

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

克雷伯氏肺炎桿菌第六型分泌系統之調控

Regulation of type 6 secretion system (T6SS) in *Klebsiella*

*pneumoniae*

呂怡柔

Yi-Rou Lu

指導教授：王錦堂 博士

Advisor : Jin-Town Wang, Ph.D.

中華民國 106 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：克雷伯氏肺炎桿菌第六型分泌系統之調控

英文題目：Regulation of type 6 secretion system (T6SS) in  
*Klebsiella pneumoniae*.

本論文係呂怡柔君 (學號 R04495116) 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 106 年 7 月 18 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：

王 錦 堂

(簽名)

(指導教授)

謝世良

張永祺

潘怡均

系主任、所長

鄧述謨

(簽名)



## 致謝

艷陽高照的夏日午後，開始敲著鍵盤寫寫致謝的文字，想起兩年前此時踏進實驗室的自己，或許滿腹著大學累積的書本知識，但對於生物技術的實際操作和應用卻也是一知半解，因此在面對著許多需要學習的事物，感到特別新鮮和興奮。漸漸地在老師和學長姐的帶領下進入狀況，專心投注於研究題目，起初不免有受挫的心情，久而久之就會明白這就是在實驗，實驗許多未知的疑問和假設。經過這兩年在實驗室的學習與訓練，使我更加體悟到科學是很直白而困難的，所以能發現到什麼未知的事物對科學人而言相當珍貴難得。

R739 實驗室是個溫暖的大家庭。非常感謝老師讓學生們在良好的實驗環境和充足的實驗材料之下學習，在 meeting 的時間和大家激盪想法，並分享有趣的時事。謝謝一路領著我在 T6SS 領域裡奔跑的花兒佩芳學姊，我們總是兩人圍著小圈討論實驗或是新的文獻報導，雖然常常頭腦打結，學姊也會有耐心的為我解說。謝謝我的鄰居稚容學姊，忙碌的她總是從容優雅地做實驗，且帶著笑容和我討論或是解答我的大小問題，給人一種無形的安全感。謝謝伊翔學長默默關心我的實驗進度和疑似心情不好的臭臉，也會適時給予良好的建議讓我撥雲見日，喜歡一起聊聊這個難解的人生，哈哈。謝謝民俗專家依吟學姊在吃飯時間和大家分享生活大小事和有趣的習俗，給人一種貼心可愛的感覺。謝謝俐吟學姊時常分享做實驗的技巧，也會主動地和學弟妹們討論實驗失敗的可能原因，讓大家一起成長。謝謝和我奮鬥兩年的芷華和曼華，我們一起上課考試準備報告，分享戴手套的心得，總是像愛玩耍的小精靈般嘰嘰喳喳講個沒完。謝謝學弟妹柏勳、婉婷和彥溥的陪伴，為實驗室帶來很多歡笑，希望大家都實驗順利從中有所收穫。

很開心自己有選擇攻讀碩班，培養許多生物技術的操作能力，以及待人處世的態度，這兩年的日子不長也不短，但肯定影響我的人生很多，最後謝謝我的家人一路支持和陪伴，讓我幸福地當小小科學人。

## 中文摘要



細菌會利用不同的致病因子(virulence factor)來抵禦或逃脫宿主的免疫攻擊，並提升在宿主環境中生存或造成威脅的能力，而細菌分泌蛋白質的過程為一種與宿主互動的重要策略。已知革蘭氏陰性菌演化出六型分泌系統(type I to type VI secretion system, T1SS to T6SS)，而第六型分泌系統是最近期所發現，會透過組裝精密的 Hcp-VgrG-PAAR 突刺裝置，將作用蛋白質(effector protein)運輸至目標細胞或環境中。據研究指出高於 25% 的革蘭氏陰性菌帶有構成 T6SS 核心構造之 13 個保守基因，而本篇研究對象克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 也被發現有 T6SS locus-I 和 locus-III 的存在，故想深入探討其 T6SS 是否具有功能，且會受何種未知機制所調控。

本研究結果顯示，T6SS 相關基因(*hcp*、*vgrG1*、*vgrG2*、*icmF1* 和 *icmF2*)廣泛分布於不同來源的克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株，其中以分離自社區型化膿性肝膿瘍(PLA)菌株同時帶有此五個基因之比率為最高 (32/42, 76.19%)，但隨機挑選的 47 株 *hcp*<sup>+</sup>*vgrG1*<sup>+</sup>*vgrG2*<sup>+</sup>*icmF1*<sup>+</sup>*icmF2*<sup>+</sup> 菌株，包括野生型 NTUH-K2044，並未在西方墨點法偵測到 Hcp 蛋白質的表現，故認為克雷伯氏肺炎桿菌之 T6SS 在一般實驗室培養條件下可能受細菌內未知機制所壓抑。接續利用即時定量聚合酶鏈鎖反應分析發現 H-NS 蛋白質會在轉錄層次上負向調控 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 表現量，且以西方墨點法在 *hns* 基因剔除株中可偵測到 Hcp 蛋白質的表現。另外，野生型 NTUH-K2044 在與真核細胞(HL-60, Caco-2 cells)作用後，其 *hns* mRNA 表現量雖有顯著降低，但並無提升 T6SS 相關基因的表現，顯示 T6SS 在 NTUH-K2044 與真核細胞作用之下會受到更嚴謹且未知的機制所調控。接著利用凝膠阻滯分析法確認 H-NS 可直接與 T6SS locus-I 上之啟動子序列或是基因編碼序列相互結合，藉此抑制 T6SS 相關基因的表現。最後，在與 Caco-2 細胞貼附實驗中，發現 T6SS

相關基因會影響 NTUH-K2044 對腸道細胞的貼附能力，而其中詳細的分子機制為何仍需更深入的研究。




**關鍵字：**克雷伯氏肺炎桿菌、第六型分泌系統、H-NS 蛋白質、凝膠阻滯分析法

## Abstract



Bacteria can use different virulence factors to resist or escape host immune response, even to enhance survival ability in host environment. Currently, Gram-negative bacteria have been known to evolve six types of secretion system (T1SS to T6SS), wherein the type six secretion system (T6SS) was discovered recently, which can transport effector proteins to target cells or environment through assembling a delicate Hcp-VgrG-PAAR needle-like structure. Several studies have indicated that up to 25% of Gram-negative bacteria genome includes 13 conserved genes, which encoded the core components of T6SS. In fact, two contiguous putative T6SS loci (locus-I, locus-III) have been found in the *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044 genome in a previous study. Therefore, the aim of this study is to investigate whether the NTUH-K2044 have functional T6SS or not, and to identify the unknown regulation mechanisms of its T6SS.

Our results showed that five of the T6SS genes (*hcp*, *vgrG1*, *vgrG2*, *icmF1*, *icmF2*) that were highly related to the assembly and function of T6SS were widespread in various clinical isolates of *K. pneumoniae*, and strains isolated from community-acquired pyogenic liver abscess (PLA) have a higher prevalence (32/42, 76.19%). The Hcp protein was detected neither in randomly selected 47 *hcp*<sup>+</sup>*vgrG1*<sup>+</sup>*vgrG2*<sup>+</sup>*icmF1*<sup>+</sup>*icmF2*<sup>+</sup> strains nor in the wild-type NTUH-K2044. Thus, we assumed



that T6SS was repressed via unknown mechanisms in general *in vitro* culture conditions. Next, we found that transcription levels of *hcp*, *vgrG1* and *vgrG2* were suppressed by H-NS via real-time PCR analysis. The Hcp protein expression was significantly increased in the *hns* deletion mutant strain. The *hns* transcription level of the NTUH-K2044 was significantly decreased after interacting with both HL-60 and Caco-2 cells, however, the expression of T6SS-related genes did not increased, revealing that a more stringent and unknown mechanisms behind when interacting with eukaryotic cells. In addition, the gel retardation assay confirmed that H-NS could bind to the promoter sequences or coding region of T6SS locus-I, indicating the suppression of transcription of T6SS-related genes is through direct binding. At last, we found that T6SS-related genes were involved in the NTUH-K2044 adhesion to Caco-2 intestinal cells from adherence assays, while the detailed molecular mechanisms still need further study.

**Key words:** *Klebsiella pneumoniae*, Type six secretion system, H-NS, Gel retardation assay

# 目錄



口試委員審定書 .....	I
致謝 .....	II
中文摘要 .....	III
Abstract.....	V
目錄 .....	VII
表目錄 .....	X
圖目錄 .....	XI
第一章、 緒論 .....	1
1.1 克雷伯氏肺炎桿菌( <i>Klebsiella pneumoniae</i> )與其臨床重要性 .....	1
1.2 革蘭氏陰性細菌獨有之分泌系統(Secretion System).....	2
1.3 第六型分泌系統(Type VI Secretion System, T6SS).....	3
1.4 細菌對第六型分泌系統之調控機制 .....	6
1.4.1 鐵離子調控機制 .....	6
1.4.2 H-NS 蛋白質的調控機制 .....	6
1.4.3 轉錄後調控機制：The Gac/Rsm pathway .....	7
1.4.4 群體感應(Quorum sensing)調控機制 .....	7
1.4.5 轉譯後調控機制：Threonine phosphorylation pathway .....	8
1.5 H-NS (Histone-like nucleoid structuring protein)蛋白質 .....	8
1.6 研究動機 .....	9
第二章、 材料方法 .....	10
2.1 材料 .....	10
2.1.1 克雷伯氏肺炎桿菌之臨床菌株(clinical strains) .....	10
2.1.2 其他菌株與質體(plasmids) .....	10





2.1.3	培養基(media).....	11
2.1.4	抗生素(antibiotics).....	11
2.1.5	引子(primers).....	12
2.1.6	HL-60 細胞株培養與分化.....	12
2.1.7	Caco-2 細胞株培養.....	12
2.2	方法.....	13
2.2.1	聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction ; PCR).....	13
2.2.2	聚丙烯醯胺膠體電泳(Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE)與蛋白質染色(Coomassie blue staining).....	14
2.2.3	西方墨點法(Western Blot).....	17
2.2.4	萃取克雷伯氏肺炎桿菌之 RNA.....	19
2.2.5	反轉錄定量聚合酶鏈鎖反應(Quantitative real-time reverse-transcription PCR ; RT-qPCR).....	20
2.2.6	克雷伯氏肺炎桿菌與真核細胞株交互作用模式.....	22
2.2.7	Caco-2 細胞貼附試驗(Cell adherence assay).....	23
2.2.8	NTUH-K2044 之 T6SS locus-I 之 <i>kp1_2392(impB) ~ kp1_2400(vgrG1)</i> 操縱子(operon)位置分析.....	24
2.2.9	表現及純化克雷伯氏肺炎桿菌之 H-NS 蛋白質.....	24
2.2.10	凝膠阻滯分析(Gel retardation assay).....	27
第三章、	結果.....	29
3.1	研究策略.....	29
3.2	克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 T6SS 相關基因盛行率.....	29
3.3	克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 Hcp 蛋白質的表現.....	30
3.4	NTUH-K2044 對 T6SS 的調控機制.....	30
3.4.1	尋找 NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質.....	31



3.4.2	NTUH-K2044 之 H-NS 對 T6SS 相關基因或蛋白質表現的影響	31
3.4.3	NTUH-K2044 與真核細胞株交互作用對 T6SS 相關基因表現的影響	32
3.5	NTUH-K2044 之 T6SS locus-I 之 <i>kp1_2392(impB) ~ kp1_2400 (vgrG1)</i> 操縱子位置分析	32
3.6	凝膠阻滯分析(Gel retardation assay)實驗	33
3.7	野生型 NTUH-K2044 及其 T6SS 基因剔除株與 Caco-2 細胞之貼附實驗(Cell adherence assay)	34
第四章、	總結與討論	36
第五章、	參考文獻	57
附錄一、	鐵離子濃度對 NTUH-K2044 之 <i>vgrG1</i> 及 <i>vgrG2</i> mRNA 表現量的影響	64
附錄二、	<i>suhB</i> 基因剔除株( $\Delta kp1_0314$ 和 $\Delta kp1_1580$ )之 Hcp 蛋白質表現	65

## 表目錄

表一、本研究使用之引子 .....	40
表二、克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 T6SS 相關基因( <i>hcp</i> 、 <i>vgrG1</i> 、 <i>vgrG2</i> 、 <i>icmF1</i> 和 <i>icmF2</i> )盛行率 .....	43

## 圖目錄



圖一、NTUH-K2044 之 T6SS 基因剔除株對小鼠存活率之影響 .....	44
圖二、NTUH-K2044 之 T6SS 基因組(T6SS gene cluster) .....	45
圖三、克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 Hcp 蛋白質表現 .....	46
圖四、NTUH-K2044 與 <i>E.coli</i> K-12 之 H-NS 胺基酸序列比對結果.....	47
圖五、NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質功能性區域分析.....	48
圖六、野生型 NTUH-K2044、 <i>hns</i> 基因剔除株與 <i>hns</i> 基因補回株之 <i>hcp</i> 、 <i>vgrG1</i> 和 <i>vgrG2</i> mRNA 相對表現量 .....	49
圖七、野生型 NTUH- K2044 與 <i>hns</i> 基因剔除株之 Hcp 蛋白質表現.....	50
圖八、野生型 NTUH-K2044 與 <i>hns</i> 基因剔除株和真核宿主細胞(HL-60, Caco-2 cells) 交互作用後之 mRNA 相對表現量.....	51
圖九、NTUH-K2044 之 T6SS locus-I 之 <i>kp1_2392(impB) ~ kp1_2400 (vgrG1)</i> 操縱子 位置分析結果 .....	52
圖十、NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質純化結果.....	53
圖十一、凝膠阻滯分析結果 .....	54
圖十二、野生型 NTUH-K2044 及 T6SS 基因剔除株與 Caco-2 細胞貼附實驗結果	56


## 第一章、 緒論



### 1.1 克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)與其臨床重要性

克雷伯氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*)最初於 1882 年被一名德國病理微生物學家 Friedlander C. 所發現，屬於腸內菌科(Enterobacteriaceae family)，是一兼性厭氧且不具運動性的革蘭氏陰性桿菌(Gram-negative bacilli)，其細菌外層豐厚的莢膜(capsule)為最大特色，於固態培養基上可觀察到具黏性的菌落外觀。另外，菌體表層會表現兩種抗原，已知與克雷伯氏肺炎桿菌的致病性相關，分別為莢膜多醣體(capsule polysaccharides, K antigen)及脂多醣體(lipopolysaccharides, O antigen)[1, 2]，傳統上多利用血清學方法以 K 抗原來鑑定莢膜型，但因此方法有所受限，現今也會合併利用分子檢測法(molecular typing techniques)來分型[3]，目前加上本實驗室所發表的莢膜新型 KN1~KN5[1, 3-6]，至少存在有 82 種莢膜型；而 O 抗原則已知存在 9 種[1, 2]。

克雷伯氏肺炎桿菌廣泛分布於自然環境當中，像是水域、公共用水、植物和土壤等[7-10]，此外，也被視為人體及小鼠上呼吸道和腸胃道中的正常菌叢(normal flora)[11-13]。然而其亦為臨床上重要的伺機性病原體(opportunistic pathogen)之一，尤其以免疫力低下患者特別容易受到感染，會引起多種臨床病徵，像是肺炎、腦膜炎、泌尿道感染、菌血症等院內型感染(nosocomial infections)[14]，又據研究指出 11.8% 之院內型感染肺炎為克雷伯氏肺炎桿菌所導致[15]。另外，在 1990 年代於台灣首次報導由克雷伯氏肺炎桿菌所引起之社區型化膿性肝膿瘍(community-acquired pyogenic liver abscess, PLA)被視為一種新興疾病[16]，除了會感染免疫力低下患者，亦會對健康人造成嚴重影響。近三十年來，克雷伯氏肺炎桿菌逐漸取代大腸桿菌成為導致 PLA 的主要感染病原[16, 17]，且主要盛行於亞洲地區，其中又以台灣盛行率最高[14]。而目前研究更指出主要造成 PLA 的克雷伯氏肺炎桿菌血清型為 K1 和 K2，其中 K1 佔 46.6%，K2 則佔 20.5% [18, 19]。



過去幾十年來，抗藥性細菌的出現為全球醫療衛生帶來一場無止盡的浩劫。長期處於抗生素藥物環境壓力之下的克雷伯氏肺炎桿菌最常見之抗藥機制為透過利用超廣效性乙內醯胺酶 extended spectrum $\beta$ -lactamases (ESBLs)[20]和碳氫黴烯酶(carbapenemases)[21]來抵禦抗生素的攻擊[22]，然而，有鑑於院內病患大多有接受多種類或是廣效型抗生素治療，因此院內型比社區型感染菌株更加容易演化出多重抗藥性機制[23]，使得在臨床上如何有效且有限制性的使用抗生素來達到最佳的治療策略成為一大挑戰。

