B. E., Fittipaldi, N., Beres, S. B. & Musser, J. M. Human
disease isolates of serotype m4 and m22 group a streptococcus lack genes
required for hyaluronic acid capsule biosynthesis. *MBio* **3**, e00413-00412,
doi:10.1128/mBio.00413-12 (2012).
- 35 Cray, C., Zaias, J. & Altman, N. H. Acute phase response in animals: a review.
Comp Med **59**, 517-526 (2009).
- 36 Gabay, C. & Kushner, I. Acute-phase proteins and other systemic responses to
inflammation. *N Engl J Med* **340**, 448-454,
doi:10.1056/NEJM199902113400607 (1999).
- 37 Gruys, E., Toussaint, M. J., Niewold, T. A. & Koopmans, S. J. Acute phase
reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B* **6**, 1045-1056,
doi:10.1631/jzus.2005.B1045 (2005).
- 38 Baumann, H., Prowse, K. R., Marinkovic, S., Won, K. A. & Jahreis, G. P.
Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids.
Ann N Y Acad Sci **557**, 280-295, discussion 295-286 (1989).

- 39 Kasvosve, I., Speeckaert, M. M., Speeckaert, R., Masukume, G. & Delanghe, J. R. Haptoglobin polymorphism and infection. *Adv Clin Chem* **50**, 23-46 (2010).
- 40 Kohler, W. & Prokop, O. Relationship between haptoglobin and Streptococcus pyogenes T4 antigens. *Nature* **271**, 373 (1978).
- 41 Delanghe, J. *et al.* Effect of haptoglobin phenotypes on growth of Streptococcus pyogenes. *Clin Chem Lab Med* **36**, 691-696, doi:10.1515/CCLM.1998.122 (1998).
- 42 Rohde, K. H. & Dyer, D. W. Analysis of haptoglobin and hemoglobin-haptoglobin interactions with the Neisseria meningitidis TonB-dependent receptor HpuAB by flow cytometry. *Infect Immun* **72**, 2494-2506 (2004).
- 43 Kasvosve, I. *et al.* Haptoglobin polymorphism and mortality in patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* **4**, 771-775 (2000).
- 44 Kristiansen, M. *et al.* Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature* **409**, 198-201, doi:10.1038/35051594 (2001).
- 45 Philippidis, P. *et al.* Hemoglobin scavenger receptor CD163 mediates interleukin-10 release and heme oxygenase-1 synthesis: antiinflammatory monocyte-macrophage responses in vitro, in resolving skin blisters in vivo, and after cardiopulmonary bypass surgery. *Circ Res* **94**, 119-126, doi:10.1161/01.RES.0000109414.78907.F9 (2004).
- 46 Oh, S. K., Pavlotsky, N. & Tauber, A. I. Specific binding of haptoglobin to human neutrophils and its functional consequences. *J Leukoc Biol* **47**, 142-148 (1990).
- 47 Hanasaki, K., Powell, L. D. & Varki, A. Binding of human plasma sialoglycoproteins by the B cell-specific lectin CD22. Selective recognition of immunoglobulin M and haptoglobin. *J Biol Chem* **270**, 7543-7550 (1995).
- 48 El Ghmati, S. M., Van Hoeyveld, E. M., Van Strijp, J. G., Ceuppens, J. L. & Stevens, E. A. Identification of haptoglobin as an alternative ligand for CD11b/CD18. *J Immunol* **156**, 2542-2552 (1996).
- 49 Rossbacher, J., Wagner, L. & Pasternack, M. S. Inhibitory effect of haptoglobin on granulocyte chemotaxis, phagocytosis and bactericidal activity. *Scand J Immunol* **50**, 399-404 (1999).
- 50 Xie, Y. *et al.* Haptoglobin is a natural regulator of Langerhans cell function in the skin. *J Dermatol Sci* **24**, 25-37 (2000).
- 51 Billadeau, D. D. & Leibson, P. J. ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest* **109**, 161-168, doi:10.1172/JCI14843 (2002).
- 52 Macauley, M. S., Crocker, P. R. & Paulson, J. C. Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease. *Nat Rev Immunol* **14**, 653-666, doi:10.1038/nri3737 (2014).

- 53 Crocker, P. R., Paulson, J. C. & Varki, A. Siglecs and their roles in the immune system. *Nat Rev Immunol* **7**, 255-266, doi:10.1038/nri2056 (2007).
- 54 Ravetch, J. V. & Lanier, L. L. Immune inhibitory receptors. *Science* **290**, 84-89 (2000).
- 55 Khatua, B., Roy, S. & Mandal, C. Sialic acids siglec interaction: a unique strategy to circumvent innate immune response by pathogens. *Indian J Med Res* **138**, 648-662 (2013).
- 56 Janeway Jr, C. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. J. Principles of innate and adaptive immunity. (2001).
- 57 Angata, T. & Varki, A. Cloning, characterization, and phylogenetic analysis of siglec-9, a new member of the CD33-related group of siglecs. Evidence for co-evolution with sialic acid synthesis pathways. *J Biol Chem* **275**, 22127-22135, doi:10.1074/jbc.M002775200 (2000).
- 58 Zhang, J. Q., Nicoll, G., Jones, C. & Crocker, P. R. Siglec-9, a novel sialic acid binding member of the immunoglobulin superfamily expressed broadly on human blood leukocytes. *J Biol Chem* **275**, 22121-22126, doi:10.1074/jbc.M002788200 (2000).
- 59 Avril, T., Floyd, H., Lopez, F., Vivier, E. & Crocker, P. R. The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells. *J Immunol* **173**, 6841-6849 (2004).
- 60 Ando, M., Tu, W., Nishijima, K. & Iijima, S. Siglec-9 enhances IL-10 production in macrophages via tyrosine-based motifs. *Biochem Biophys Res Commun* **369**, 878-883, doi:10.1016/j.bbrc.2008.02.111 (2008).
- 61 Spence, S. *et al.* Targeting Siglecs with a sialic acid-decorated nanoparticle abrogates inflammation. *Sci Transl Med* **7**, 303ra140, doi:10.1126/scitranslmed.aab3459 (2015).
- 62 Chang, Y. C. & Nizet, V. The interplay between Siglecs and sialylated pathogens. *Glycobiology* **24**, 818-825, doi:10.1093/glycob/cwu067 (2014).
- 63 Carlin, A. F. *et al.* Group B Streptococcus suppression of phagocyte functions by protein-mediated engagement of human Siglec-5. *J Exp Med* **206**, 1691-1699, doi:10.1084/jem.20090691 (2009).
- 64 Chang, Y. C. *et al.* Group B Streptococcus engages an inhibitory Siglec through sialic acid mimicry to blunt innate immune and inflammatory responses in vivo. *PLoS Pathog* **10**, e1003846, doi:10.1371/journal.ppat.1003846 (2014).
- 65 Secundino, I. *et al.* Host and pathogen hyaluronan signal through human siglec-9 to suppress neutrophil activation. *J Mol Med (Berl)* **94**, 219-233,

- doi:10.1007/s00109-015-1341-8 (2016).
- 66 Yan, J. J. *et al.* Molecular analysis of group A streptococcal isolates associated with scarlet fever in southern Taiwan between 1993 and 2002. *J Clin Microbiol* **41**, 4858-4861 (2003).
- 67 Chen, Y. Y. *et al.* Molecular epidemiology of group A streptococcus causing scarlet fever in northern Taiwan, 2001-2002. *Diagn Microbiol Infect Dis* **58**, 289-295, doi:10.1016/j.diagmicrobio.2007.01.013 (2007).
- 68 Thern, A., Stenberg, L., Dahlback, B. & Lindahl, G. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J Immunol* **154**, 375-386 (1995).
- 69 Zhang, S. *et al.* N-linked glycan changes of serum haptoglobin beta chain in liver disease patients. *Mol Biosyst* **7**, 1621-1628, doi:10.1039/c1mb05020f (2011).
- 70 Vitali, L. A., Zampaloni, C., Prenna, M. & Ripa, S. PCR m typing: a new method for rapid typing of group a streptococci. *J Clin Microbiol* **40**, 679-681 (2002).
- 71 Tolker-Nielsen, T. Biofilm Development. *Microbiol Spectr* **3**, MB-0001-2014, doi:10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014 (2015).
- 72 Hirsch, J. G. Bactericidal action of histone. *J Exp Med* **108**, 925-944 (1958).
- 73 Weksler, B. B. & Nachman, R. L. Rabbit platelet bactericidal protein. *J Exp Med* **134**, 1114-1130 (1971).
- 74 Kreikemeyer, B., McIver, K. S. & Podbielski, A. Virulence factor regulation and regulatory networks in *Streptococcus pyogenes* and their impact on pathogen-host interactions. *Trends Microbiol* **11**, 224-232 (2003).
- 75 Unnikrishnan, M., Cohen, J. & Sriskandan, S. Growth-phase-dependent expression of virulence factors in an MIT1 clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **67**, 5495-5499 (1999).
- 76 Pancotto, L. *et al.* Expression of the *Streptococcus pneumoniae* pilus-1 undergoes on and off switching during colonization in mice. *Sci Rep* **3**, 2040, doi:10.1038/srep02040 (2013).
- 77 Kehl-Fie, T. E. *et al.* Examination of type IV pilus expression and pilus-associated phenotypes in *Kingella kingae* clinical isolates. *Infect Immun* **78**, 1692-1699, doi:10.1128/IAI.00908-09 (2010).
- 78 Boyd, C. R. *et al.* Siglec-E is up-regulated and phosphorylated following lipopolysaccharide stimulation in order to limit TLR-driven cytokine production. *J Immunol* **183**, 7703-7709, doi:10.4049/jimmunol.0902780 (2009).