## 1.2 革蘭氏陰性細菌獨有之分泌系統(Secretion System)

細菌會利用不同的致病因子(virulence factor)來抵抗宿主的免疫攻擊，並提升能在宿主環境中生存並造成威脅的能力，而細菌分泌蛋白質的過程則為其中一種具關鍵性與宿主互動的策略。細菌會利用特化的精細裝置作為武器將蛋白質從細胞質端穿越過細菌的細胞膜，最終運送至真核宿主細胞、真核宿主環境或是環境中與其競爭之其他細菌，藉此提升細菌本身的致病力(virulence)，以及在宿主中存活的競爭優勢[24, 25]。

目前已知革蘭氏陰性細菌演化出六型獨特的蛋白質分泌系統(type I to type VI secretion system, T1SS to T6SS)[25, 26]，主要是依據不同的結構組成、功能和專一性來分類，而不同的分泌系統本身具有高度多樣性，在細菌間的基因保留度也有所差異[25]。事實上，這六型蛋白質分泌系統也能依據其分泌途徑所需之步驟廣義上分作兩類[26]：其一為單一步驟分泌系統(one-step secretion system)，包括 T1SS、T3SS、T4SS 及 T6SS，這些分泌裝置皆有周質延伸通道(periplasm-spanning channels)[25]，故能直接穿過細菌內膜(inner membrane)和外膜(outer membrane)將蛋白質送出胞外；另一則為兩步驟分泌系統(two-step secretion system)，包括 T2SS 和 T5SS，負責運送已經由 general secretion (Sec) pathway 或是 twin arginine translocation (Tat) pathway 穿過內膜

運送至周質的蛋白質，使穿過外膜後再被送出胞外[25, 26]。




### 1.3 第六型分泌系統(Type VI Secretion System, T6SS)

在已發現眾多的革蘭氏陰性細菌分泌系統中，第六型分泌系統(T6SS)是最近期於 2006 年分別由兩個團隊在霍亂弧菌(*Vibrio cholera*)和綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)上所發現的新型分泌系統，並指出其在病原體與宿主間之互動扮演重要角色，且會影響細菌致病力[27, 28]。已知 T6SS 和 T3SS 及 T4SS 同樣可利用直接接觸的方式(contact-dependent manner)將蛋白質經單一步驟運送至胞外[29, 30]，而 T6SS 的作用目標可以是真核宿主細胞[31]或是細菌[24, 32-35]，但目前對於 T6SS 的生理功能角色和詳細的作用機制仍待更深入研究。

T6SS 廣泛分布於革蘭氏陰性變形菌門(Gram-negative *Proteobacteria*)，25%以上的革蘭氏陰性菌之基因體有 T6SS 基因組的存在[36]，且特別會在  $\gamma$ -變形菌綱(*Gammaproteobacteria*)細菌中大量表現[37]，雖然大部分的細菌僅擁有一套 T6SS 基因組，但在類鼻疽伯克氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)和綠膿桿菌上則分別發現有六套和三套基因組的存在[33, 38]。基本上 T6SS 含有 15 到 20 個保守的 open reading frames (ORFs)，在不同細菌間各個基因的方向性和排列次序也有所變異，但主要都由 13 個保守性高且專一出現於 T6SS 的基因所組成，並以此 13 個蛋白質次單元 type six secretion (TssA-M)組成 T6SS 核心構造[39]，此外，為了要能適應各種環境壓力且特化多種功能，細菌更演化出不同的調節蛋白質(regulatory protein)和附屬蛋白質(accessory protein)來協助分泌系統的組裝和調節蛋白質的運送，藉此也提高了 T6SS 的基因組成多樣性[37]。

特別的是，經結構分析後發現 T6SS 是一種形似 T4 噬菌體(T4 bacteriophage)的針筒裝置，兩者在結構和功能上具有高度演化相似性[40]，其



中 Hcp (Hemolysin co-regulated protein)蛋白質與構成 T4 噬菌體尾管(tail tube)之 gp19 蛋白質在結構與基因序列上有高度相似性[41]，Hcp 蛋白質會形成六聚體環狀結構，其外環和內環直徑分別為 8.5 和 4.0 nm，且會堆疊成長度約 100nm 的中空管狀構造[28]；而 VgrG (Valine-glycine repeat protein G)蛋白質則為一個三聚體結構，與構成 T4 噬菌體尾刺(tail spike)之(gp27/5)<sub>3</sub>複合體有結構相似性[31]，已知 T4 噬菌體會利用(gp27/5)<sub>3</sub>複合體穿刺細菌細胞膜，並注入核酸物質以進行感染[42]。整體就結構而言，VgrG (TssI)三聚體會坐落於 Hcp (TssD)所堆疊的長柱前端，PAAR (Proline-alanine-alanine-arginine repeats containing protein)蛋白質則為最末端構造，三者共同組成 Hcp-VgrG-PAAR 突刺裝置[35]。

目前研究對於 T6SS 的結構模式和作用機制之發現簡述如下：嵌於細胞膜上的 membrane complex (TssJLM)會與嵌於內膜細胞質端的 baseplate complex (TssAEFGK)組裝，提供平台讓包裹 Hcp-VgrG-PAAR 突刺裝置之 cytoplasmic sheath (TssBC)嵌上後聚合。作用蛋白質(effector protein)則透過與結構蛋白質不同的相互作用來承載於突刺裝置中，當細菌與目標細胞接觸後，cytoplasmic sheath 便會收縮進而推動 Hcp-VgrG-PAAR 突刺裝置前進穿越過細胞膜到達目標細胞，並輸出作用蛋白。最後，ClpV (AAA+ ATPase TssH)會被招集至 T6SS 裝置上，透過專一性地辨識 TssC N-terminal helix 以促使 sheath 構造瓦解[43]，而瓦解之蛋白質次單元則會回收提供下一回分泌作用時使用[35]。

另外，研究更顯示 Hcp、VgrG 和 PAAR 結構蛋白質與作用蛋白質的運輸有重要關聯，作用蛋白質依照與結構蛋白質不同的相互作用被分為兩類，其一為 cargo effectors，這類的作用蛋白質會與 Hcp、VgrG 或 PAAR 蛋白質接觸(interaction)幫助維持穩定性且順利運輸至胞外；另一為 specialized effectors，這類的作用蛋白質具有特殊的功能區域(domain)能與 Hcp、VgrG 或 PAAR 蛋白質進行融合(fusion)，一同被分泌至胞外作用[35, 44]。因此，目前研究認為





細菌是否具有健全的 T6SS 裝置及功能性，可根據其是否能於 *in vitro* 實驗條件下分泌 Hcp 或 VgrG 兩種蛋白質來取決[27]，然而，大多數研究多以 Hcp 蛋白質來作為 T6SS 功能性之偵測指標[45]。

迄今，已透過生化和生物資訊分析分法尋找到許多 T6SS 所分泌的作用蛋白質，像是 VgrG protein、PAAR proteins、Rhs-repeat proteins、Non-VgrG effectors、Peptidoglycan- degrading effectors、Lipases 和 Nucleases 等[46]。T6SS 所分泌的多種作用蛋白質和其廣泛的功能使其近來受到更多重視，而在初期的相關研究中因多視 T6SS 為具潛力的致病因子，因此著重於探討 T6SS 在真核宿主細胞與致病原相互作用中的角色[47]，後續也在霍亂弧菌[27]、綠膿桿菌[28]和 *Burkholderia thailandensis*[48]等致病原中證實 T6SS 會影響細菌感染宿主的能力，且 T6SS 基因組之基因若有缺失或變異則會影響多種的細菌表型 (phenotype)，像是貼附力(adhesion)、生存率(survival rate)、細胞毒性(strain cytotoxicity)，或是造成宿主細胞外觀和免疫反應的改變[47]，比較特別的是在霍亂弧菌 V52 菌株中發現其 VgrG1 之 C-terminal 端延長處含有 actin cross-linking domain (ACD)[31]，為一種 evolved VgrG 蛋白質，能與 actin 進行 cross-linking 導致宿主細胞之細胞骨架無法重組而死亡，進而抑制吞噬作用 (phagocytosis)的進行[49]；在綠膿桿菌 PAO1 菌株中則發現其 T6SS 分泌之 phospholipases PldA 和 PldB 能藉由活化 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway 來促進菌體內化(internalization)進入人類上皮細胞中進行感染[50]。

此外，於 2010 年一項驚奇的研究發現綠膿桿菌 PAO1 菌株之 H1-T6SS 所分泌之 Tse1-3 蛋白質可作為毒素用於對抗細菌[32]，之後也證實 Tse1 和 Tse3 分別具有 peptidoglycan amidase 和 muramidase 的酵素活性，能藉此攻擊目標細菌的細胞壁使其滅亡[51]。後續也在霍亂弧菌[34]、*B. thailandensis*[33]和黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)[24]中發現其 T6SS 所分泌之作用蛋白質

皆具有能對抗其他細菌的功能，顯示 T6SS 也參與調節細菌之間的互動，藉此提升在細菌群體中的生存競爭能力，此外，或許也說明為何 T6SS 基因組也廣泛存在於不具致病性的細菌株中。



#### 1.4 細菌對第六型分泌系統之調控機制

目前認為細菌演化出的多種訊息傳遞路徑和細菌所處的環境條件會對 T6SS 的組裝、活化和作用模式進行相當精密的調控：

##### 1.4.1 鐵離子調控機制

細菌的 Ferric-uptake regulator (Fur)蛋白質主要負責調控和鐵相關之基因表現[52]，在有鐵的環境下，Fur 會藉由結合該基因之啟動子(promoter)來抑制基因轉錄；在無鐵的環境下，Fur 則不會結合該基因之啟動子，使 RNA polymerase 可以結合上進行轉錄[53]。而研究指出 Fur 亦會在轉錄層次上抑制 *Edwardsiella tarda*[54]和 enteroaggregative *E. coli* (EAEC)[55]這兩種伺機性腸道致病原之 T6SS 表現，以 *E. tarda* 為例，Fur 會抑制 EvpC (Hcp homolog)之製造和運送，且會結合於 T6SS 基因組第一個基因 *evpP* 上游之 Fur box[54]；而 EAEC 之 Sci-1 T6SS 基因組上游則因含有兩個 Fur box 和三個 Dam methylation sites，故其表現會受到 Dam methylation 和 Fur 的相互調控[55]。

##### 1.4.2 H-NS 蛋白質的調控機制

細菌的 H-NS (Histone-like nucleoid structuring)蛋白質是個對眾多透過水平轉移獲得之基因(horizontally acquired genes)有轉錄調控之抑制性蛋白質[56]，分別有 N-terminal domain 負責調節蛋白質的寡聚合反應(oligomerization)，及 C-terminal domain 負責與目標 DNA 序列結合[57]，且已知 H-NS 最傾向結合並抑制 A/T-rich 基因之表現[58]。目前也發現 H-NS 會藉此抑制 *E. tarda* 的 *evpP* 基因[59]、*Edwardsiella piscicida* 的



*evpB* 和 *evpC* 基因[60]、*Vibrio parahaemolyticus* 的 T6SS1 基因組[61] 和 *Salmonella enterica* 的 SPI-6 T6SS 基因組之表現[62]。

#### 1.4.3 轉錄後調控機制：The Gac/Rsm pathway

一連串的 Gac/Rsm pathway 在 GacS/GacA (BarA/UvrY) two-component system (TCS)受激發時才會啟動。當 GacS (sensor kinase)接收到訊息而活化時便會自體磷酸化(autophosphorylation)，接著受 GacS 磷酸化之 GacA (response regulator)會促進 *rsmB*、*rsmX*、*rsmY*、*rsmZ*、*csrB* 或 *csrC* 等 small regulatory RNA (sRNA)的轉錄，而這些 sRNA 便能調控 mRNA-binding protein (RsmA 或 CsrA)之作用[63]。然而，RsmA 和 CsrA 大部分都是透過結合於 ribosome-binding site 或其相鄰位置的方式來抑制目標 mRNA 的轉譯，故 sRNA 的大量表現主要會促進目標 mRNA 的轉譯[63]。目前在綠膿桿菌研究中發現 RetS (hybrid sensor kinase)會壓制 Gac/Rsm pathway 來對 RsmY/Z 做負向調控，進而抑制 T6SS 的表現[32, 64, 65]，故大部分關於綠膿桿菌 T6SS 之研究都是以 $\Delta retS$ 為基礎來進行實驗。後來更發現 *suhB* 和 *retS* 基因突變株會造成類似的細菌表徵(phenotypes)，像是抑制 T3SS、正向調控 T6SS 和生物膜(biofilm)的生成，且皆是透過 Gac/Rsm pathway 來調控，不一樣的是，RetS 是透過抑制 GacS 的磷酸酶(kinase)活性來控制 GacA，而 SuhB 則是直接控制 GacA 的表現[66]。

#### 1.4.4 群體感應(Quorum sensing)調控機制

Quorum sensing(QS)是一種細菌透過偵測周遭細胞族群密度高低，以傳遞化學訊息分子來調控基因表現的一種機制[67]，且可調控同種或不同種細菌間的社會行為[68]。在霍亂弧菌之研究中發現血清型 O1 菌株 A1552 和 C6707 之 Hcp 表現會受到 HapR (QS regulator)正向調控及 LuxO (QS regulator)的負向調控[69, 70]。不過在霍亂弧菌中要全面性的



活化 T6SS 仍需其他優化條件，像是高滲透壓或低溫的環境[71]。

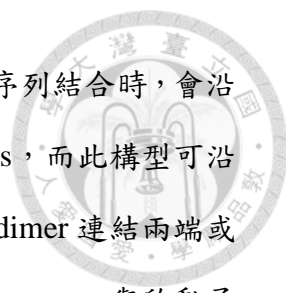
#### 1.4.5 轉譯後調控機制：Threonine phosphorylation pathway

研究發現 PpkA (serine–threonine kinase) 參與調控綠膿桿菌 PAO1 菌株之 H-T6SS 的組裝和 Hcp1 的表現，而 PpkA 的活性會受到 PppA (serine–threonine phosphatase) 所抑制，兩者針對 H-T6SS 基因組所轉譯出之 Fha 蛋白作相反的調控，當 Fha 被 PppA 作用進行去磷酸化時，T6SS 活性就會被壓制，所以在 PppA 突變株細菌可偵測到 T6SS 高度活化之情形[72]。

### 1.5 H-NS (Histone-like nucleoid structuring protein) 蛋白質

H-NS 最早於 1977 年在大腸桿菌中所發現[73]，是其中一種大量存在的 nucleoid-associated proteins (NAPs)，大約每個細胞存有超過 20,000 個 copy 數，參與細菌染色體的組織及濃縮[58, 60, 74, 75]，甚至也參與調控約 5% 的大腸桿菌基因表現[74, 76]。後續研究也指出 H-NS 廣泛存在於革蘭氏陰性菌中[60]，是個對眾多透過水平轉移獲得之基因 (horizontally acquired genes) 有轉錄抑制性的蛋白質[56]，其中許多被調控的基因更與細菌致病力有相關[75]。

大腸桿菌的 H-NS 分子量為 15.5kDa，由 137 個胺基酸所構成[77, 78]，主要以二倍體(dimer)或是多倍體(multimer)的方式作用，每個單倍體(monomer)由負責調節蛋白質寡聚合反應(oligomerization)的 N-terminal domain，及負責與 DNA 序列結合的 C-terminal domain 所組成 [57, 76]。而 H-NS 能調控基因表現的主因為其具有能與 DNA 序列結合的能力形成 nucleoprotein complex[76]，且 H-NS 以不具序列專一性的方式(nonsequence-specific manner)與目標 DNA 結合，但主要傾向與 intrinsically curved AT-rich DNA 結合，常見於啟動子區域[57, 58, 76]，後續則在大腸桿菌中找到一個 H-NS 蛋白質的高親和力結合位置 (High-affinity binding site)，是一段 10-bp 的片段



5'-AATTTATCGA-3'[57, 59, 76, 79]。當 H-NS 與目標 DNA 序列結合時，會沿著 DNA 進行寡聚合反應，形成 H-NS nucleoprotein filaments，而此構型可沿著單股 DNA 連續延展形成 linear filaments，或是透過 H-NS dimer 連結兩端或是兩股 DNA 形成 bridged filaments，藉此方式抑制 RNA polymerase 與啟動子序列結合，或是阻礙 RNA polymerase 的前行，藉此達到抑制轉錄的作用[75, 78]；此外，H-NS 也能與目標 RNA 結合，抑制轉譯的進行[78, 80]。

## 1.6 研究動機

截至目前，T6SS 相關研究多集中於霍亂弧菌和綠膿桿菌，而根據 2011 年 Panagiotis F. Sarris 等人研究，在克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 中比對到兩個 T6SS locus[81]，且本實驗室學姊研究發現，在小鼠腹腔注射 *hcp*、*vgrG1* 或 *icmF1/icmF2* 基因剔除株後，相較於注射野生型 NTUH-K2044 組別，基因剔除株對小鼠的致病力較差，因此小鼠存活率顯著提高(圖一)，故推測克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 之 T6SS 能提升對宿主的感染能力。因此本實驗想深入探討 NTUH-K2044 之 T6SS 有什麼功能性，且會受到何種機制所調控。

## 第二章、 材料方法



### 2.1 材料

#### 2.1.1 克雷伯氏肺炎桿菌之臨床菌株(clinical strains)

本實驗共使用 288 株臨床菌株，分別為 84 株 Carbapenem-resistant KP (於 2010 至 2013 年分離自臺大醫院、榮總醫院、林口長庚醫院及成大醫院)、42 株 Community-acquired PLA-KP(分離自台大醫院)、32 株 Non-invasive 菌株(CT or MR excluded abscess)和 130 株健檢菌株(分離自台大醫院)。克雷伯氏肺炎桿菌以 LB 培養液或固態培養基於 37°C 下培養生長。

#### 2.1.2 其他菌株與質體(plasmids)

菌株或質體名稱	說明	來源(文獻參考)
<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044	Capsular type K1, isolated from a patient with pyogenic liver abscess, meningitis and endophthalmitis	[82]
<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044 $\Delta$ <i>hns</i>	Deletion of <i>hns</i> ( <i>kp1_3314</i> ) in NTUH-K2044	[83]
<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044 $\Delta$ <i>hns</i> :: <i>hns</i>	Chromosomal complementation for $\Delta$ <i>hns</i> using pKO3-Km- <i>pgpAyajO</i> recombinant vector	[83]
<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044 $\Delta$ <i>hcp</i>	Deletion of <i>hcp</i> ( <i>kp1_2398</i> ) in NTUH-K2044	Laboratory stock
<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044 $\Delta$ <i>vgrG1</i>	Deletion of <i>vgrG1</i> ( <i>kp1_2400</i> ) in NTUH-K2044	Laboratory stock

<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044 $\Delta$ <i>vgrG2</i>	Deletion of <i>vgrG2</i> ( <i>kp1_3383</i> ) in NTUH-K2044	Laboratory stock
<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044 $\Delta\Delta$ <i>icmF</i>	Deletion of <i>icmF1</i> ( <i>kp1_2413</i> ) and <i>icmF2</i> ( <i>kp1_3370</i> ) in NTUH-K2044	Laboratory stock
<i>K.pneumoniae</i> NTUH-K2044 $\Delta$ <i>yfgL</i>	Deletion of <i>yfgL</i> ( <i>kp1_4092</i> ) in NTUH-K2044	[84]
<i>E.coli</i> DH10B	Host for DNA cloning	Invitrogen, France
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	F <sup>-</sup> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <i>r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup></i> ) <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3), host for overexpressing proteins driven by T7 promoter	Invitrogen, France
pET-28c	Km <sup>R</sup> , expression vector plasmid	Merck Millipore, Germany

### 2.1.3 培养基(media)

培养基	說明(每公升溶液之內含物)	來源
Luria-Bertani (LB) agar	5 g NaCl, 10 g trypton, 5 g yeast extract, 15 g agar	Bio basic, Ortario, Canada
Luria-Bertani (LB) broth	5 g NaCl, 10 g trypton, 5 g yeast extract	Bio basic, Ortario, Canada

### 2.1.4 抗生素(antibiotics)

抗生素種類	用途/溶劑	來源
Kanamycin	篩選成功轉形之菌株(使用濃度 50 µg/mL)/溶於水	Sigma-Aldrich, St louis, MO, USA



### 2.1.5 引子(primers)

本研究所使用之引子列於表一。

### 2.1.6 HL-60 細胞株培養與分化

HL-60 細胞株(human leukemic cell line)源自一位 36 歲的 acute promyelocytic leukemia (APL)女患者[85]，此細胞可在 *in vitro* 條件下經不同的化學物質，像是 dimethylsulphoxide (DMSO)、retinoic acid (RA)、phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)的作用下分化成 granulocytes、monocytes 和 macrophages[86]。本實驗所使用之 HL-60 細胞株購於新竹食品工業發展所，以額外加有 20 % v/v heated-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco)、100 U/ml penicillin (Gibco)、100 µg/ml streptomycin (Gibco)之 Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco)於 37°C、5 % CO<sub>2</sub>、95 % air 條件下培養，且每隔 2~3 天進行繼代培養(subculture)，細胞密度維持在 10<sup>5</sup>~10<sup>6</sup> cells/mL。應實驗需求，將收下的細胞離心後以新鮮的細胞培養液調整細胞濃度至 10<sup>6</sup> cells/mL/well 於 24-well plate，並以 50 ng/mL PMA (Sigma)與細胞作用一天即能誘使細胞分化成 macrophage-like cells [87]。

### 2.1.7 Caco-2 細胞株培養

Caco-2 細胞株為人類結腸腺癌上皮細胞(human colorectal adenocarcinoma epithelial cells)，本實驗所使用之細胞株購於美國菌種中心(American Type Culture Collection; ATCC)，以額外加有 10 % v/v heated-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco)之 Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium (DMEM, Gibco)於





37°C、5 % CO<sub>2</sub>、95 % air 條件下培養至細胞貼壁生長為單層細胞，待細胞貼滿 80% 時( $8 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$  cell/cm<sup>2</sup>)進行繼代培養，約一週 1~2 次。

## 2.2 方法

### 2.2.1 聚合酶鏈鎖反應(Polymerase chain reaction ; PCR)

依據不同實驗目的所需之目標基因片段設計特異性的引子對(primer pairs)，本實驗所使用之引子序列請參照表一，利用 DNA 聚合酶(Taq polymerase)進行專一性複製，即能放大目標基因片段，藉此能偵測該基因表現的強度或是經由切膠回收得到該產物以進行基因轉殖(cloning)相關之實驗。

#### 步驟：

1. 取 3  $\mu$ L 之克雷伯氏肺炎桿菌菌液於 95°C 加熱 15 分鐘，若所要複製的 DNA 模板(template)來源為大腸桿菌即可省略此步驟。
2. 依所選用之 DNA 聚合酶進行反應物配置。進行一般基因檢測時，多使用校正活性(proofreading activity)較差的 Dream Taq polymerase，而進行基因轉殖時，則使用校正活性較優的 KOD Xtreme 或是 KOD Hotstart Taq polymerase。

Contents	Dream Taq	KOD Xtreme	KOD Hotstart
DNA template	3	3	3
20 mM primer (forward/reverse)	1	0.3	0.3
10X buffer	2	10 (2X buffer)	2
25 mM MgSO <sub>4</sub>	-	-	1.2
2.5 mM dNTP	2	4 (2 mM dNTP)	2 (2 mM dNTP)
Taq polymerase	0.2	0.4	0.4
ddH <sub>2</sub> O	10.8	2	10.8
Total volume		20 $\mu$ L	



3. 於 PCR 儀器設定反應條件，如下：

- (1) 96°C, 3 分鐘
- (2) 96°C, 30 秒 (Denaturation)
- (3) 54°C, 30 秒 (Annealing)
- (4) 72°C, 時間依基因長度調整 (Extension)
- (5) 72°C, 10 分鐘
- (6) 25°C, 5 分鐘

重複步驟(2)~(4)共 30 次

### 2.2.2 聚丙烯醯胺膠體電泳 (Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis ; SDS-PAGE) 與蛋白質染色 (Coomassie blue staining)

SDS-PAGE 之基本原理為利用分子量大小來分離蛋白質，因 SDS 是種界面活性劑，可使蛋白質變性，在其外圍包裹上負電荷，於是在 SDS-PAGE 系統中，樣本分子的泳動率就不受原本分子所帶之電荷影響，僅取決於分子量，故此方法可用於測定樣本中變性蛋白質 (denatured proteins) 之分子量，並藉由後續蛋白質染色方法來粗估欲探討之目標蛋白質的含量，或供進行西方墨點法之使用。而在本實驗中利用此方法來偵測不同的克雷伯氏肺炎桿菌菌株之細胞溶解物 (cell lysate) 中，是否存在有 Hcp 蛋白質；另外，則是用於確認 H-NS 蛋白質之純化結果。

#### 試劑：

1. 2X loading sample buffer

Contents	Volume (mL)	Final concentration
1 M Tris-HCl (pH 6.8)	1	100 mM
100 % Glycerol	2	20 %
20 % SDS	2	4 %
Bromophenol blue	optimal	0.2 %
1 M DTT	2	200 mM

ddH <sub>2</sub> O	-	Add to total volume 10 mL
2. 5X Tris - glycine running buffer (pH 8.3) (Medicago, Sweden)		
<b>Contents</b>	<b>Amount</b>	<b>Final concentration</b>
Tris	15.1 g	0.025 M
Glycine	94.0 g	0.192 M
20 % SDS	25 mL	0.1 %
ddH <sub>2</sub> O	---	Add to total volume 1 L

3. SDS-PAGE gel preparation (兩片 10 cm x 8 cm 膠量)

<b>Contents</b>	<b>Stacking gel</b>	<b>Separation gel</b>
	<b>(5 % acrylamide)</b>	<b>(12 % acrylamide)</b>
ddH <sub>2</sub> O	2.89 mL	4.35 mL
40 % acrylamide mix	0.5 mL	3 mL
1.5 M Tris (pH6.8) (AMRESCO)	0.5 mL	-
1.5 M Tris (pH8.8) (AMRESCO)	-	2.5 mL
20 % SDS	0.02 mL	0.05 mL
10 % APS	0.04 mL	0.1 mL
TEMED	0.004 mL	0.004 mL
Total	~4 mL	~10 mL

4. Coomassie blue dye

<b>Contents</b>	<b>Amount</b>
Brilliant blue R-250 (BioShop, Canada)	1.25 g
Methanol	225 mL
Acetate	50 mL
ddH <sub>2</sub> O	Add to total volume 500 mL

5. Destain buffer

Contents	Amount
Methanol	75 mL
Acetate	100 mL
ddH <sub>2</sub> O	Add to total volume 1 L



### 步驟：

#### 1. 準備待測樣本

(1) 取 250  $\mu$ L 經隔夜培養之克雷伯氏肺炎桿菌菌液，經 13,000 rpm 離心 10 分鐘後，丟棄上清液，加入 20  $\mu$ L lysis buffer (同 RNA lysis buffer) 混勻後，以 100°C 加熱 10 分鐘，接著經 13,000 rpm 離心 10 分鐘，收取上清液與等體積之 2X loading sample buffer 均勻混合。

(2) 取適量純化之 H-NS 蛋白質與等體積之 2X loading sample buffer 均勻混合後，以 100°C 加熱 5 分鐘。

備註：經煮沸處理過之蛋白質樣本在未進行電泳前先保存於 -20°C 冰箱。

#### 2. 架設 Hoefer dual gel caster (Amersham Biosciences)。

#### 3. 製作 SDS-PAGE 膠體：先注入 Separation gel，後注入 Stacking gel。

#### 4. 等待膠體凝固後置於垂直電泳槽 (SE250 Mighty Small II, Amersham Biosciences) 中，倒入 1X running buffer 後，即可以 loading tip 取適量蛋白質樣本與 Protein Marker 注入孔槽中。

#### 5. 於 250 V、50 mA (25 mA/per gel) 條件下進行電泳約 2~3 小時。

#### 6. 將膠體置於染色盒中，倒入適量 Coomassie blue 染劑(以蓋過膠體為主)，於 shaker 上輕輕搖擺 15 分鐘。

#### 7. 將染色盒中之染劑倒掉，加入退染劑 (Destain buffer) 覆蓋過膠體，並於染色盒兩側置入紙片幫助退染，於 shaker 上輕輕搖擺隔夜至背景完全透明。



### 2.2.3 西方墨點法(Western Blot)

西方墨點法之原理為利用抗體能夠特異性地結合到目標蛋白質，因此可用於偵測膜上的目標蛋白，又此方法敏感度高，能偵測微量的蛋白質樣本。本實驗以此方法偵測不同的克雷伯氏肺炎桿菌菌株之細胞溶解物(cell lysate)中是否存有 Hcp 蛋白質；另外，則用於確認所純化之 H-NS 蛋白質含量及純度。

#### 試劑：

#### 1. Western transfer buffer (pH 8.3)

Contents	Amount
Tris	2.9 g
Glycine	5.8 g
20 % SDS	1.85 mL
Methanol	200 mL
ddH <sub>2</sub> O	Add to total volume 1 L

#### 2. Blocking Buffer

1X PBS + 0.1 % Tween20 + 5 % 安佳脫脂奶粉(Fonterra, New Zealand)

#### 3. Washing Buffer (PBST buffer)

1X PBS + 0.1 % Tween20

#### 4. Antibodies (diluted in blocking buffer)

##### (1) 偵測 Hcp 蛋白質

抗體	稀釋倍數	用途	來源
Rabbit anti- <i>Kp</i> Hcp	1:100,000	Primary antibody	LTK Biolaboratories, Taiwan
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1: 10,000	Secondary antibody	Jackson ImmunoResearch

##### (2) 偵測 H-NS 蛋白質

抗體	稀釋倍數	用途	來源
Mouse anti-his antibody	1: 10,000	Primary antibody	Jackson ImmunoResearch
Goat anti-mouse IgG-HRP	1: 10,000	Secondary antibody	Jackson ImmunoResearch

#### 5. Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (ECL, Merk Millipore)

##### 步驟：

1. 先將 filter papers 和 Amersham Protran 0.45  $\mu\text{m}$  Nitrocellulose membrane (General Electric Healthcare Life Science, U.S.A.)依完成 SDS-PAGE 之膠體大小做適當剪裁後，浸於 transfer buffer 當中。
2. 以 transfer buffer soaked filter papers (3 張)  $\rightarrow$  NC membrane  $\rightarrow$  polyacrylamide gel  $\rightarrow$  transfer buffer soaked filter papers (3 張)之順序(正極 $\rightarrow$ 負極)堆疊於半乾式轉漬槽(HANDO)中，以 12 mV、13 分鐘之條件，將蛋白質轉印到 NC membrane 上。
3. 完成轉印後，將 NC membrane 浸於含 blocking buffer 的塑膠盒中，室溫下緩慢搖晃至少 1 小時。
4. 倒掉 blocking buffer 後，將 NC membrane 浸於加有一級抗體的 blocking buffer 中，4 $^{\circ}\text{C}$ 下緩慢搖晃使雜交隔夜。
5. 隔日以 Washing buffer 清洗 NC membrane 3 次(每次搖晃 10 分鐘)。
6. 將 NC membrane 浸於加有二級抗體的 blocking buffer 中，室溫下緩慢搖晃 1~2 小時。
7. 以 Washing buffer 清洗 NC membrane 3 次(每次搖晃 10 分鐘)。
8. 以拭鏡紙去除 NC membrane 上多餘的溶液後，加入經等比例調和的 ECL 試劑(HRP substrate luminol reagent : HRP substrate peroxide solution = 1 : 1)，避光呈色 1 分鐘。




9. 在暗房以醫用感藍 X 射線膠片 Super RX (Fujifilm, Japan) 壓片成像。

#### 2.2.4 萃取克雷伯氏肺炎桿菌之 RNA

本實驗使用 RNeasy mini kit (QIAGEN)，依使用手冊建議步驟進行實驗，且使用 RNase-Free DNase Set (QIAGEN) 來降低細菌 DNA 的汙染。為了避免 RNase 在實驗過程中造成 RNA 降解，需全程穿戴實驗衣和口罩，且實驗前以 RNase out 擦拭實驗桌及器具。此外，實驗中所使用之 1.5 mL 離心管(ependorf)及微量吸管(tips)皆經 0.1 % diethylpyrocarbonate (DEPC) ddH<sub>2</sub>O 浸泡作用隔夜，並經高溫滅菌處理。

##### 步驟：

1. 將經過 37°C 隔夜培養之克雷伯氏肺炎桿菌菌液，以 1:100 稀釋接種於 LB 培養液中，再於 37°C 下培養約 2 小時至 log phase (OD<sub>600</sub> 接近 1.0)。
2. 取 1 mL 菌液於 1.5 mL 離心管中，室溫 13,000 g 離心 15 分鐘後，去除上清液。
3. 加入 250  $\mu$ L Lysis buffer (20 mM sodium acetate, pH5.5、1 mM EDTA、0.5 % SDS) 均勻混合，並以 100°C 作用 5 分鐘使破菌。
4. 加入含 2-Mercaptoethanol ( $\beta$ -ME) 之 350  $\mu$ L RLT buffer (10  $\mu$ L  $\beta$ -ME/1 mL RLT buffer)，震盪均勻混合。
5. 室溫下 13,000 g 離心 2 分鐘，將上清液取至新的 1.5 mL 離心管中。
6. 加入 250  $\mu$ L 100% ethanol，以 pipetting 方式均勻混合。
7. 將溶液吸取至 RNeasy mini 管內，室溫下 13,000 g 離心 15 秒。
8. 加入 350  $\mu$ L RW1 buffer 後，室溫下 13,000 g 離心 15 秒。
9. 加入含 10  $\mu$ L DNase 及 70  $\mu$ L RDD buffer 混合液，室溫靜置反應 30 分鐘。
10. 加入 350  $\mu$ L RW1 buffer 後，室溫下 13,000 g 離心 15 秒。
11. 加入 500  $\mu$ L RPE buffer 後，室溫下 13,000 g 離心 15 秒。