圖表目錄



PCR 目標	M4 GAS WT	M4 GAS $\Delta spy0116$
<i>cat</i>	-	+ (660bp)
<i>spy0116</i>	+ (2160 bp)	-
Upstream and downstream of <i>spy0116</i>	+ (3805 bp)	+ (2305 bp)

表一、pHY-0116 質體與 M4 GAS 基因組發生同源置換之 PCR 結果表。經過兩次置換後 M4 GAS 的 *spy0116* 基因可能會被置換成 pHY-0116 上的 *cat* 基因，成為 *spy0116* 剔除菌株，依 PCR 結果可判斷挑到的菌株是否已剔除 *spy0116* 基因。

抗菌胜肽 MIC	M4 GAS WT	M4 GAS WT+Hp	M4 GAS $\Delta spy0116$
LL-37 (μM)	2	4	32
CRAMP (μM)	2	4	8

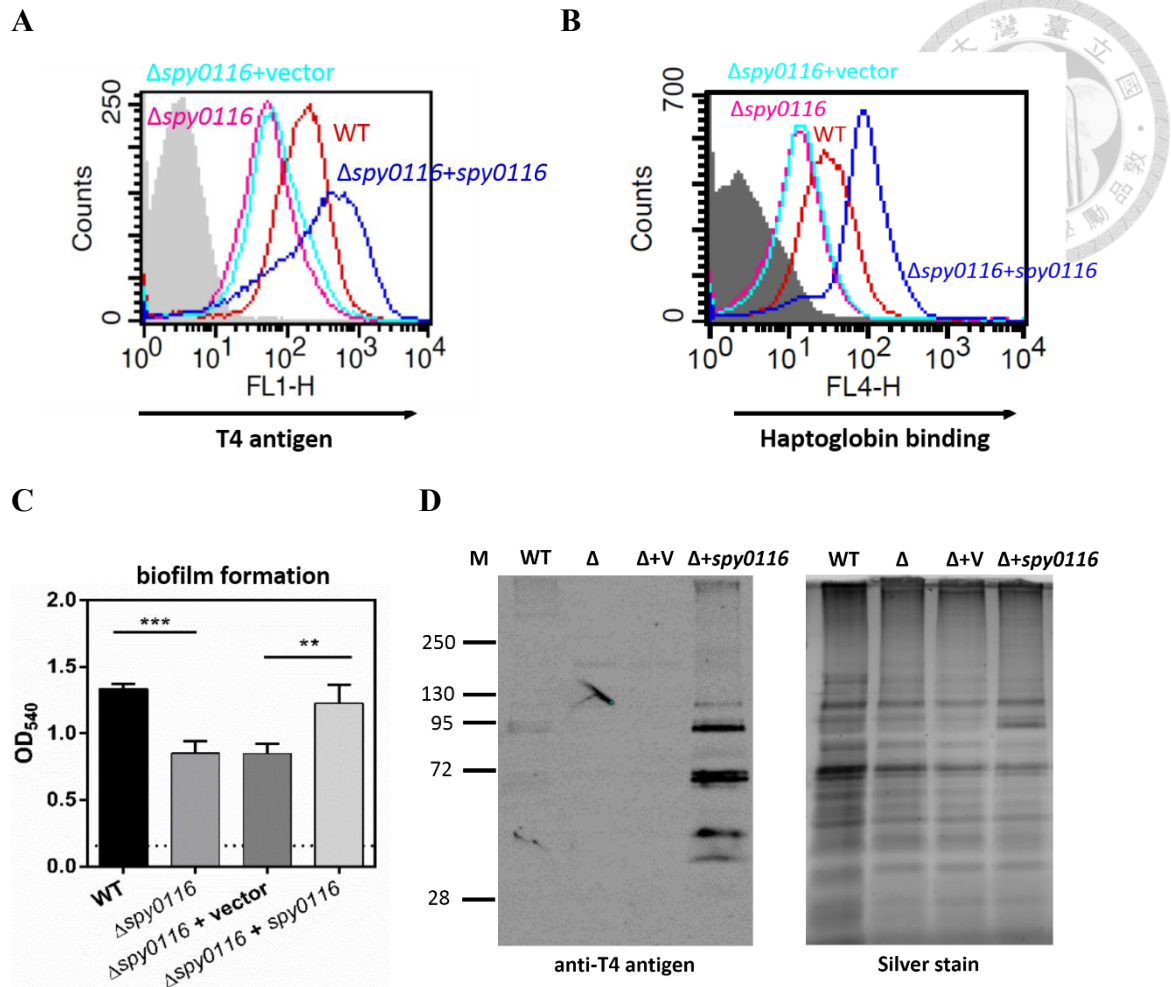
表二、抗菌胜肽對 M4 血清型 A 型鏈球菌之 MIC。將 GAS 回溶於 DMEM + 20% THY 中，並與序列稀釋後的抗菌胜肽於 37 °C 反應 24 小時，再由 DMEM + 20% THY 顏色的變化來判定 MIC。表格為重複兩次後的實驗結果。

組織蛋白 MIC	M4 GAS WT	M4 GAS $\Delta spy0116$
組織蛋白 (mg/ml)	32	32

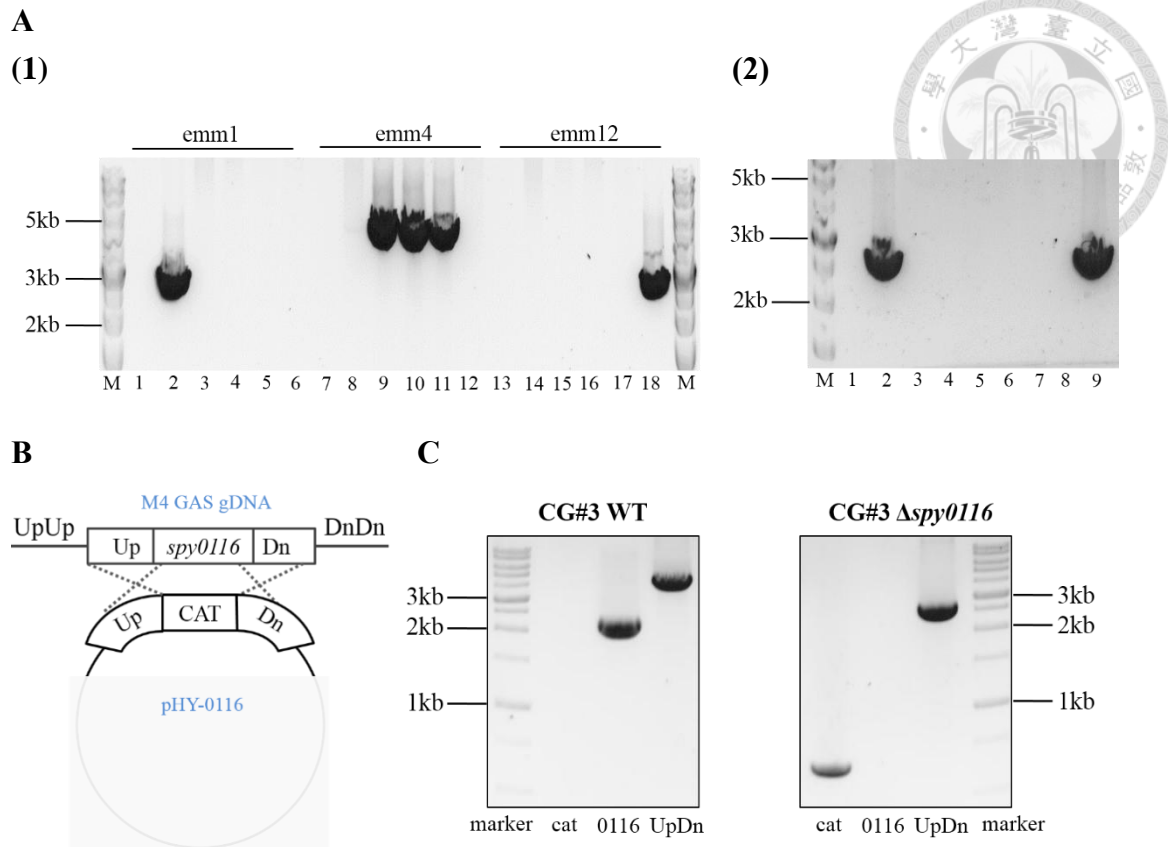
表三、組織蛋白對 M4 血清型 A 型鏈球菌之 MIC。將 GAS 回溶於 RPMI + 5% THY 中，並與序列稀釋後的組織蛋白於 37 °C 反應 24 小時，再由 RPMI + 5% THY 顏色的變化判定 MIC。表格為重複兩次後的實驗結果。