- 
12. 全速離心 2 分鐘後將 RNeasy mini 管移至新的 1.5 mL 離心管中。
  13. 以 40~50  $\mu$ L RNase-free water 回溶，靜置 5 分鐘後，再全速離心 2 分鐘。
  14. 為避免樣品降解需立即至於冰上，接續使用 Nanodrop 2000C (Thermo)測定  $OD_{260/280}$  吸光值來估計萃取樣品之濃度與純度，並經適當稀釋後以新鮮當天配置之 1 % 洋菜膠進行電泳，確認樣品之品質，而剩餘樣品則保存於  $-80^{\circ}\text{C}$ 。

## 2.2.5 反轉錄定量聚合酶鏈鎖反應(Quantitative real-time reverse-transcription

### PCR ; RT-qPCR)

本實驗為了測定 *hcp*、*vgrG1*、*vgrG2* 和 *hns* 之基因表現量，於不同實驗條件需求下萃取克雷伯氏肺炎桿菌之 total RNA，接著利用 SuperScript IV<sup>TM</sup> Reverse transcriptase (Invitrogen)將萃取出之 RNA 反轉錄成 cDNA，再進行後續上機操作。RT-qPCR 之原理為在 PCR 複製微量樣本 DNA 的同時，經光學系統即時偵測產物隨 PCR cycle 數的增加之螢光值變化量，藉由分析 PCR cycle 數和螢光數值來推算樣品中原始基因的表現量。本實驗使用 KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix，利用 SYBR Green 螢光會嵌入雙股 DNA 之特性來標定基因產物，並以 API-7900 Real-time PCR 儀器分析，當 PCR 反應樣本數擴增達閾值(threshold)時，其相對應之 PCR cycle 數即為 Ct 值(Ct value)，又 Ct 值與樣本原始基因表現量呈負相關。此外，本實驗也會以細菌 23S rRNA 之 Ct 值進行標準化(normalization)，且於 RT-qPCR 反應中搭配 melting curve 分析，確認是否有非專一性的 PCR 產物或是 primer dimer 之形成。

#### 步驟：

##### 1. SuperScript<sup>®</sup> IV First-Strand cDNA synthesis Reaction

(1) Anneal primer to template RNA(每管反應物配置如下)：

Contents	Amount
RNA template (100 ng/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L (400 ng)





160X diluted random primer	2 $\mu$ L
25 mM dNTP	1 $\mu$ L
DEPC H <sub>2</sub> O	Add to total volume 13 $\mu$ L

→以 65°C 加熱 RNA-primer mix，接著冷卻於 4°C 至少一分鐘。

(2) Prepare RT reaction mix (每管反應物配置如下)：

Contents	Amount
5X SSIV Buffer	4 $\mu$ L
100 mM DTT	1 $\mu$ L
RNase OUT <sup>TM</sup> Recombinant Ribonuclease Inhibitor	1 $\mu$ L
SuperScript <sup>®</sup> IV Reverse transcriptase (200U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

反應條件：23°C, 10 分鐘 → 50~55°C, 10 分鐘 → 80°C, 10 分鐘

備註：反轉錄後之 cDNA 保存於-20°C 冰箱。

## 2. Real-time PCR

每管反應物配置如下：(置於 96 孔盤中進行偵測)

Contents	Volume
50X diluted cDNA template	5 $\mu$ L
2X KAPA master mix	12.5 $\mu$ L
5 mM primer (forward/reverse)	1 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	Add to total volume 25 $\mu$ L

備註(1)：本實驗以 Primer Express 3.0 軟體設計引子對，序列請參照表一。

備註(2)：每個樣本會進行二重複，且帶 non-template control。

API-7900 Real-time PCR 儀器反應條件如下：

(1) 50°C, 2 分鐘

(2) 95°C, 2 分鐘

(3) 95°C, 15 秒 → 60°C, 30 秒 (重複 50 個循環)



- (4) 新增 dissociation curve stage : 95°C, 15 秒 → 60°C, 15 秒 → 95°C, 15 秒
3. 利用 23S rRNA 作為校正 $\Delta\Delta Ct$  值之基準，計算公式如下：
- (1)  $\Delta Ct = Ct_{\text{target gene}} - Ct_{23S \text{ rRNA (內部校正點)}}$
  - (2)  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{sample}} - \Delta Ct_{\text{calibrator (比較基準點)}}$
  - (3) 帶入公式  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ ，即可計算相對 RNA 表現量之倍率

### 2.2.6 克雷伯氏肺炎桿菌與真核細胞株交互作用模式

#### 步驟：

1. 接種細胞：
  - (1) HL-60 細胞株：將培養至 log phase 之細胞收下，以新鮮之 IMDM (+20 % v/v FBS) 細胞培養液調整細胞濃度至  $10^6$  cell/mL，再加入 50 ng/mL PMA 使細胞分化成 macrophage-like cells，最後以  $10^6$  cell/1mL/well 種於 24 孔盤中，於 37°C、5 % CO<sub>2</sub>、95 % air 條件下培養隔夜。
  - (2) Caco-2 細胞株：收取貼滿 75 cm<sup>2</sup> flask 之 80% 面積的單層細胞，以 4 mL 胰蛋白酶 (Trypsin, Gibco) 作用約 15 分鐘後打下細胞進行細胞數計數，經 200g 離心 10 分鐘後，以新鮮 DMEM (+10 % v/v FBS) 細胞培養液調整細胞濃度至  $10^6$  cell/mL，最後以  $10^6$  cell/1mL/well 種於 24 孔盤中，於 37 °C、5 % CO<sub>2</sub>、95 % air 條件下培養隔夜。
2. 將隔夜之細胞培養液吸棄，加入經細胞培養液 (w/o FBS) 稀釋 10 倍之隔夜培養的克雷伯氏肺炎桿菌菌液 (1 mL/well)，multiplicity of infection (MOI) 約為 1000 (bacteria/cell)。為了要同步細菌與細胞的接觸作用 (synchronize interaction)，室溫下離心 200 g，5 分鐘，接著於 37°C 培養箱中感染 2 小時。
3. 感染後，分別收取三個部分的細菌體
  - (1) Unbound bacteria fraction (culture supernatant)：

將細胞外感染液吸取集於 1.5 mL 離心管中，經全速離心去除上清液後，即



可加入 RNA lysis buffer，進行後續的 RNA 萃取操作與分析。

(2) Cell-associated bacteria fraction：

在移除細胞外感染液後，以 1X phosphate-buffered saline (PBS) 沖洗 5 次(1 mL/well)，加入含 0.2 % Triton-X (Sigma, St. Louis, USA) 之 RNA cell lysis buffer，用以打破細胞及細菌，接著收取 lysate 集於 1.5mL 離心管中，進行後續的 RNA 萃取操作與分析。

(3) Bacteria cultured in cell-free medium：

收取培養於不含細胞之培養液中的克雷伯氏肺炎桿菌，經全速離心去除上清液後，即可加入 RNA lysis buffer，進行後續的 RNA 萃取操作與分析。(本實驗以此做為 RT-qPCR 分析結果的相對比較值)

### 2.2.7 Caco-2 細胞貼附試驗(Cell adherence assay)

**步驟：**

1. 收取貼滿 75 cm<sup>2</sup> flask 之 80% 面積的單層細胞，以 4 mL 胰蛋白酶作用約 15 分鐘後打下細胞進行細胞數計數，經 200 g 離心 10 分鐘後，以新鮮之 DMEM (+10 % v/v FBS) 細胞培養液調整細胞濃度至 10<sup>6</sup> cell/mL，最後以 10<sup>6</sup> cell/1 mL/well 種於 24 孔盤中，於 37°C、5 % CO<sub>2</sub>、95 % air 條件下培養隔夜。
2. 將隔夜之細胞培養液吸棄後，加入經細胞培養液(w/o FBS)稀釋 10 倍之 refresh 培養至 OD<sub>600</sub>=1.0 (~10<sup>8</sup> CFU/mL) 之克雷伯氏肺炎桿菌菌液(1 mL/well)，MOI = 10，於 37°C、5 % CO<sub>2</sub> 環境下共同培養(coincubation)20 分鐘。
3. 反應後吸棄培養上清液，以 PBS 洗滌 4 次(1 mL/well)，用以去除未貼附之細菌。加入 0.5 mL 含有 0.2 % Triton X-100 之 PBS 作用 10~15 分鐘，用以打破細胞並打散細菌。
4. 以 PBS 稀釋適當倍數後塗於 LB 固態培養基上，隔夜培養後進行菌落計數。
5. 相對貼附能力(Relative adherence %)：以野生型 NTUH-K2044 (wild-type) 的貼

附比例作為比較基準(100%)，即得到其他突變菌株的相對黏附百分比。



## 2.2.8 NTUH-K2044 之 T6SS locus-I 之 *kp1\_2392(impB)* ~ *kp1\_2400(vgrG1)* 操縱子 (operon) 位置分析

### 步驟：

1. 萃取克雷伯氏肺炎桿菌之 total RNA，並經反轉錄得到 cDNA 樣本。
2. 在所欲檢測之基因範圍內，於各個基因間之交接處(junction)設計引子對，引子序列請參照表一。
3. 分別以克雷伯氏肺炎桿菌之菌液、mRNA 和 cDNA 作為模板，以不同引子對進行 PCR，接著以洋菜膠電泳圖分析結果，若菌液與 cDNA 樣本有同樣之 DNA 訊號，則代表前後基因同屬於一個操縱子中；反之則非。

## 2.2.9 表現及純化克雷伯氏肺炎桿菌之 H-NS 蛋白質

### 步驟：

1. 建構帶有克雷伯氏肺炎桿菌之 *hns* 基因序列之質體 pET-28c
  - (1) 根據所欲接入質體 pET-28c 之位置附近帶有的限制酶切位，來設計具有專一性切位之引子對，且僅保留 N 端的 His<sub>6</sub>-tag。
  - (2) 以克雷伯氏肺炎桿菌為模板，利用引子 Nde-I-HNS-F/Xho-I-HNS-R 將含有 *hns* 基因序列，且帶有 *NdeI* 及 *XhoI* (NEB) 限制酶切位之序列進行 PCR 放大。
  - (3) 將步驟(2)經 DNA 電泳後切膠回收之產物與質體 pET-28c，以 *NdeI* 及 *XhoI* 限制酶於 37°C 作用 3.5 小時或隔夜，每管內容物配置如下：

Contents	Amount
DNA	3 µg
10X CutSmart buffer (NEB)	5 µL



<i>Nde</i> I	1 μL
<i>Xho</i> I	1 μL
ddH <sub>2</sub> O	Add to total volume 50 μL

(4) 將步驟(3)經 DNA 電泳後切膠回收之 insert 與 vector 進行接合(ligation)，於室溫下作用至少 3 小時或於 16°C 作用隔夜，每管內容物配置如下：

Contents	Amount
insert	A
vector	B
10X T4 DNA ligase buffer (NEB)	2 μL
T4 DNA ligase (NEB)	1 μL
Total volume	20 μL

備註：insert 與 vector 體積量依下列公式計算

$$\frac{[\text{insert}] \text{ ng}}{[\text{insert}] \text{ bp}} : \frac{[\text{vector}] \text{ ng}}{[\text{vector}] \text{ bp}} = 5 : 1$$


(5) 將 ligation product 以熱休克(heat-shock)方式轉形(transformation)至 *E.coli* DH10B 勝任細胞(competent cells)中，最後塗盤於含有 50 μg/mL kanamycin 之 LB 固態培養基上進行篩選，於 37°C 隔夜培養。

(6) 於固態培養基上挑選經抗生素篩選後長出的菌落，以 vector 上之引子 T7-promoter/T7-terminator，搭配 insert 上之引子 HNS-F/HNS-R，以 PCR 確認是否成功轉殖。確認後抽取轉殖成功之質體，送 DNA 定序(sequencing) 確認欲接入之基因序列無誤。

## 2. 純化克雷伯氏肺炎桿菌 H-NS 蛋白質

(1) 將帶有克雷伯氏肺炎桿菌 *hns* 基因序列之質體(pET-28c::*hns*)次轉殖於 *E.coli* BL21 (DE3)中，同樣以 50 μg/mL kanamycin 進行篩選。

(2) 於固態培養基上挑選數個經抗生素篩選後長出的菌落於 kanamycin-LB broth 中，在 37°C 培養箱中震盪培養至 OD<sub>600</sub> 約 1.0。

- 
- (3) 取步驟(2)新鮮培養菌液於含有 200 mL kanamycin-LB broth 之 1 L 錐形瓶中，在 37°C 培養箱中震盪培養約 4~5 小時。
  - (4) 取 1 mL 菌液於 1.5 mL 離心管，離心後留下 pellet，以 100  $\mu$ L 2X loading sample buffer 回溶，作為 Non-induced control，保存於-20°C。
  - (5) 加入 0.5 mM IPTG (Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside)誘導蛋白質表現，且於 16°C 培養箱中震盪培養約 16 小時。
  - (6) 取 1 mL 菌液於 1.5 mL 離心管，離心後留下 pellet，以 100  $\mu$ L 2X loading sample buffer 回溶，作為 Induced control，保存於-20°C。
  - (7) 於 4°C 下 6,000 g 離心 10 分鐘，去除上清液，將 pellet 存於-80°C，2~3 小時。
  - (8) 約每 1 mL 菌液加入 100  $\mu$ L lysis buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、300 mM NaCl、10 mM imidazole, PH 8.0)混勻，置於冰上。
  - (9) 進行超音波震盪破菌(sonicate 120 x 5 s with 5 s pause)。
  - (10) 在 4°C 下 10,000 g 離心 10 分鐘。
  - (11) 在進行步驟(10)離心時，先取 100  $\mu$ L 的 Ni-NTA magnetic agarose beads 於 50 mL 離心管中以適量的 lysis buffer 進行洗滌，接著將步驟(10)離心所得之上清液取至加有 beads 之 50 mL 離心管中。
  - (12) 在搖擺儀上於 4°C 作用隔夜或是於室溫下作用至少一小時。
  - (13) 以 wash buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, PH 8.0) 沖洗 5 次，最後一次要將殘留的 buffer 徹底吸去。
  - (14) 以適量約 100  $\mu$ L~300  $\mu$ L 的 Elution buffer (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole, PH 8.0)沖出所欲純化之蛋白質產物。
  - (15) 利用 SDS-PAGE、蛋白質染色和西方墨點法確認所純化的 H-NS 蛋白質樣本，其表現量及分子量是否落於所預測值。



### 2.2.10 凝膠阻滯分析(Gel retardation assay)

凝膠阻滯分析(Gel retardation assay)，又名 Gel shift assay 或是 Electrophoretic Mobility Shift Assay(EMSA)，是種用於檢測 DNA 結合蛋白質和 DNA 序列相互作用的技術。通常以最後偵測 DNA 訊號的方式來選擇不同的 DNA 標記方法，接著與所純化之蛋白質或是細胞核萃取物反應，經非變性凝膠(native polyacrylamide or agarose gel)電泳後再進行結果分析，原理為當目標 DNA 片段與蛋白質相互結合時，所形成的 DNA-蛋白質複合物之泳動速相較於游離的 DNA 片段會有變慢的情形，故可見一大一小不同位置的 DNA 訊號，也就是「阻滯」的現象。因此，本實驗利用此方法分析所純化之 His<sub>6</sub>-H-NS 蛋白質是否能與所挑選之 DNA 片段結合，此外，也會透過加入特異性抗體的方式，觀察是否有 supershift 的情形，以確認 DNA-蛋白質結合的特異性。

#### 試劑：

1. 10X Binding Buffer (1 mL, 100 mM Tris, 500 mM KCl, 10 mM DTT; pH 7.5)
2. 50X TAE beffer (Protech Technology Enterprise Co., Ltd.)
3. 其他添加物
  - (1) 50 % Glycerol (Thermo)
  - (2) 100 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo)

#### 步驟：參照 LightShift<sup>®</sup> Chemiluminescent EMSA Kit manual (Thermo)做調整

1. 製備 DNA 片段：
 

以引子對 New-364F/New-527R、Test-hcp-F/f-R 和 T6SS-NC-F/ T6SS-NC-new-R 經 PCR 分別放大目標 DNA 片段 F1 (241bp)、F2 (308bp)和作為 negative control 的 DNA 片段(110bp)，經洋菜膠電泳後切膠回收產物。
2. 製備欲探討之 DNA 結合蛋白質(H-NS 蛋白質)，詳見方法 2.2.8。
3. Perform Binding Reactions (每管內容物配置如下)