細胞株	Up integration	Down integration	Siglec-9 表現
VX1 D11	+	+	-
VX2 D9	-	+	-
VX2 E5	-	+	-
VX2 F3	-	+	-
9X2 E6	+	+	+
9X2 G1	-	+	+

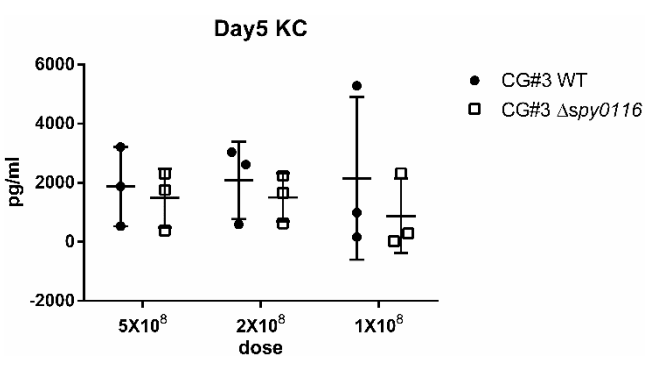
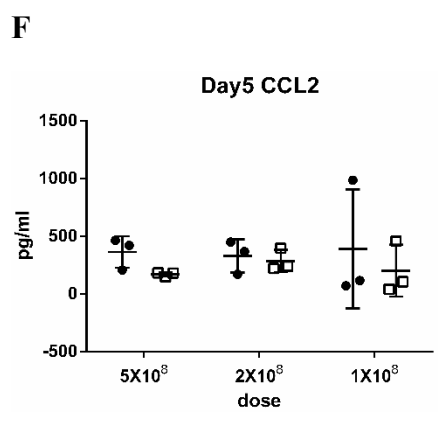
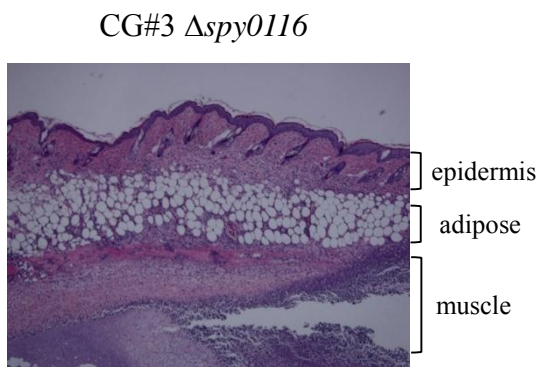
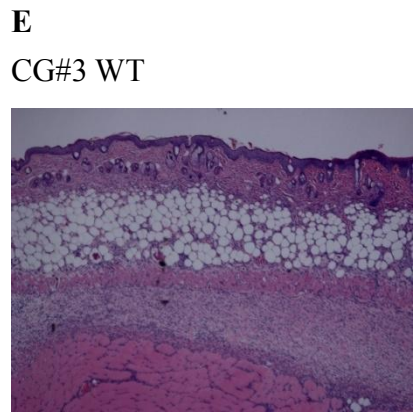
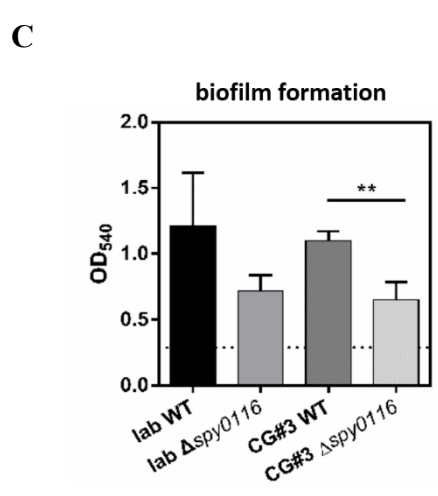
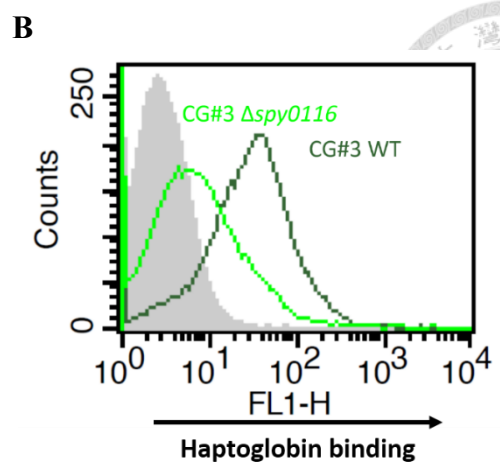
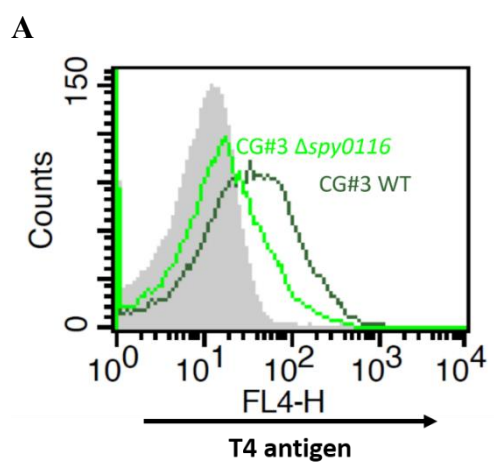
表四、細胞株之基因組嵌入結果與 Siglec-9 表現的統整表格。表格中列出使用 PCR 確認有質體嵌入基因組之細胞以及經流式細胞儀分析該細胞株表面是否有 Siglec-9 表現的結果。此為統整表格，個別細胞株之 PCR 及流式細胞儀分析結果見附錄三和四。



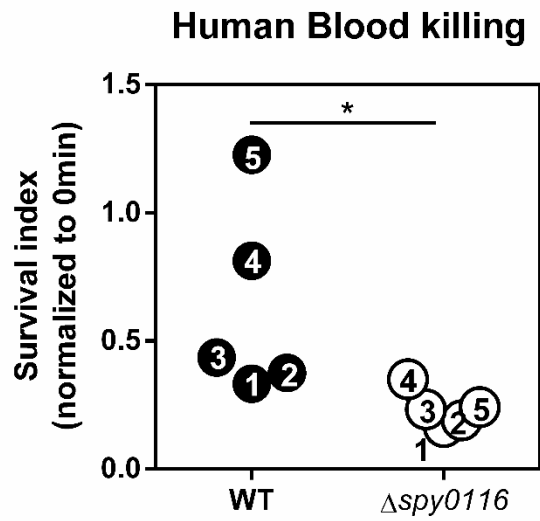
圖一、建立 M4 血清型 A 型鏈球菌 *spy0116* 突變株之互補菌株。以流式細胞儀分析 M4 GAS $\Delta spy0116 + vector$ 和 M4 GAS $\Delta spy0116 + spy0116$ 之 T4 抗原表現量 (A) 及與 Hp 結合的能力 (B)。 (C) GAS 在含有 30 mM glucose 之 C medium 中於 37 °C 培養 48 小時，再以結晶紫染色並由 OD₅₄₀ 來判斷生物膜的生成量。 (D) 使用 Western blot 分析細胞壁萃取物之結果圖 (左圖)，silver stain 結果圖 (右圖)。 *P* value 統計使用 One-way ANOVA, ** 與 *** 分別表示差異達 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 之顯著差異。



圖二、建立剔除 *spy0116* 的臨床分離菌株。(A) 使用 PCR 進行臨床分離 A 型鏈球菌分型之結果圖 A (1)為分別以 emm1、emm4 和 emm12 引子反應之結果，M 代表 maker，1、7 和 13 的反應物為水，2、8、14 的為 M1 GAS，3、9、15 為 M4 GAS，其餘是臨床分離菌株。圖 A(2)為 emm1 引子反應之結果，M 代表 marker，2 為 M1 GAS，其餘是臨床分離菌株。(B) pHY-0116 質體與 M4 GAS 基因組發生同源置換之示意圖，經過兩次置換後 M4 GAS 的 *spy0116* 基因會被置換成 pHY-0116 上的 *cat* 基因，成為 *spy0116* 剔除菌株。(C) 以 PCR 確認 *spy0116* 剔除的情形，電泳圖中的 M 代表 marker，cat 代表 *cat* 基因，0116 代表 *spy0116* 基因，UpDn 代表由 *spy0116* 上下游 primer 反應得到的產物。

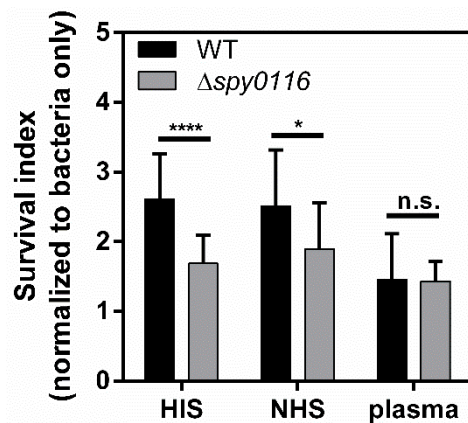


圖三、確認臨床分離 *spy0116* 突變株之在 T4 抗原表現、生物膜生成與小鼠皮下感染之表現。以流式細胞儀分析臨床分離菌株 WT 和 Δ *spy0116* 之 T4 抗原表現量 (A) 或是與 Hp 結合的能力 (B)。(C) GAS 在含有 30 mM glucose 之 C medium 中於 37°C 培養 72 小時，再以結晶紫染色並由 OD₅₄₀ 來判斷生物膜的生成量。感染 2×10^8 CFU GAS 小鼠第二天傷口圖，左側為臨床分離 WT 而右側為臨床分離 Δ *spy0116* 皮下感染造成的傷口 (D)，第三天的組織切片圖(E)。第五天時感染處之組織的細胞激素表現量(F)。P value 統計使用 One-way ANOVA，**表示差異達 $P < 0.01$ 之顯著差異。

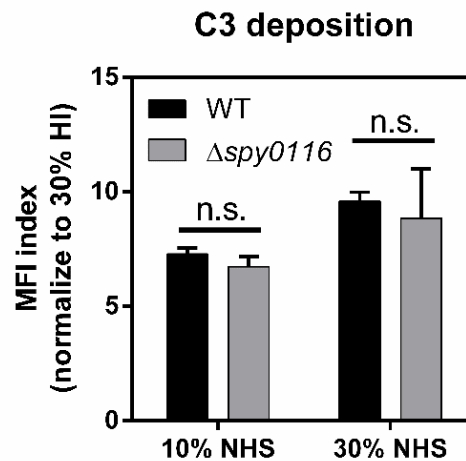


圖四、 M4 血清型 A 型鏈球菌野生株在全血中存活率高於 *spy0116* 突變株。450 μl 的全血與 1×10^5 的 GAS 混合均勻於 37°C 反應，0 分鐘和 120 分鐘時分別取出，序列稀釋後塗盤以計算活菌 CFU。結果的數值代表與 0 分鐘相比之 GAS 存活率，全血殺菌試驗共有五位捐獻者，每組有三重複。*P* value 統計使用 t-test，*表示差異達 $P < 0.05$ 之顯著差異。