Contents	Final amount	Reaction
----------	--------------	----------

		#1	#2	#3
ddH <sub>2</sub> O	---	---	---	---
10X Binding Buffer	1X	2 μL	2 μL	2 μL
50 % Glycerol	2.5 %	1 μL	1 μL	1 μL
100 mM MgCl <sub>2</sub>	5 mM	1 μL	1 μL	1 μL
His <sub>6</sub> -H-NS extract	0~5 μg	0	---	---
室溫下靜置 10 分鐘				
Target DNA	200 ng	---	---	---
室溫下靜置 20 分鐘				
Mouse anti-his antibody	1/40X	0	0	0.5 μL
室溫下靜置 30 分鐘				
Total volume	---	20 μL	20 μL	20 μL

備註(1)：加入 His<sub>6</sub>-H-NS extract 和 Target DNA 的順序會影響 DNA-蛋白的結合專一性，故本實驗中按上述順序由上往下添加反應內容物至 1.5mL 離心管中。

備註(2)：Reaction #1 為不含 His<sub>6</sub>-H-NS extract 的 negative control 組。

Reaction #2 為含有遞增濃度 His<sub>6</sub>-H-NS extract 的反應組。

Reaction #3 加入 Mouse anti-his antibody 以檢測 supershift 之情形。

#### 4. Electrophoresis Binding Reactions

結束反應後，吸取 1.5 mL 離心管中之反應液，添加適量 6X DNA loading dye 後(過量會影響 DNA 與蛋白質的結合)，注入浸於 1X TAE buffer 之 1.5 % 洋菜膠中，在 100 V, 400 mA 條件下進行電泳約 45 分鐘。

5. 結束電泳後，將膠體浸於 EtBr 盒中染色約 15 分鐘，即可照膠觀測結果。



## 第三章、 結果



### 3.1 研究策略

根據 Panagiotis F. Sarris 等人研究指出，將不同的克雷伯氏肺炎桿菌菌株基因序列透過 BLASTP、BLASTN 和 reverse BLAST 與綠膿桿菌 Hcp secretion islands I、II、III (HSI-I, II, III) 和大腸桿菌的 T6SS 基因組分析比對後，發現克雷伯氏肺炎桿菌基因體擁有廣泛存於革蘭氏陰性細菌之 13 個保守基因 (conserved genes)，且認為 T6SS 能幫助克雷伯氏肺炎桿菌在宿主中定植 (colonization) 及感染 [81]。而這 13 個保守基因被分作兩個片段，分別為 *vgrG* gene cluster (*vgrG/clpV/hcp/ompA/dotU/impJ/impC/impB*) 和 *icmF* gene cluster (*icmF/impG/impH/sciN/impF*)，且散布於相鄰的兩個或三個 gene locus 上。有趣的是，相較於其他被定義出三個 T6SS 基因組 (T6SS locus-I, II, III) 的克雷伯氏肺炎桿菌菌株 (*K. pneumoniae* 342、*K. pneumoniae subsp. pneumoniae* MGH 78578 和 *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* ATCC 13884)，在本實驗中所欲探討的研究對象克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 基因體中僅比對到 T6SS locus-I 和 locus-III，其中 T6SS locus-I 同時包含有完整的 *vgrG* 及 *icmF* gene cluster [81]。故我們以此為研究基礎在 NCBI 基因資料庫中尋得 NTUH-K2044 的 T6SS locus-I (*kp1\_2392~kp1\_2421*) 和 locus-III (*kp1\_3362~kp1\_3388*) 之完整基因組，其分別包括有 26 個和 25 個基因編碼序列，詳見圖二。

### 3.2 克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 T6SS 相關基因盛行率

在 T6SS 突刺裝置中 Hcp、VgrG 及 IcmF 蛋白質分別構成 tube protein、spike protein 和 membrane-bound protein，其中 Hcp 及 VgrG 除了作為結構蛋白質外，也會被順帶分泌出細胞外，而 IcmF 則為確保 Hcp 蛋白質順利分泌的重要因子 [27, 28]，故我們認為這三個蛋白質對 T6SS 的組裝和功能扮演極重要的角色。因此，首先針對這五個基因設計專一性的引子，以聚合酶鏈鎖反應方法分別偵測 *hcp* (locus-I)、*vgrG1* (locus-I)、*vgrG2* (locus-III)、*icmF1* (locus-I) 和 *icmF2* (locus-III) 基因是否存在

在於實驗室所蒐集之 84 株 CRKP (carbapenem-resistant *K.p*)、42 株分離自 PLA (pyogenic liver abscess) 病人菌株、32 株 non-invasive 菌株和 130 株健檢菌株 (colonized strains) 中，藉此初步了解 T6SS 相關基因在克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株的盛行率。

結果發現，在各種不同分離來源的臨床菌株皆可偵測到 *hcp*、*vgrG1*、*vgrG2*、*icmF1* 和 *icmF2* 基因的存在，僅少部分的 non-invasive 菌株(2/32)、CRKP 菌株(2/84) 和健檢菌株(12/130)完全沒有偵測到任何基因的存在，其中又以 PLA 菌株同時具有 *hcp*、*vgrG1*、*vgrG2*、*icmF1* 和 *icmF2* 基因之比率為最高(32/42, 76.19%)。此外，在 PLA 菌株中，這五個基因的盛行率相較於其他的臨床菌株，幾乎皆有顯著上的差異，尤其和健檢菌株的差異最為明顯(詳見表二)，暗示著 T6SS 在 PLA 菌株中可能扮演重要的角色，故本研究挑選 NTUH-K2044 作為 PLA 代表菌株，並作為後續實驗中其他 T6SS 相關基因剔除株的母株(parent strain)。

### 3.3 克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 Hcp 蛋白質的表現

為了探究克雷伯氏肺炎桿菌是否有健全的 T6SS 裝置，我們隨機挑選 47 株 *hcp<sup>+</sup>vgrG1<sup>+</sup>vgrG2<sup>+</sup>icmF1<sup>+</sup>icmF2<sup>+</sup>* 菌株，利用西方墨點法偵測其是否能表現 Hcp 蛋白質。結果發現經 LB broth 搖晃(shaking)隔夜培養之下，所收取之細菌細胞溶解物並沒有偵測到 Hcp 蛋白質的表現，詳見圖三。

### 3.4 NTUH-K2044 對 T6SS 的調控機制

就前述結果發現克雷伯氏肺炎桿菌之 T6SS 在一般 *in vitro* 的培養條件下不會被偵測到 Hcp 蛋白質的表現，可能是受不明機制所壓抑，致使表現量太低而無法測得。目前認為細菌所演化出的多種訊息傳遞路徑和細菌所處的環境條件會對 T6SS 的組裝、活化和作用模式進行精密調控，近幾年有多篇研究指出 H-NS 會對革蘭氏陰性菌之 T6SS 相關基因表現做負向調控，因此我們想進一步探究 H-NS



是否也參與克雷伯氏肺炎桿菌 T6SS 的調控，又與真核宿主細胞相互作用後其 T6SS 是否能被誘發而提升表現量。

### 3.4.1 尋找 NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質

首先，在 NCBI 基因資料庫中找到克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 之 *hns* 基因(*kp1\_3314*)，經胺基酸序列比對後發現其與大腸桿菌 K-12 之 H-NS 有 94.07% 相似性(軟體 Clustal Omega)，詳見圖四。而 NTUH-K2044 之 H-NS 由 135 個胺基酸組成，分子量約為 15.3kDa，利用線上軟體 InterPro 分析其胺基酸序列後，有比對到典型的 H-NS 蛋白質功能性區域，其胺基酸殘基 1~57 構成 N-terminal domain (oligomerization domain)，而胺基酸殘基 87~135 則構成 C-terminal domain (DNA-binding domain)，詳見圖五。

### 3.4.2 NTUH-K2044 之 H-NS 對 T6SS 相關基因或蛋白質表現的影響

首先，想探討 H-NS 對 T6SS 相關基因表現的影響，於是分別抽取野生型 NTUH-K2044 (wild-type)、*hns* 基因剔除株( $\Delta hns$ )[83]和 *hns* 基因補回株( $\Delta hns::hns$ )[83]之 RNA 進行即時定量聚合酶鏈鎖反應，分析 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* 之 mRNA 表現量。結果發現，相較於野生型 NTUH-K2044，*hns* 基因剔除株之 *hcp* mRNA 表現量有約 12 倍顯著上升( $p < 0.01$ )，而 *vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 表現量則分別有約 6.9 倍( $p < 0.01$ )、3.8 倍( $p < 0.001$ )的上升，另外，在 *hns* 基因補回株的部分，符合預期地有看到 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* 之 mRNA 表現量回復至與野生型菌株相當之值，詳見圖六。故我們認為 H-NS 會在轉錄層次上負向調控 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 表現量，因此下一步想了解 H-NS 是否會影響 Hcp 蛋白質的表現，於是以西方墨點法進行分析，結果發現，在一般的 LB broth 培養下，所收取的野生型 NTUH-K2044 之細菌細胞溶解物並無偵測到 Hcp 蛋白質表現訊號，而 *hns* 基因剔除株則有明顯偵測到 Hcp 蛋白質的表現，詳見圖七。




### 3.4.3 NTUH-K2044 與真核細胞株交互作用對 T6SS 相關基因表現的影響

為了探究 NTUH-K2044 與真核宿主細胞進行作用後，其 T6SS 是否能被誘發而提升表現量，且 H-NS 是否仍參與調控，我們將野生型 NTUH-K2044 和 *hns* 基因剔除株分別與經 50 ng/mL PMA 誘導活化之 HL-60 細胞株和 Caco-2 細胞株以 MOI=1000 進行相互作用兩小時。反應後，分別收取 unbound bacteria fraction、cell-associated bacteria fraction 和 bacteria cultured in cell-free medium 進行 RNA 萃取，再以即時定量聚合酶鏈鎖反應分析 *hcp*、*vgrG1*、*vgrG2* 和 *hns* mRNA 表現量，實驗結果以培養於不含細胞之培養液中的野生型 NTUH-K2044 之 mRNA 表現量做為比較基準。

結果發現，野生型 NTUH-K2044 與真核細胞作用後，T6SS 相關基因表現並沒有顯著提升(圖八 A,C)，僅在與 Caco-2 細胞作用後之 cell-associated bacteria 偵測到 *hcp* 基因有微幅約 2.5 倍的增加(圖八 C)，但無統計上意義；而 *hns* 基因剔除株與真核細胞作用後，T6SS 相關基因表現也沒有提升(圖八 A,C)，反而在 cell-associated bacteria 組有表現量下降的情形，其中以和 HL-60 細胞作用的組別最明顯(圖八 A)，但並無統計上意義。另外，在 medium only 組別中，相較於野生型 NTUH-K2044，*hns* 基因剔除株僅 *hcp* 基因表現量有顯著上升，而 *vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 表現量則無顯著變化。此外，野生型 NTUH-K2044 與 HL-60 和 Caco-2 細胞株作用後，所收取之 cell-associated bacteria 之 *hns* 基因表現量分別有約 0.25 倍 ( $p < 0.05$ ) 和 0.12 倍 ( $p < 0.001$ ) 顯著意義的下降(圖八 B,D)。

### 3.5 NTUH-K2044 之 T6SS locus-I 之 *kp1\_2392(impB) ~ kp1\_2400 (vgrG1)* 操縱子位置分析


前述實驗結果顯示 H-NS 會抑制 *hcp*、*vgrG1* 及 *vgrG2* 之基因表現，且會抑制 Hcp 蛋白質的表現，又因 T6SS locus-I 同時包含有 *vgrG* 和 *icmF* gene cluster，我



們推測 H-NS 對 T6SS locus-I 的調控影響力較大，故想進一步分析 *kpI\_2392 (impB)* 到 *kpI\_2400 (vgrG1)* 之操縱子位置。本實驗在所欲檢測之基因範圍內，於各個基因間交接處設計引子對，設計示意圖詳圖九 A，引子序列請參照表一，再分別以克雷伯氏肺炎桿菌之菌液、mRNA 和 cDNA 作為模板進行聚合酶鏈鎖反應分析。如圖九 B 所示，引子對 a 在 cDNA 樣本並未偵測到 DNA 訊號，顯示 T6SS locus-I 的第一個操縱子是從 *kpI\_2392 (impB)* 作為開端，且引子對 b~f 在 cDNA 樣本有偵測到與菌液樣本相同的 DNA 訊號，表示 *kpI\_2392 (impB)* 到 *kpI\_2398 (hcp)* 同屬於一個操縱子；然而，引子對 g 和 h 在 cDNA 樣本並未偵測到 DNA 訊號，顯示 *kpI\_2399 (clpV)* 和 *kpI\_2400 (vgrG1)* 分屬於兩個獨立的操縱子。

### 3.6 凝膠阻滯分析(Gel retardation assay)實驗

根據前述即時定量聚合酶鏈鎖反應結果顯示 H-NS 會抑制 *hcp*、*vgrG1* 及 *vgrG2* 之基因表現，其中在 *hns* 基因剔除株中，*hcp* mRNA 表現量上升最多，其次則為 *vgrG1*，所以想更深入探討 NTUH-K2044 之 H-NS 是否會直接地與位在 T6SS locus-I 上的基因序列結合，進行轉錄上的調控。因此我們以 pET-28c 質體表現並用 Ni-NTA 磁珠純化 NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質，且經聚丙烯醯胺膠體電泳(圖十 A)及西方墨點法(圖十 B)確認 H-NS 蛋白質的表現和純度，接續進行凝膠阻滯分析，探討 H-NS 是否與所挑選的目標 DNA 片段相互結合。依據前述的操縱子分析結果(圖九)，*kpI\_2392 (impB)* 為 T6SS locus-I 第一個操縱子的起始基因，故推測可能的啟動子序列位於 *impB* 基因上游處，又 H-NS 蛋白質具有結合於啟動子區域的特性，所以在使用線上軟體 Virtual footprint 分析可能的 H-NS 蛋白質結合序列後，挑選了一段包含 *impB* 上游處及部分 *impB* 的基因編碼序列作為目標 DNA 片段 F1 (241 bp)；此外，想探討 H-NS 是否也可能直接結合上 *hcp* 基因序列來達到抑制性調控，同樣使用線上軟體分析可能的 H-NS 蛋白質結合序列後，挑選部分 *hcp* 基因編碼序列作為目標 DNA 片段 F2 (308 bp)；實驗中使用沒有偵測到可



能的 H-NS 蛋白質結合序列之 DNA 片段作為 negative control (110bp)，詳見圖十一 A。結果發現，H-NS 並不會使 negative control 之 DNA 片段有阻滯(retardation)的情形發生，但 1 $\mu$ g 和 1.5 $\mu$ g 的 H-NS 蛋白質分別能使目標片段 F1 及 F2 發生阻滯，證實 H-NS 在 T6SS locus-I 的啟動子區域和 *hcp* 基因編碼序列具有結合位，此外，在加入特異性抗體(Mouse anti-His antibody)參與反應後，可以觀察到 supershift 的情形，確認 H-NS 與目標 DNA 結合之特異性，詳見圖十一 B。另外，當我們使用遞增濃度的 H-NS (0~5 $\mu$ g)與目標 DNA 片段 F1 及 F2 進行反應時，如預期中地觀察到 H-NS 和目標 DNA 的結合有劑量效應的呈現，且 H-NS 對 F1 片段的結合親和力相較於 F2 是較高的，如圖十一 C 所示。

### 3.7 野生型 NTUH-K2044 及其 T6SS 基因剔除株與 Caco-2 細胞之貼附實驗(Cell adherence assay)

根據本實驗室先前的研究指出 NTUH-K2044 具有貼附於腸道細胞的能力，且已知細菌的貼附作用(adhesion)對其在腸道組織的定植是最先也最關鍵重要的一步，隨後才能致使宿主的疾病發展，故下一步想探討 T6SS 是否會影響克雷伯氏肺炎桿菌與腸道細胞的貼附能力。實驗中使用 Caco-2 細胞株與野生型 NTUH-K2044 及其衍生之 T6SS 基因剔除株，以 MOI = 10 共同培養 20 分鐘，去除未貼附的細菌後，以 0.2 % Triton X-100 打破細胞，使用 PBS 稀釋適當倍數後塗於 LB 固態培養基上，隔夜培養後進行菌落計數。實驗結果以野生型 NTUH-K2044 的貼附比例作為比較基準(100 %)，即得到其他突變菌株的相對貼附百分比(relative adherence %)。結果發現，相較於野生型 NTUH-K2044， $\Delta hcp$ 、 $\Delta vgrG1$ 、 $\Delta vgrG2$  和  $\Delta icmF1\Delta icmF2$  之相對黏附百分比分別有 53.67% ( $p < 0.05$ )、68.02% ( $p < 0.01$ )、95.07% ( $p < 0.001$ )和 74.12% ( $p < 0.01$ )之顯著性下降；而做為 positive control 的  $\Delta yfgL$  之相對貼附百分比也符合預期有 98.54% ( $p < 0.001$ )的顯著