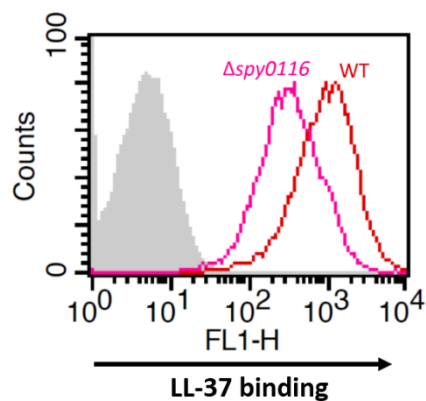
A



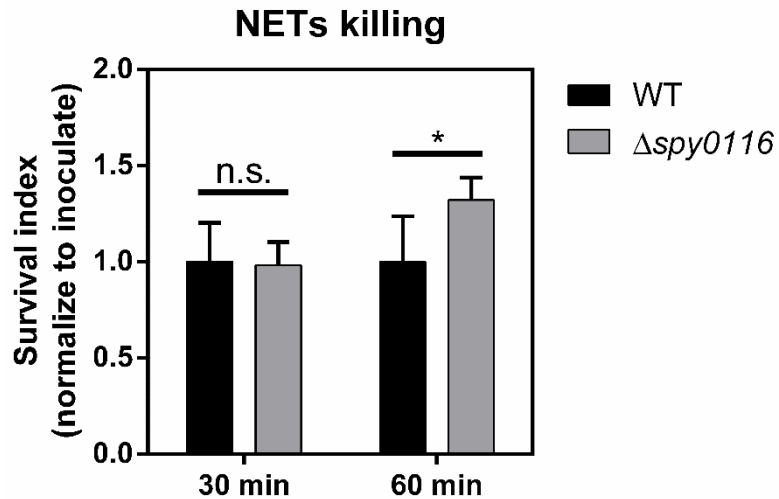
B



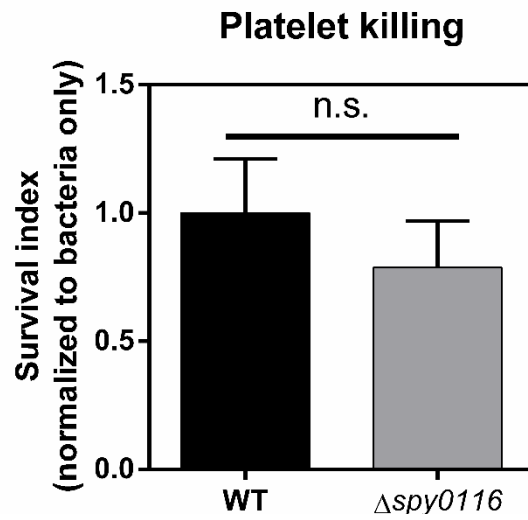
C



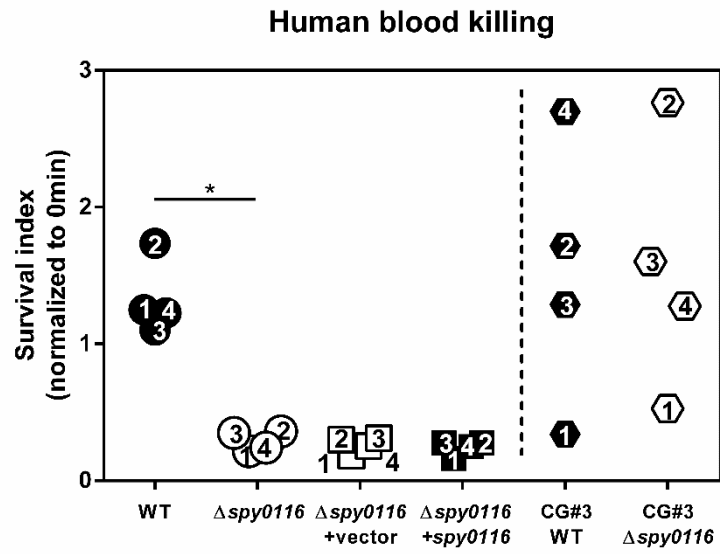
圖五、M4 血清型 A 型鏈球菌野生株能在血清中存活較 *spy0116* 突變株好，但線毛無法幫助減少 M4 血清型 A 型鏈球菌與補體和抗菌肽的結合。(A) 實驗中以 1×10^3 的 GAS 和 50 μ l 的血清或血漿在 37 °C 反應兩小時，再取出塗盤計算活菌 CFU。結果的數值代表與初始加入的菌量相比之 GAS 存活率，血清與血漿殺菌試驗共有三位捐獻者，每組有三重複。(B) 使用流式細胞儀分析 M4 GAS WT 和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 與 10% 或是 30% 血清反應 30 分鐘後 C3 補體沉積的情形，實驗中以 30% HI 做為控制組。圖為重複三次實驗後的統計結果。(C) 以流式細胞儀分析 GAS 和 FAM 標記之 LL-37 的結合能力，圖中實體灰色塊為未染色之 GAS。*P* value 統計使用 t-test，n.s. 表示統計無顯著差異，* 與 **** 分別表示差異達 $P < 0.05$ 或 $P < 0.0001$ 之顯著差異。



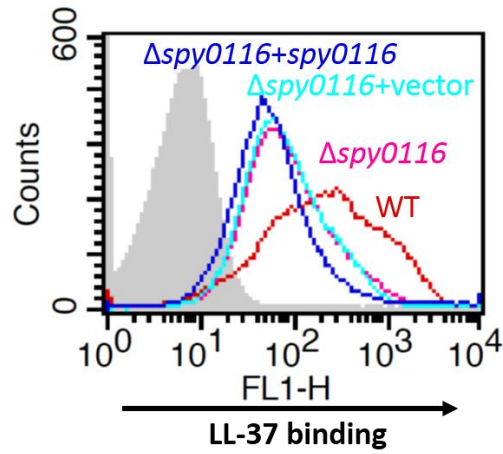
圖六、M4血清型A型鏈球菌野生株和 *spy0116* 突變株與 neutrophil extracellular traps (NETs) 反應後的存活率沒有差異。將 2×10^5 分離自人類全血的嗜中性細胞以 25 nMPMA 處理 4 小時後，加入 2×10^4 的 GAS 在 37°C 反應 30 或 60 分鐘。以 100 U/ml DNase I 處理後，再塗盤計算活菌 CFU。NETs 殺菌試驗共有兩位捐獻者，每組有三重複。*P* value 統計使用 t-test，n.s.表示統計無顯著差異，*表示差異達 $P < 0.05$ 之顯著差異。



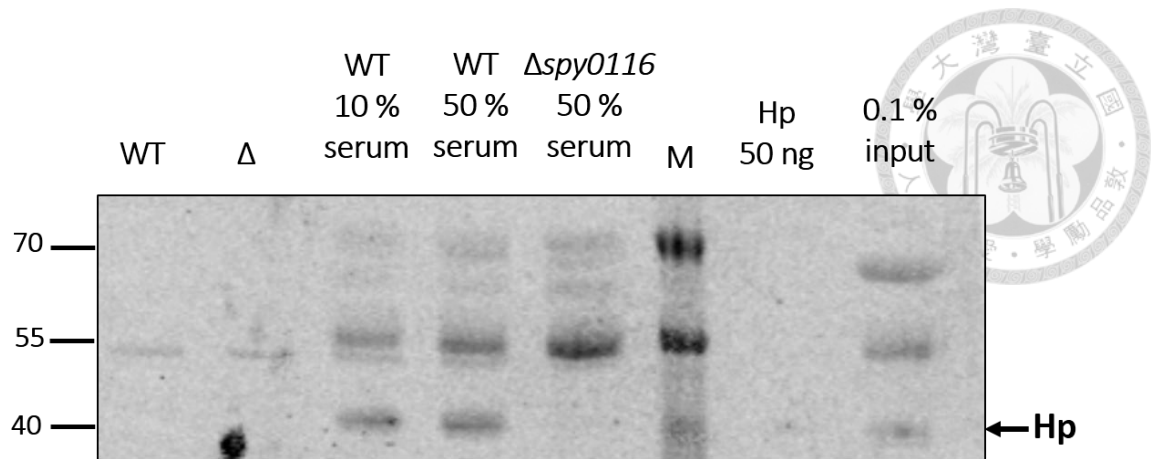
圖七、M4 血清型 A 型鏈球菌野生株與 *spy0116* 突變株抵抗血小板之殺菌作用的能力沒有差異。分離自全血的 1×10^7 platelets 與 1×10^5 GAS 在 37°C 反應 2 小時後，塗盤計算活菌 CFU。結果的數值代表與控制組相比之反應兩小時後的 GAS 存活率，共有三位捐獻者，每組有三重複，實驗中以與 RPMI 反應的組別當作控制組。P value 統計使用 t-test，n.s. 表示統計無顯著差異。



圖八、M4血清型A型鏈球菌 *spy0116* 突變株之互補菌株和臨床分離菌株之全血殺菌試驗。450 μ l 的全血與 1×10^5 的 GAS 混合均勻於 37 °C 反應，0 分鐘和 120 分鐘時分別取出，序列稀釋後塗盤以計算活菌 CFU。結果的數值代表與 0 分鐘相比之 GAS 存活率，共有四位捐獻者，每組有三重複。

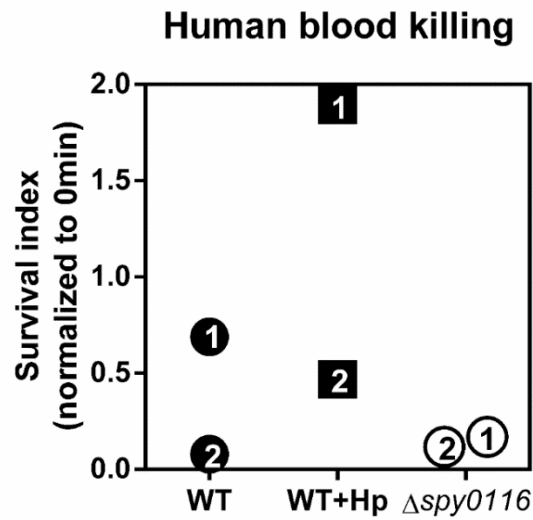


圖九、M4 血清型 A 型鏈球菌 *spy0116* 突變株之互補菌株與控制組之 LL-37 結合能力沒有差別。以流式細胞儀分析 GAS 和 FAM 標記之 LL-37 的結合能力，圖中實體灰色塊為未染色之 GAS。

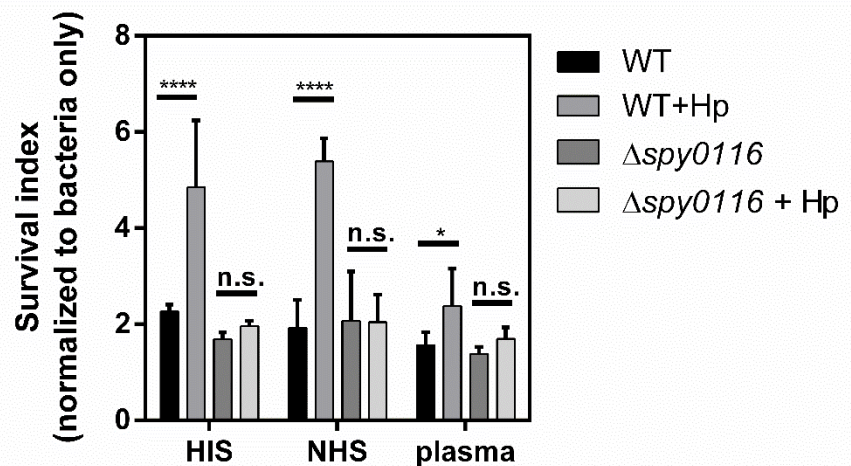


圖十、M4 血清型 A 型鏈球菌的線毛能與人類血清中之 haptoglobin 結合。 2×10^8 的 GAS 與 125 μ l RPMI 或人類血清於 37 $^{\circ}$ C 旋轉反應 15 分鐘，再離心下來以 western blot 分析。圖為使用 anti-human haptoglobin 與膜雜交反應後之結果圖。

A



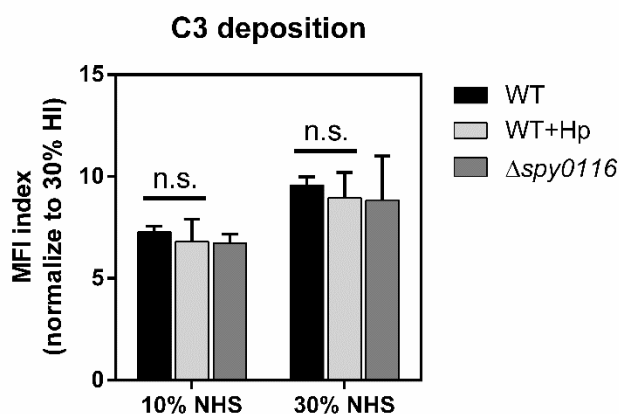
B



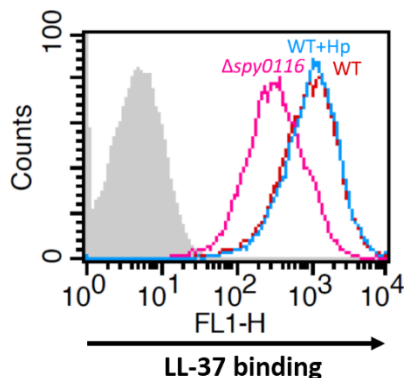
圖十一、Haptoglobin 能幫助 M4 血清型 A 型鏈球菌野生株在人類全血和血清中存活。(A) 450 μ l 的全血與 1×10^5 的 GAS 混合均勻於 37°C 反應，0 分鐘和 120 分鐘時分別取出，序列稀釋後塗盤以計算活菌 CFU。結果的數值代表與 0 分鐘相比之 GAS 存活率，全血殺菌試驗共有兩位捐獻者，每組有三重複。(B) 實驗中以 1×10^3 的 GAS 和 50 μ l 的血清或血漿在 37°C 反應兩小時，再取出塗盤計算活菌 CFU。血清與血漿殺菌試驗共有兩位捐獻者，每組有三重複。結果的數值代表與初始加入的菌量相比之 GAS 存活率。P value 統計使用 One-way ANOVA，n.s. 表示統計無顯著差異，*與****分別表示差異達 $P < 0.05$ 或 $P < 0.0001$ 之顯著差異。



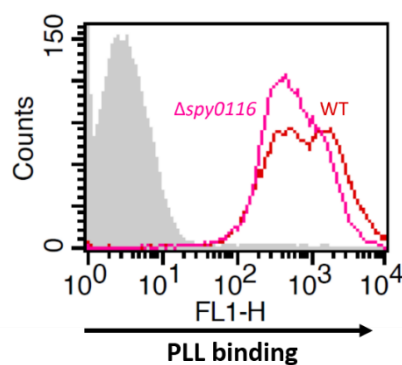
A



B

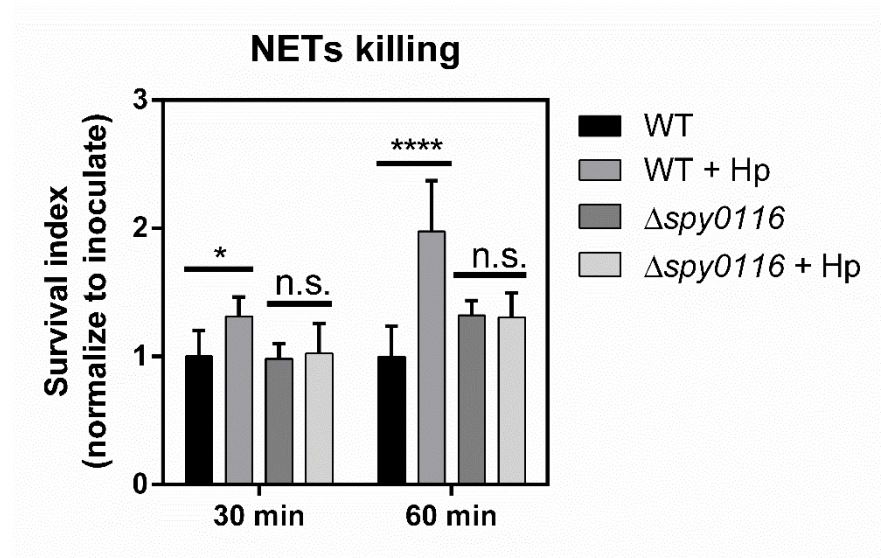


C

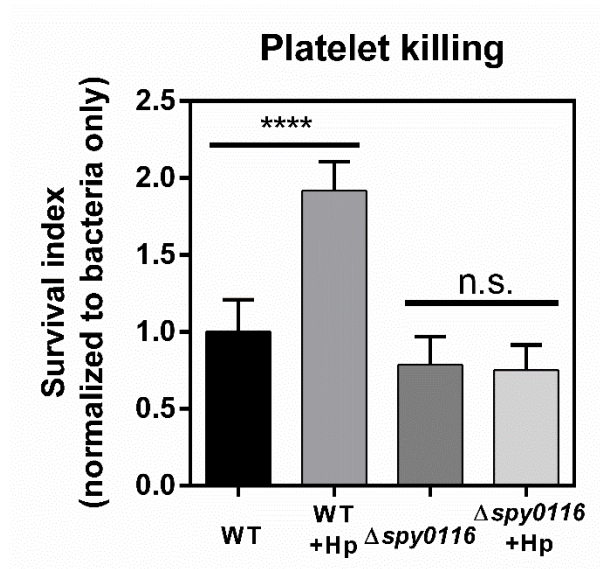


圖十二、M4 血清型 A 型鏈球菌預先與 haptoglobin 結合並不會增加對於血清中抗菌物質的抗性，且剔除 *spy0116* 不會影響 M4 血清型 A 型鏈球菌的電荷。(A) 使用流式細胞儀分析 M4 GAS WT、M4 GAS WT+Hp 和 M4 GAS $\Delta spy0116$ 與 10%血清或是 30%血清反應 30 分鐘後 C3 補體沉積的情形，實驗中以 30% HI 做為控制組。以流式細胞儀分析 GAS 和 FITC 標記的 LL-37 (B) 與 FITC 標記 Poly-L-Lysine (PLL) (C) 之結合能力，圖中實體灰色塊為未染色之 GAS。*P* value 統計使用 One-way ANOVA，n.s.表示統計無顯著差異。