下降；另外，結果發現 $\Delta hns$  之相對貼附百分比有 163.5%顯著上升( $p<0.001$ )，詳見圖十二。



## 第四章、 總結與討論




首先，利用聚合酶鏈鎖反應分析發現五個與 T6SS 突刺裝置的組成和作用極為相關的 *hcp* (locus-I)、*vgrG1* (locus-I)、*vgrG2* (locus-III)、*icmF1* (locus-I)和 *icmF2* (locus-III)基因廣泛分布於不同來源的克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株中，但無法得知這些 T6SS 相關基因的存在是否和克雷伯氏肺炎桿菌不同的莢膜型及致病力有直接相關，未來可再探討這五個基因的 mRNA 及蛋白質表現量在不同的臨床菌株是否有差異，藉此尋找 T6SS 與克雷伯氏肺炎桿菌致病力的相關性。另外，實驗結果顯示分離自社區型化膿性肝膿瘍(PLA)菌株同時帶有 *hcp*、*vgrG1*、*vgrG2*、*icmF1* 和 *icmF2* 基因之比率為最高(32/42, 76.19%)，暗示著 T6SS 在 PLA 菌株中可能扮演重要的角色，故本研究挑選會造成 PLA 的 NTUH-K2044 菌株(*hcp*<sup>+</sup>*vgrG1*<sup>+</sup>*vgrG2*<sup>+</sup>*icmF1*<sup>+</sup>*icmF2*<sup>+</sup>)作為研究對象。

在隨機收取之 47 株隔夜培養 *hcp*<sup>+</sup>*vgrG1*<sup>+</sup>*vgrG2*<sup>+</sup> *icmF1*<sup>+</sup>*icmF2*<sup>+</sup> 菌株的細菌細胞溶解物中，以西方墨點法未偵測到 Hcp 蛋白質的表現，故認為克雷伯氏肺炎桿菌之 T6SS 在一般 *in vitro* LB broth 培養條件下可能受到未知機制所壓抑，或是 T6SS 的表現還需要仰賴其他未知的調控因子，使其在正確的時機被啟動進而更有效地發揮功能。先前也有研究指出部分的霍亂弧菌和綠膿桿菌菌株在一般實驗室培養條件下無法表現 Hcp 蛋白質，後續證實其表現會受到群體感應調控或是轉譯後修飾路徑機制所誘發而表現[70, 72]。除了細菌內部的訊息傳遞調控路徑之外，細菌所處的環境條件，像是溫度、PH 值、滲透壓、鐵離子、鎂離子的改變也會對 T6SS 的表現有所影響[88]。另外，更有研究發現在莢膜缺失的曲狀桿菌 (*Campylobacter jejuni*)突變株中，其 T6SS 才能發揮功能致使紅血球細胞溶血[89]，故我們認為克雷伯氏肺炎桿菌豐厚的莢膜層可能成為作用蛋白質分泌時的屏障。


在探討克雷伯氏肺炎桿菌對 T6SS 的調控機制部分，首先，研究環境中的鐵離子是否參與 T6SS 的調控，但我們並未在 T6SS locus-I 和 locus-III 基因組上游或啟動子區域序列比對到 Fur 蛋白質會作用的可能 Fur box 基因序列





(GATAATXATTATC)[53]，且在即時定量聚合酶鏈鎖反應結果顯示當野生型 NTUH-K2044 培養於含有鐵螯合劑(2,2'-dipyridyl)的環境下時，*vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 表現量會有些微下降(附錄一)，但無統計意義，與在 *Edwardsiella tarda*[54] 和 enteroaggregative *E. coli*[55]中所觀察到的調控結果不同，不過仍不排除鐵離子參與 T6SS 調控的可能性。另外，也曾探究 NTUH-K2044 是否如綠膿桿菌可藉由 *SuhB* 來抑制 Gac/Rsm pathway，進而壓抑 T6SS 的作用，雖然在 NTUH-K2044 基因體中有比對到三個 *suhB* 基因 homolog (*kp1\_0314*, *kp1\_1580*, *kp1\_4117*)，且成功以無標誌基因剔除(unmarked deletion)方法建構 *suhB* 基因剔除株( $\Delta kp1_0314$ ,  $\Delta kp1_1580$ )，但與 *suhB* *P. aeruginosa* 之基因序列相似度最高(62.48 %)的 *kp1\_4117* 基因無法被部分或是完全剔除，顯示其為 NTUH-K2044 之必須基因(essential gene)，所以推測 *kp1\_4117* 對 T6SS 的影響可能較大，後續仍可針對 *kp1\_4117* 做適當的點突變(point mutation)取得突變株後探討其對 T6SS 的調控機制。另外，在隔夜培養的 $\Delta kp1_0314$  和  $\Delta kp1_1580$  菌株的細菌細胞溶解物中，以西方墨點法也並未偵測到 Hcp 蛋白質的表現(附錄二)，故推測這兩個基因不參與 T6SS 的調控。

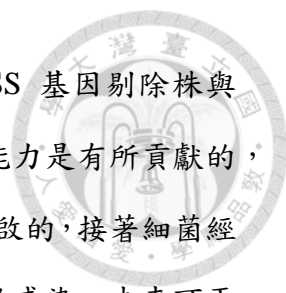
因近幾年有多篇研究指出 H-NS 會對革蘭氏陰性菌之 T6SS 相關基因表現做負向調控，所以我們把研究目標轉向探究 H-NS 這個已被發現許久的調控蛋白質是否也參與克雷伯氏肺炎桿菌 T6SS 的調控。即時定量聚合酶鏈鎖反應分析結果指出 H-NS 會在轉錄層次上負向調控 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 表現量，顯示 H-NS 會對 NTUH-K2044 之 T6SS 進行抑制性調控。其中可見在 *hns* 基因剔除株中 *hcp* mRNA 表現量上升最多，故想進一步了解 H-NS 是否會影響 Hcp 蛋白質的表現，結果發現所收取的野生型 NTUH-K2044 之細菌細胞溶解物並無偵測到 Hcp 蛋白質表現，而 *hns* 基因剔除株則可被偵測到 Hcp 蛋白質的表現。接著利用凝膠阻滯分析方法，證實 H-NS 蛋白質是 NTUH-K2044 之 T6SS 的負向調控蛋白質，其在 T6SS locus-I 的啟動子區域和 *hcp* 基因編碼序列具有結合位，但也不排除 H-NS 可能與其他位在 T6SS locus-I 上的基因序列有交互作用。而 H-NS 是否僅透



過直接地結合目標 DNA 來發揮作用，或是與其他調控轉錄的因子相互作用來達成抑制 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* 基因的表現仍待探討，另外，在實驗中 H-NS 實際上是與所挑選之目標 DNA 上的哪些基因序列有相互作用也是未知的，未來可藉由 DNase footprinting assay 來釐清。

除了細菌內部的訊息傳遞調控路徑之外，我們也進一步探討 NTUH-K2044 在面對真核宿主細胞(HL-60, Caco-2 cell line)的環境壓力下，其 T6SS 是否能被誘發啟動而提升表現量，且 H-NS 是否仍參與調控。結果發現，野生型 NTUH-K2044 與兩種真核細胞分別作用後，T6SS 相關基因表現並沒有顯著提升，其中在與 Caco-2 細胞作用後之 cell-associated bacteria 偵測到 *hcp* 基因有微幅增加，但無統計意義，或許暗示著在 *in vivo* 條件下 NTUH-K2044 貼附於腸道細胞進時感染時，*hcp* 基因可能被誘發而大量表現，此仍待未來研究。而 *hns* 基因剔除株與兩種真核細胞分別作用後，T6SS 相關基因表現也沒有顯著提升，反倒在 cell-associated bacteria 有表現量下降的情形，其中以和 HL-60 細胞作用的組別最明顯(無統計意義)，我們認為當 NTUH-K2044 被巨噬細胞吞噬後，在 phagosome 內的酸性環境可能不利於 T6SS 的表現進而阻礙其功能。另外，在 medium-only 組別中可發現，相較於野生型 NTUH-K2044，*hns* 基因剔除株僅 *hcp* 基因表現量有顯著上升，而 *vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 表現量則無顯著變化，推測可能為 NTUH-K2044 在和真核宿主細胞作用後，其 H-NS 的調控重要性變弱。而野生型 NTUH-K2044 與 HL-60 和 Caco-2 細胞作用後，cell-associated bacteria 組別之 *hns* 基因表現量分別皆有顯著意義的下降，理論上來說 T6SS 相關基因表現應該會有大幅提升，但實驗結果中並沒有發現 *hcp*、*vgrG1* 或 *vgrG2* mRNA 表現量有被誘發而大量表現，故認為 NTUH-K2044 在和真核宿主細胞作用後所導致 *hns* 基因表現的下降幅度不足以正向調控 T6SS 相關基因的表現，或是在 *in vivo* 條件之下 H-NS 還需要與其他未知的轉錄調控因子合作來達成抑制性的結果。

然而，已知細菌的貼附作用對其在腸道組織的定植是最優先且關鍵的一步，



隨後造成宿主之疾病發展，在 NTUH-K2044 及其衍生之 T6SS 基因剔除株與 Caco-2 細胞之貼附實驗中發現 T6SS 對於 NTUH-K2044 的貼附能力是有所貢獻的，目前研究也認為 PLA 的致病路徑是從細菌定植於腸道組織所開啟的，接著細菌經由侵入細胞的方式移行至腸道外造成感染，甚至擴大成系統性的感染，未來可再深入探討 T6SS 是否是透過影響細菌的線毛(pili)、菌毛(fimbriae)或是莢膜多醣體(capsule polysaccharides)的生成來增強對細胞的貼附能力，另外，T6SS 是否也參與調控 proinflammatory cytokines 的生成來增強病原菌對宿主的感染進程。此外，實驗結果中發現 *hns* 基因剔除株之貼附能力是有顯著提升的，但是否是透過直接活化 T6SS 系統所致使仍待探究。

綜合以上，本研究發現 T6SS 相關基因廣泛分布於克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株當中，其中以在 PLA 菌株分布比率為最高。而克雷伯氏肺炎桿菌之 H-NS 蛋白質可藉由直接結合目標 DNA 來對 T6SS 相關基因做負向調控，且影響 Hcp 蛋白質的表現。此外，T6SS 相關基因對於克雷伯氏肺炎桿菌貼附於腸道細胞的能力有影響，顯示 T6SS 在細菌與宿主細胞作用中扮演重要角色，至於 T6SS 是在哪個感染環節被誘導活化而造成影響，其中詳細的分子機制未來仍需更深入的研究。

表一、本研究使用之引子

引子名稱	引子序列(5'→3')	用途(說明)
<b>hcp-F</b>	CGTATTCATACGCCGTTTCCTG	PCR check
<b>hcp-R</b>	TTCGTTCCAGCTATCGGAGTG	
<b>vgrG-1F</b>	ACCAGAACGCCATTTACCAG	
<b>vgrG-1R</b>	CGTCCGTGTTTGTTCGATATG	
<b>vgrG-3F</b>	TCGGTGCTGAGCTTGATATG	
<b>vgrG-3R</b>	AGGTGGTGGAGCAGGTATTG	
<b>icmF-1F</b>	CAAAGTCCGCCTGCTTTTAG	
<b>icmF-1R</b>	GCTTTCAGCTGGTCATAGCC	
<b>icmF-3F</b>	GTATCGTTTCCCAGCGGTTATC	
<b>icmF-3R</b>	CCAGGTCTGTCTGGCGTTGG	
<b>Nde-I-HNS-F</b>	GTTTGAGATTACTCATATGAGCGAAGCAC	H-NS
<b>Xho-I-HNS-R</b>	GATTTTTTATAGCGATCAACTCGAGTTAGA	expression
	TCAGGAAATC	vector
<b>HNS-F</b>	CATCCGTACTCTTCGTGCG	construct
<b>HNS-R</b>	GATCAGGAAATCGTCCAGTG	
<b>T7-promoter</b>	TAATACGACTCACTATAGGG	
<b>T7-terminator</b>	TGCTAGTTATTGCTCAGCCG	
<b>hcp-1F</b>	CAAAAACCCCGCCTACGA	qPCR analysis
<b>hcp-1R</b>	TCGTAGCGCAGCTCAATCTG	
<b>vgrG-1F</b>	CCCCGGCCAACAACAAA	
<b>vgrG-1R</b>	GTCGAGACCTTGATATGCTCTTTTC	
<b>vgrG-3F</b>	TCCTCGCCGCGCTTATC	
<b>vgrG-3R</b>	CCCGCAATGTGATTCGTA	

表一、本研究使用之引子(續前頁)

引子名稱	引子序列(5'→3')	用途(說明)
<b>hns-F</b>	GAAATTGAAGAGCGTACGCGTAA	qPCR analysis
<b>hns-R</b>	CAATACCGTCAGCAATCAGCAT	
<b>23S-44F</b>	AGGCGATGAAGGACGTGCTA	
<b>23S-119R</b>	TTCGGACATCGCCGGTTATA	
<b>a-before-F</b>	GTAACCAGGTTACCGTCCAC	T6SS locus-I
<b>a-R</b>	GGCACCGAGAGGTTAACTTC	operon analysis
<b>b-F</b>	CAATGGCGAAGAGGAGAAC	
<b>b-R</b>	CATCGTCCAGAAAGTCGTTG	
<b>c-F</b>	GCCTGGTGACCGAAATGAC	
<b>c-R</b>	GTCCGTATCAATCATCGTGC	
<b>d-F</b>	CTCGGTGAGCCTGAACTTG	
<b>d-R</b>	GTTACGCAACACATCACG	
<b>e-newF</b>	CGTGATGTGTTGCGTGAAC	
<b>e-newR</b>	CAGGCTGTTTCATCAGCACC	
<b>f-newF</b>	CTTTGCCGGAATTCATCCTG	
<b>f-R</b>	CGTTGATTCGGTACCACTTG	
<b>g-newF</b>	CAAGTGGTACCGAATCAACG	
<b>g-newR</b>	GTGAGATAGCGTCGTGACAG	
<b>h-newF</b>	CTGTCACGACGCTATCTCAC	
<b>h-newR</b>	GTTATCTCCCCAGTGGTAAG	
<b>New-364F</b>	GTATCCATTGCAAACATTCC	DNA target of
<b>New-527R</b>	GCCATAGCAGTTCCTTTCC	gel retardation
<b>Test-hcp-F</b>	GCTTCACTACACAATGGAGAG	assay

表一、本研究使用之引子(續前頁)

引子名稱	引子序列(5'→3')	用途(說明)
<b>f-R</b>	CGTTGATTCGGTACCACTTG	DNA target of
<b>T6SS-NC-F</b>	CTCAACCACTGGCTCGATC	gel retardation
<b>T6SS-NC-new-R</b>	CAGCGCACTCAGCAGACTG	assay



表二、克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 T6SS 相關基因(*hcp*、*vgrG1*、*vgrG2*、*icmF1* 和 *icmF2*)盛行率

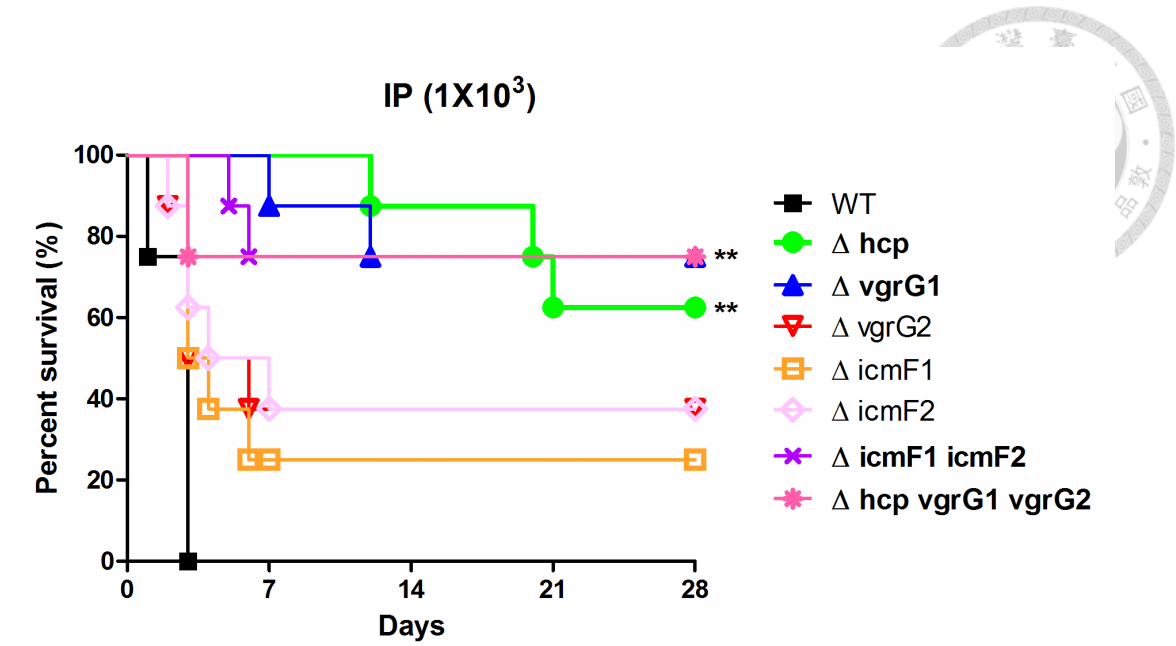
Strains	<i>hcp</i> (locus-I)	<i>vgrG1</i> (locus-I)	<i>vgrG2</i> (locus-III)	<i>icmF1</i> (locus-I)	<i>icmF2</i> (locus-III)
PLA	42/42	41/42	38/42	39/42	40/42
Non-invasive	25/32**	27/32*	28/32	21/32**	22/32**
CRKP	80/84	53/84***	54/84**	58/84**	56/84***
Colonized	104/130**	77/130***	97/130*	70/130***	86/130***