A

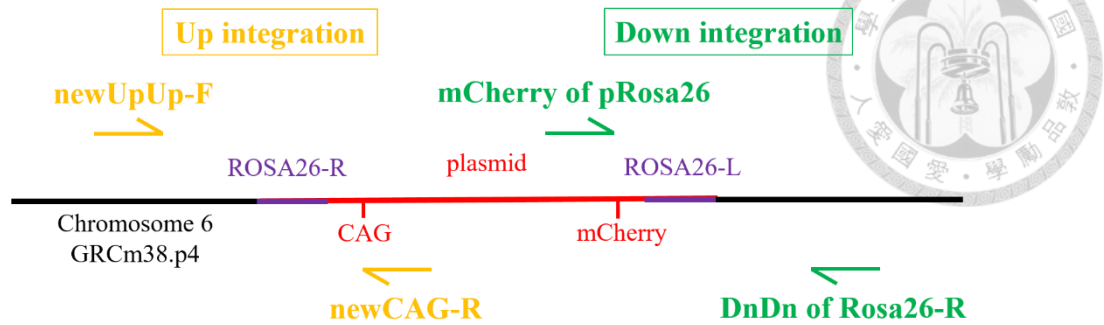


B

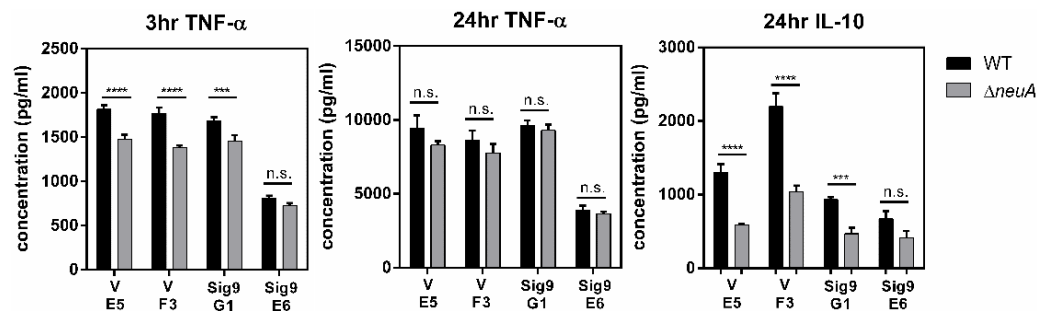


圖十三、與 Hp 結合能夠增加 M4 血清型 A 型鏈球菌與 neutrophil extracellular traps (NETs) 和血小板反應後的存活率。(A) Neutrophils 以 25 nM PMA 刺激產生 NET 後加入 2×10^4 的 GAS 培養 30 或是 60 分鐘後，滴種於 THA 上以計算 GAS 的存活率。結果的數值代表與初始加入的菌量相比之各時間點的 GAS 存活率。NETs 殺菌試驗共有兩位捐獻者，每組有三重複。(B) 將分離自人類全血的 1×10^7 platelets 與 1×10^5 GAS 在 37°C 反應 2 小時後，反應兩小時後滴種於 THA 上以計算 GAS 的存活率。結果的數值代表與控制組相比之反應兩小時後的 GAS 存活率。血小板殺菌試驗共有三位捐獻者，每組有三重複。*P* value 統計使用 One-way ANOVA，n.s. 表示統計無顯著差異，* 與 **** 分別表示差異達 $P < 0.05$ 或 $P < 0.0001$ 之顯著差異。

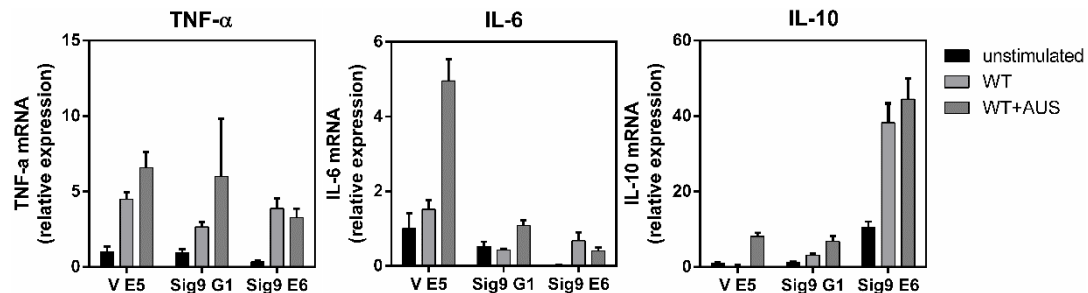
A



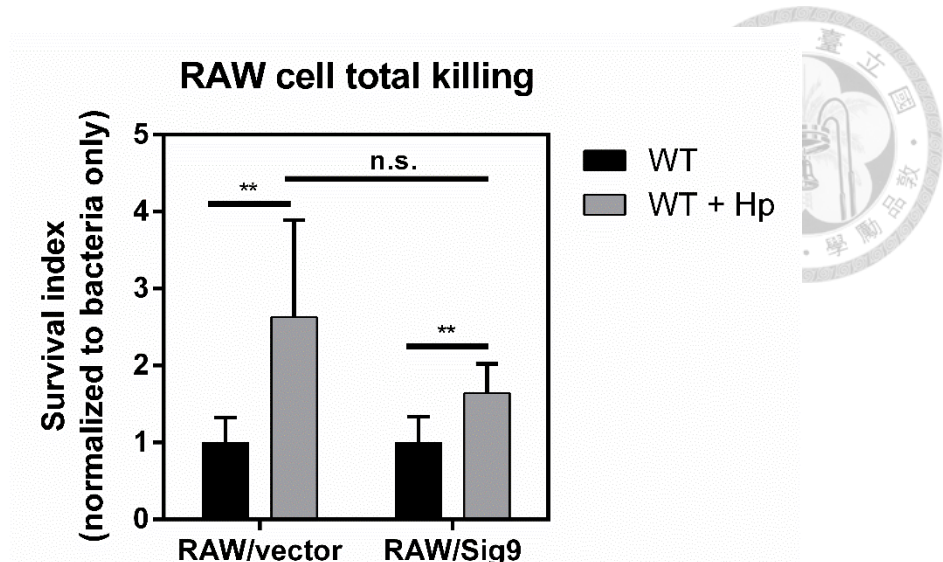
B



C



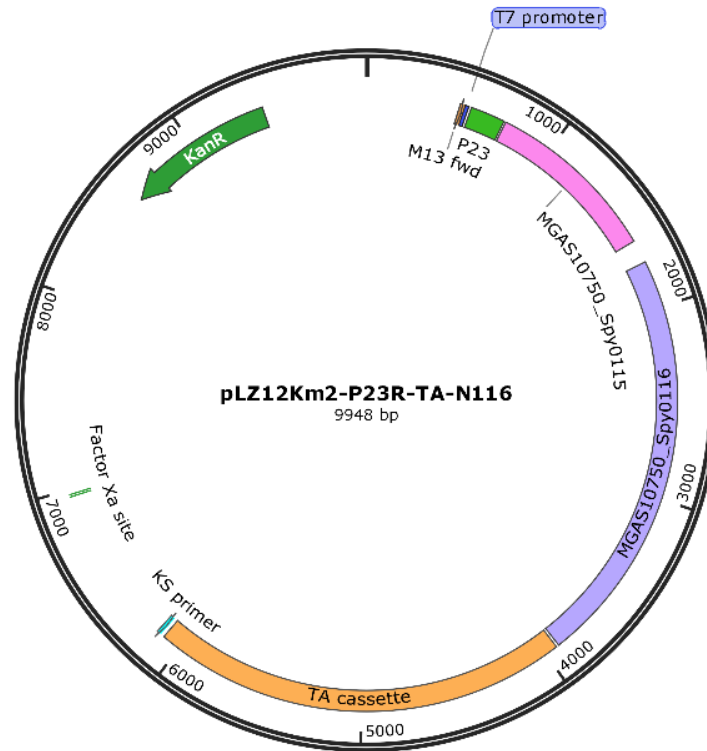
圖十四、建立 RAW/vector 和 RAW/Sig9 細胞株。(A) pROSA26-pCAG 質體嵌入 RAW 264.7 細胞基因組以及 PCR 使用之引子示意圖。經過 CRISPR/Cas9 編輯過後，pROSA26-pCAG 可能嵌入 RAW 264.7 細胞之 *ROSA26* 基因中間，先使用流式細胞分選儀挑出會表現 mCherry 的細胞，再使用 *ROSA26* 基因上下游和會嵌入基因組之質體片段的引子與細胞 gDNA 進行 PCR，便可找出確實有質體嵌入基因組的細胞。(B) 實驗前兩天種下 5×10^4 顆細胞，實驗時加入 5×10^5 的 GBS 與細胞於 37°C 反應。3 或 24 小時後取出上清液檢測細胞激素之表現量。(C) 實驗前兩天種下 1×10^6 顆細胞，實驗時加入 1×10^7 的 GBS 與細胞於 37°C 反應。1 小時後萃取細胞之 RNA 檢測細胞激素之基因表現量。*P* value 統計使用 One-way ANOVA，n.s. 表示統計無顯著差異，***與****分別表示差異達 $P < 0.005$ 或 $P < 0.0001$ 之顯著差異。