Strains	<i>hcp, vgrG1/2, icmF1/2 (+)</i>	<i>hcp, vgrG1/2, icmF1/2 (-)</i>
PLA	32/42 (76.19%)	0/42 (0%)
Non-invasive	14/32 (43.75%)	2/32 (6.25%)
CRKP	38/84 (45.24%)	2/84 (2.38%)
Colonized	40/130 (30.77%)	12/130 (9.23%)

\***PLA**: community-acquired pyogenic liver abscess *K.p*

\***CRKP**: carbapenem-resistant *K.p*

\*\*\*,  $p < 0.001$  ; \*\*,  $p < 0.01$  ; \*,  $p < 0.05$  (Chi-square test)



圖一、NTUH-K2044 之 T6SS 基因剔除株對小鼠存活率之影響

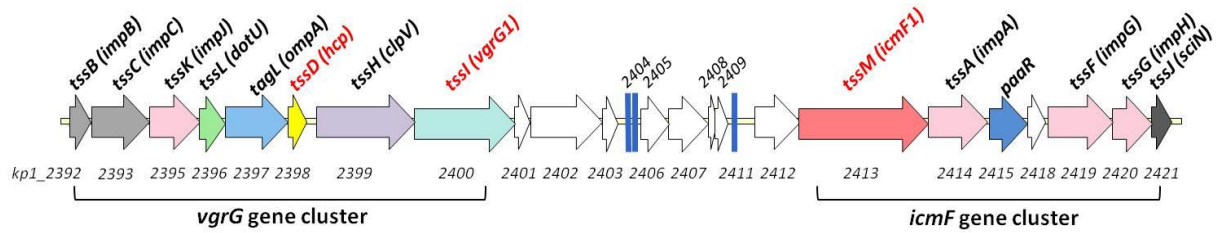
在品系 BALB/c 小鼠腹腔注射 *hcp*、*vgrG1* 或 *icmF1/icmF2* 基因剔除株後，相較於注射野生型 NTUH-K2044 組別，基因剔除株對小鼠致病力有顯著下降，因此小鼠存活率顯著提高。\*\*,  $p < 0.01$  (n=8, Log-rank test)





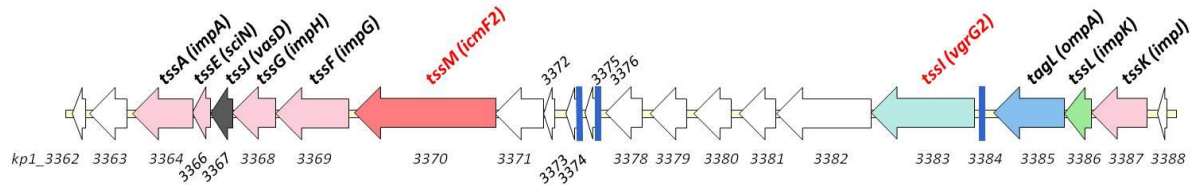
(A)

T6SS locus-I (*kp1\_2392* to *kp1\_2421*)



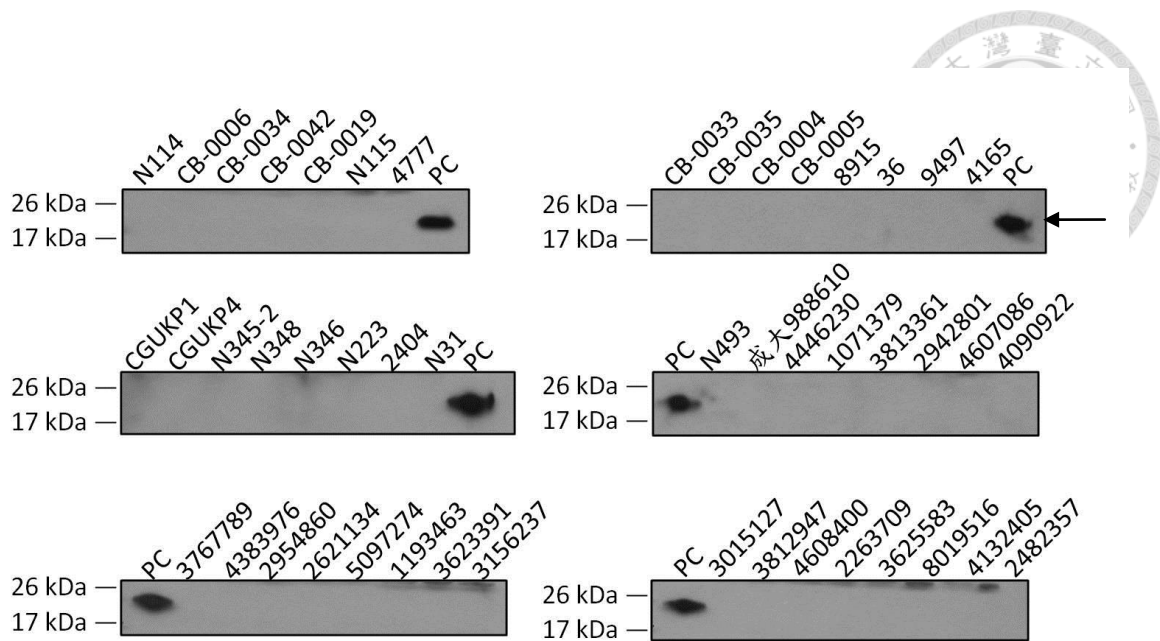
(B)

T6SS locus-III (*kp1\_3362* to *kp1\_3388*)



圖二、NTUH-K2044 之 T6SS 基因組(T6SS gene cluster)

於 NCBI 基因資料庫中尋得 NTUH-K2044 之 T6SS 基因組，分別為(A) T6SS locus-I (*kp1\_2392*~*kp1\_2421*)，同時包含有 *vgrG* 及 *icmF* gene cluster。另一為(B) T6SS locus-III (*kp1\_3362*~ *kp1\_3388*)。圖中基因的標準命名 *tss* 為 type six secretion gene，*tag* 為 type six associated gene，而括弧中的命名則為通用基因名。



\*Predict size of Hcp: 18.76 kDa

### 圖三、克雷伯氏肺炎桿菌臨床菌株之 Hcp 蛋白質表現

隨機挑選 47 株 *hcp*<sup>+</sup>*vgrG1*<sup>+</sup>*vgrG2*<sup>+</sup>*icmF1*<sup>+</sup>*icmF2*<sup>+</sup> 菌株，經隔夜培養後，收取細菌的細胞溶解物，使用西方墨點法並未偵測到 Hcp 蛋白質表現，實驗中以純化之 Hcp 蛋白質作為 positive control (PC)，並使用稀釋倍數 1:100,000 之 Rabbit anti-*Kp* Hcp 進行偵測，箭頭所示為 Hcp 蛋白質的訊號。



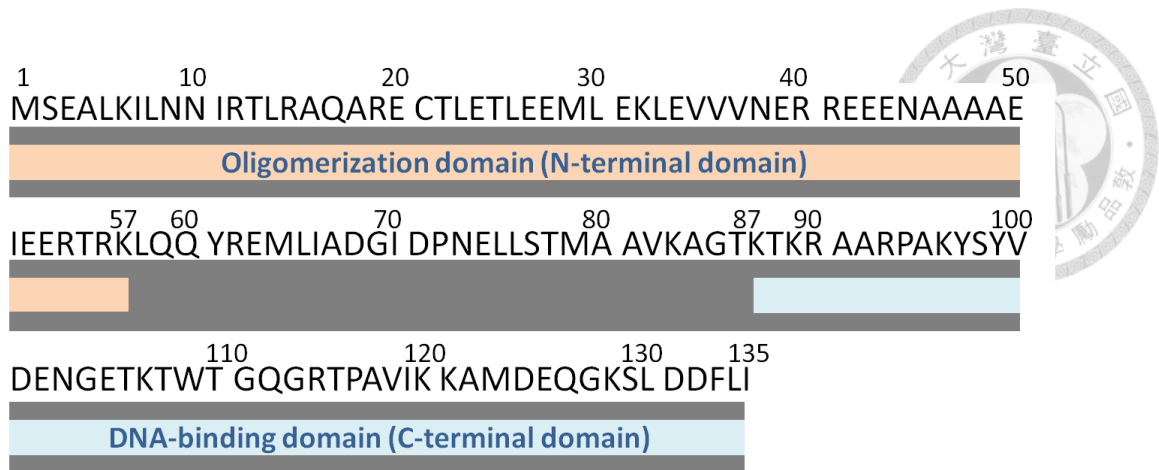
```
NTUH-K2044      MSEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVVNERREEENAAAAEIEERTRKLQQ
E.coli          MSEALKILNNIRTLRAQARECTLETLEEMLEKLEVVVNERREEESAAAAEVEERTRKLQQ
                *****.*****

NTUH-K2044      YREMLIADGIDPNELLSTMAAVKAGTKTKRAARPAKYSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIK
E.coli          YREMLIADGIDPNELLNSLAAVKSGTKAKRAQRPAYSYVDENGETKTWTGQGRTPAVIK
                *****:::****:***:*** *****

NTUH-K2044      KAMDEQGKSLDDFLI
E.coli          KAMDEQGKSLDDFLI
                *****
```

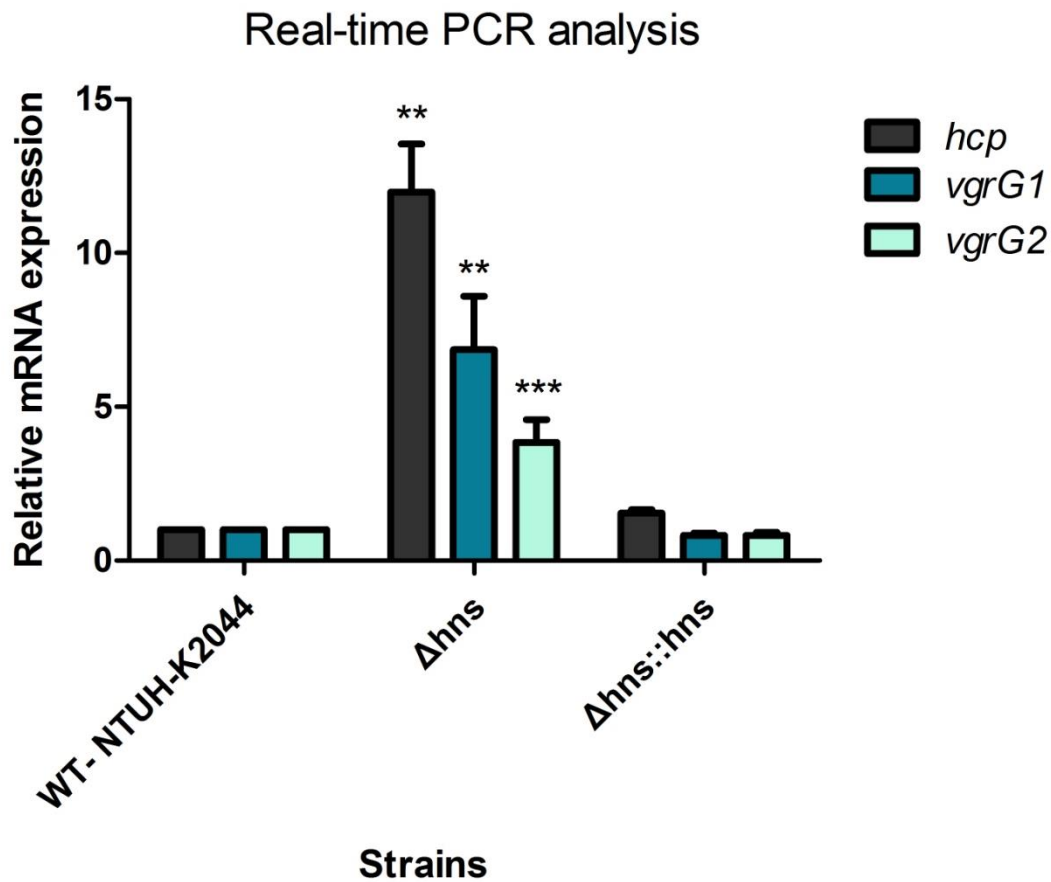
#### 圖四、NTUH-K2044 與 *E.coli* K-12 之 H-NS 胺基酸序列比對結果

利用線上軟體 Clustal Omega，比對 NTUH-K2044 與 *E.coli* K-12 之 H-NS 胺基酸序列，有 94.07% 相似性，僅七個胺基酸組成不同。



### 圖五、NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質功能性區域分析

利用線上軟體 InterPro 分析胺基酸序列，NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質由 135 胺基酸所組成，其中胺基酸殘基 1~57 構成 N-terminal domain (oligomerization domain)，而胺基酸殘基 87~135 則構成 C-terminal domain (DNA-binding domain)。

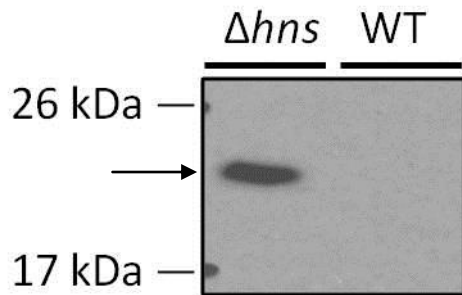


圖六、野生型 NTUH-K2044、*hns* 基因剔除株與 *hns* 基因補回株之 *hcp*、*vgrG1* 和 *vgrG2* mRNA 相對表現量

圖中灰色柱狀為 *hcp* mRNA 表現量，深藍色柱狀為 *vgrG1* mRNA 表現量，而淺藍色柱狀為 *vgrG2* mRNA 表現量。收取經 LB broth 隔夜培養的野生型 NTUH-K2044 (WT)、*hns* 基因剔除株( $\Delta hns$ )與 *hns* 基因補回株( $\Delta hns::hns$ )，refresh 至  $OD_{600}=1.0$  後抽取其 mRNA 進行即時定量聚合酶鏈鎖反應，實驗結果以野生型 NTUH-K2044 之 mRNA 表現量做為比較基準。結果為三次獨立試驗的平均值；誤差線(error bars)代表平均值標準誤差 (standard error of the mean, SEM)；\*\*\*,  $p<0.001$ ；\*\*,  $p<0.01$ (One-way ANOVA：Tukey's Multiple Comparison Test)。