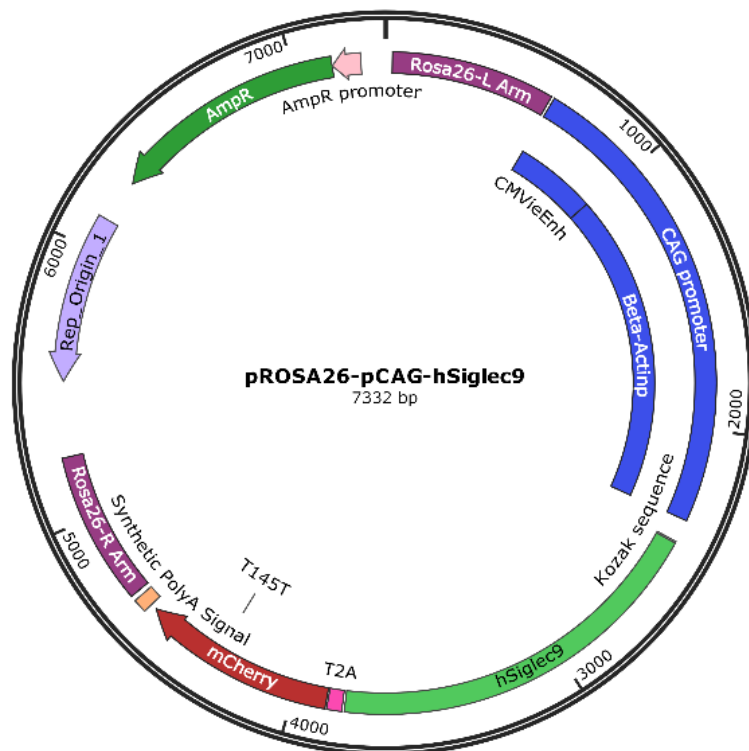
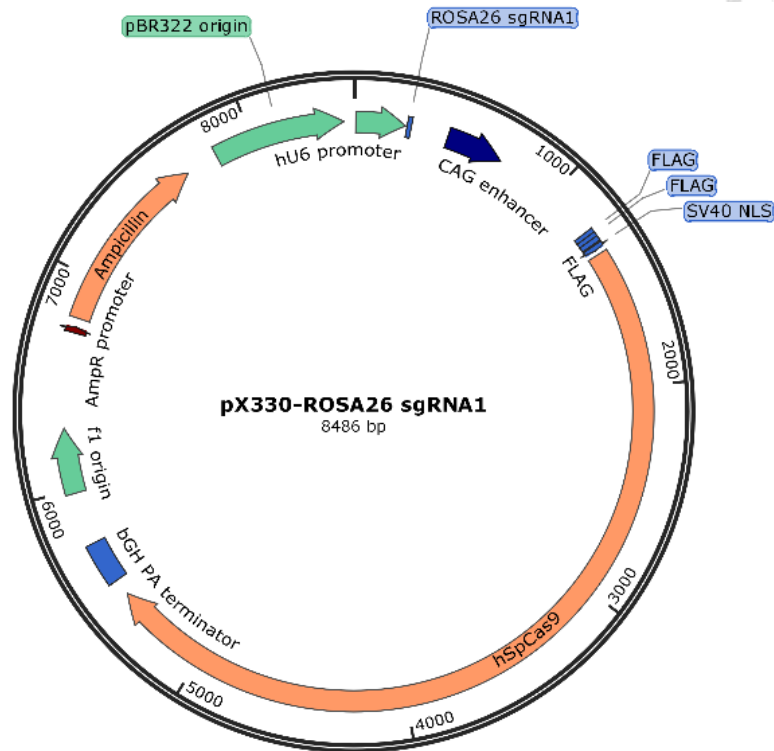
圖十五、與 Hp 結合能增加 M4 血清型 A 型鏈球菌與 RAW 細胞反應之存活率，但是和 RAW/vector 或 RAW/Sig9 反應後的存活率沒有差異。實驗前兩天種下 2.5×10^5 顆細胞，實驗時加入 2.5×10^5 的 GAS 與細胞於 37°C 反應 2 小時。反應兩小時後滴種於 THA 上以計算 GAS 的存活率。結果的數質代表與控制組相比之反應兩小時後的 GAS 存活率，實驗共重複兩次，每組有三重複。P value 統計使用 One-way ANOVA，n.s. 表示統計無顯著差異，** 表示差異達 $P < 0.01$ 之顯著差異。

附錄

附錄一、帶有 *spy0116* 基因之質體圖譜。



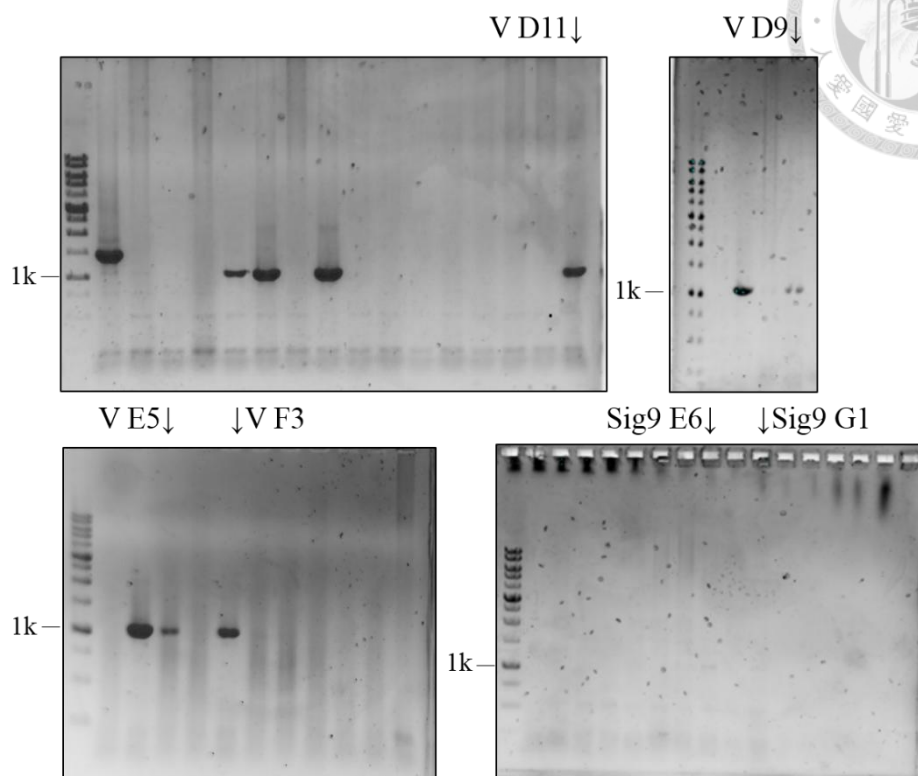
附錄二、送入 RAW 264.7 細胞之 pX330-ROSA26 sgRNA1 和 pROSA26-pCAG-hSiglec9 的質體圖譜。



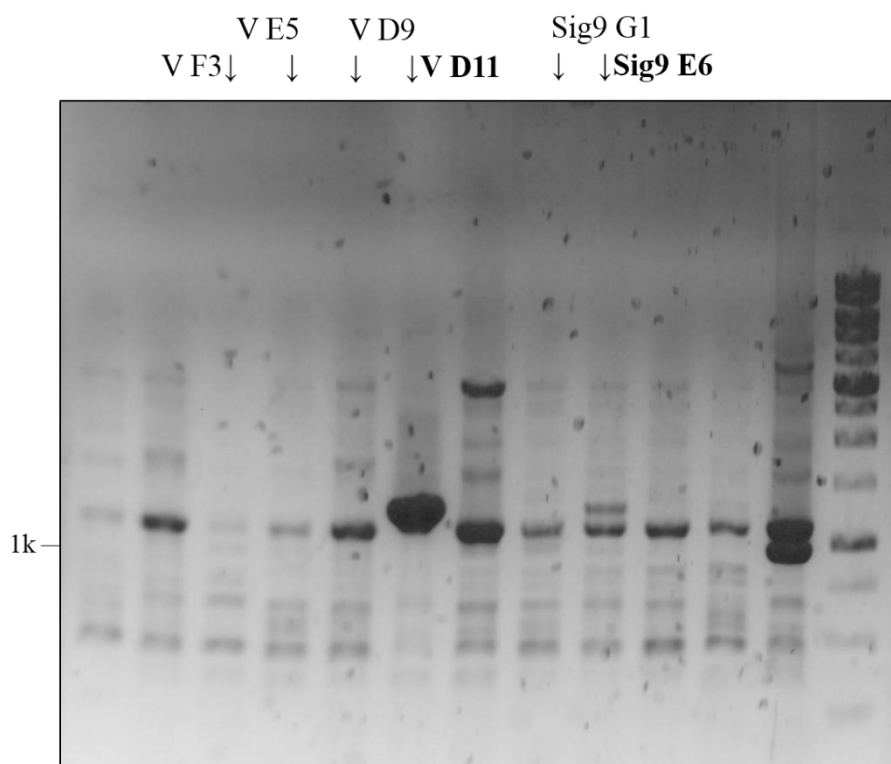
附錄三、經流式細胞儀分選出帶有 mCherry 螢光之細胞株 PCR 結果圖。



Down integration



Up integration



附錄四、經 PCR 確認質體已嵌入基因組之細胞株以流式細胞儀分析表面上 Siglec-9 的表現。