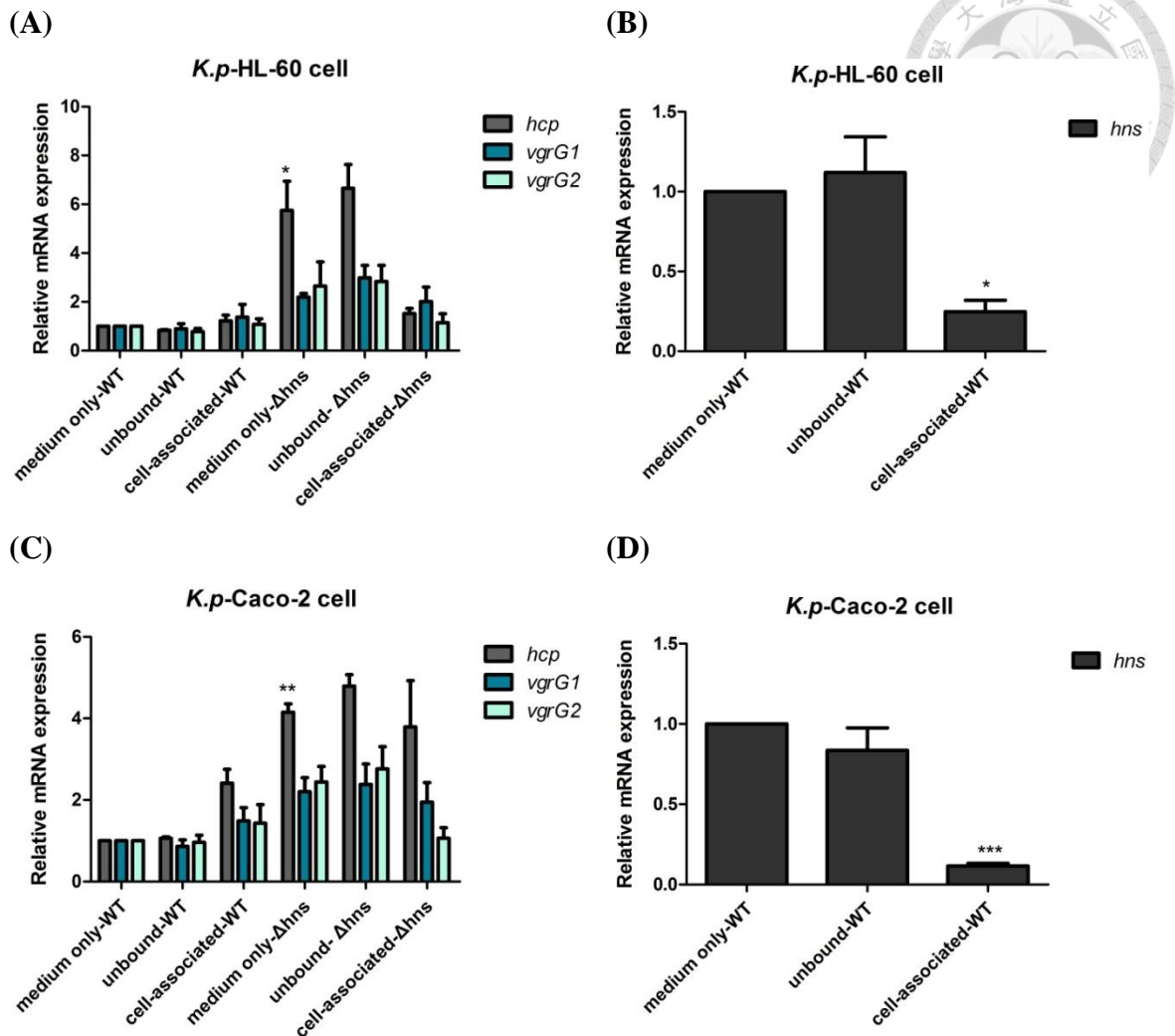


## Western Blot



圖七、野生型 NTUH- K2044 與 *hns* 基因剔除株之 Hcp 蛋白質表現

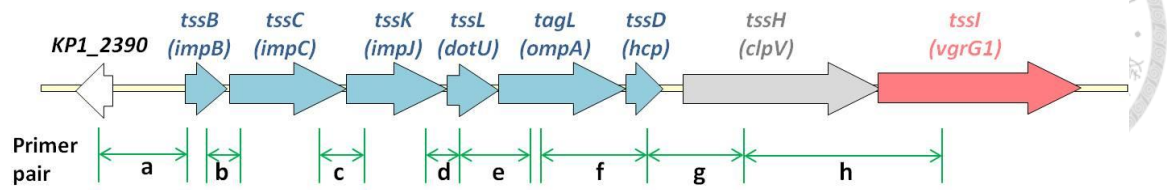
收取經隔夜培養的野生型 NTUH-K2044 與 *hns* 基因剔除株之細菌細胞溶解物，以西方墨點法僅在 *hns* 基因剔除株偵測到 Hcp 蛋白質的表現，箭頭所示為 Hcp 蛋白質訊號，實驗中以稀釋倍數 1:100,000 之 Rabbit anti-*Kp* Hcp 進行偵測。



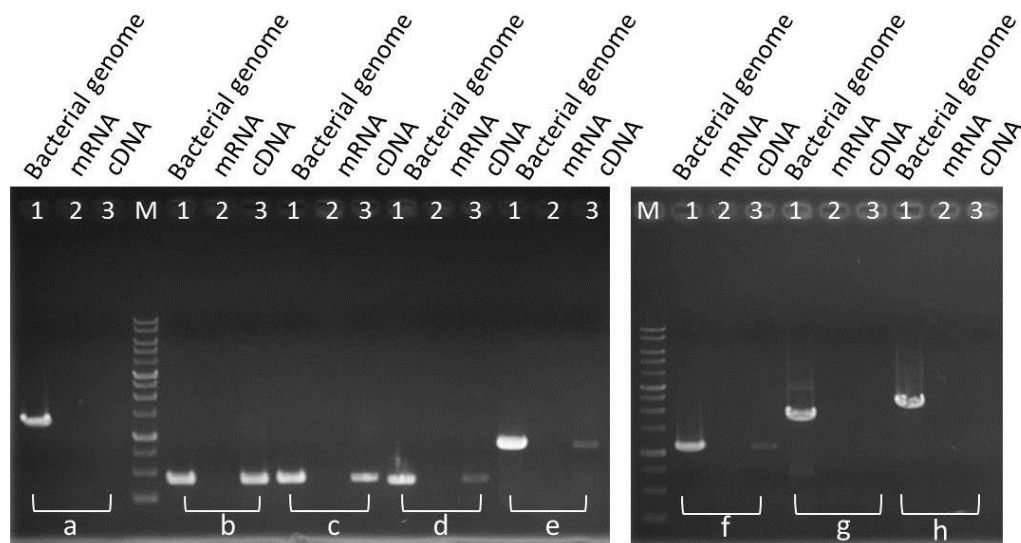
圖八、野生型 NTUH-K2044 與 *hns* 基因剔除株和真核宿主細胞(HL-60, Caco-2 cells)交互作用後之 mRNA 相對表現量

如圖所示灰色柱狀為 *hcp* mRNA 表現量，深藍色柱狀為 *vgrG1* mRNA 表現量，淺藍色柱狀為 *vgrG2* mRNA 表現量，黑色柱狀為 *hns* mRNA 表現量。野生型 NTUH-K2044 與 *hns* 基因剔除株和真核宿主細胞(HL-60, Caco-2 cells)作用後，分別收取 unbound bacteria fraction 和 cell-associated bacteria fraction 進行即時定量聚合酶鏈鎖反應，實驗結果以培養於不含細胞之培養液中的野生型 NTUH-K2044 之 mRNA 表現量做為比較基準。結果為三次獨立試驗的平均值；誤差線(error bars)代表平均值標準誤差(standard error of the mean, SEM)；\*\*\*,  $p < 0.001$ ；\*\*,  $p < 0.01$ ；\*,  $p < 0.05$  (One-way ANOVA : Tukey's Multiple Comparison Test)。

(A)



(B)



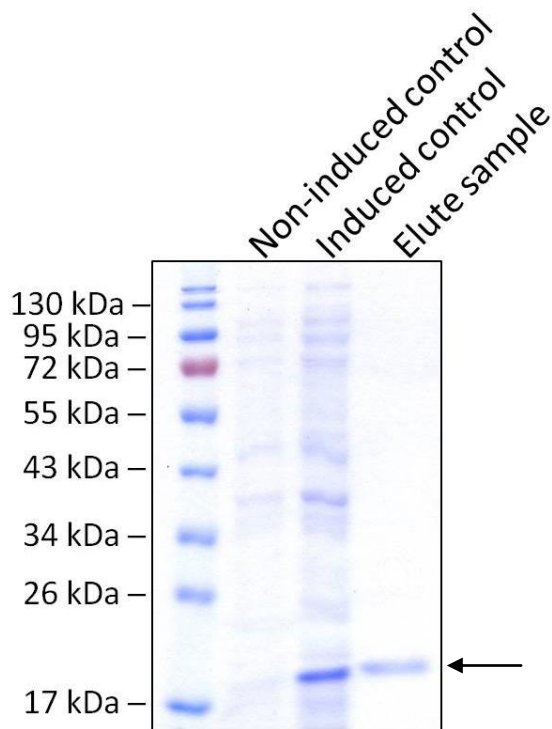
圖九、NTUH-K2044 之 T6SS locus-I 之 *kp1\_2392(impB) ~ kp1\_2400(vgrG1)* 操縱子位置分析結果

(A) 引子對 a~h 之設計示意圖。(B) lane 1 為 bacterial genome; lane 2 為 mRNA; lane 3 為 cDNA。電泳結果如圖(B)，*kp1\_2392(impB)* 到 *kp1\_2398(hcp)* 同屬於一個操縱子；而 *kp1\_2399(clpV)* 和 *kp1\_2400(vgrG1)* 分屬於兩個獨立的操縱子。綜合以上結果，於圖(A)中標示相同顏色之區塊視為同一個操縱子。

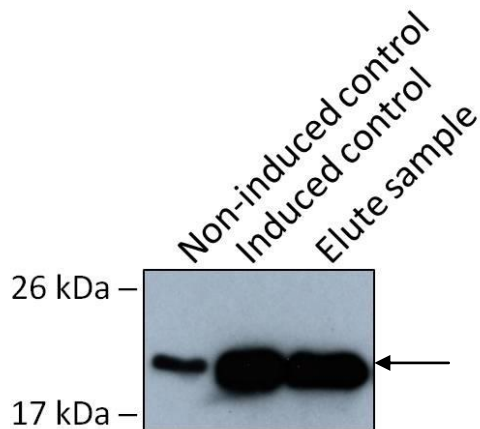




(A)



(B)

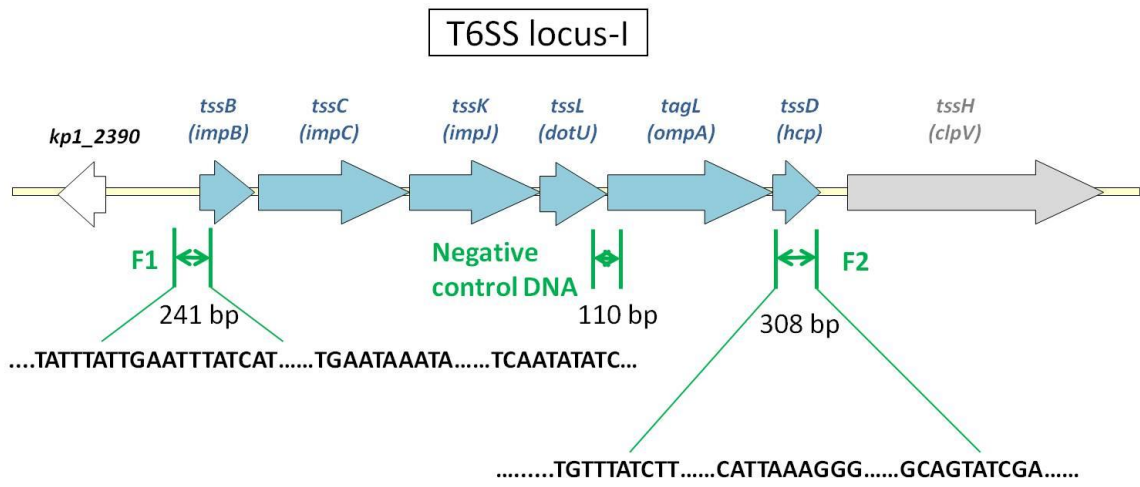


#### 圖十、NTUH-K2044 之 H-NS 蛋白質純化結果

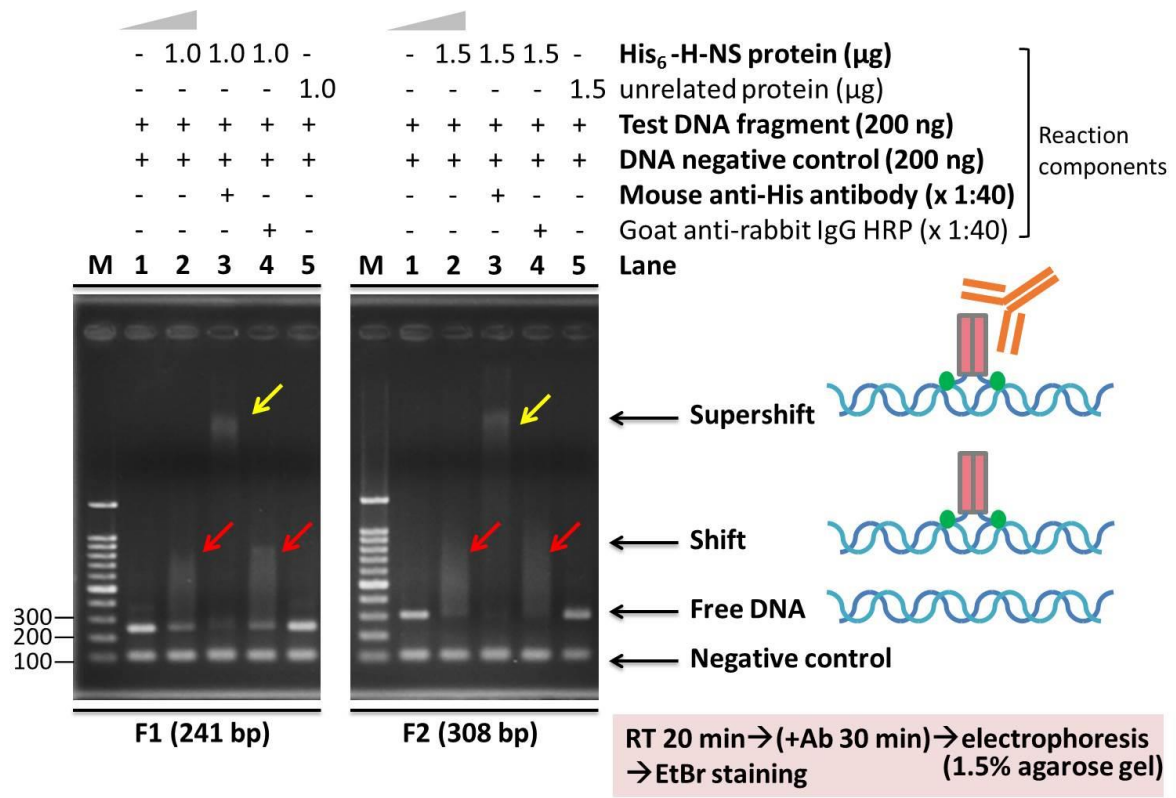
(A)純化之 H-NS 於 15% SDS-PAGE 中進行蛋白質染色，於 17~26kDa 間有偵測到 H-NS 蛋白質訊號(箭頭)。(B)以西方墨點法偵測 H-NS 蛋白質，箭頭所示為 H-NS 蛋白質訊號，實驗中以稀釋倍數 1:10,000 之 Mouse anti-His antibody 進行偵測。



(A)

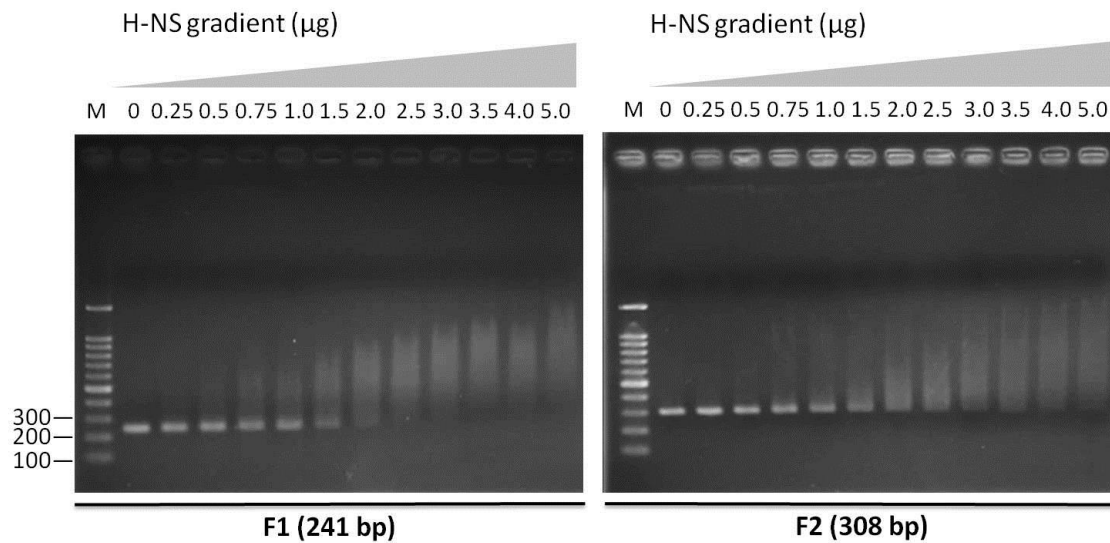


(B)



圖十一、凝膠阻滯分析結果

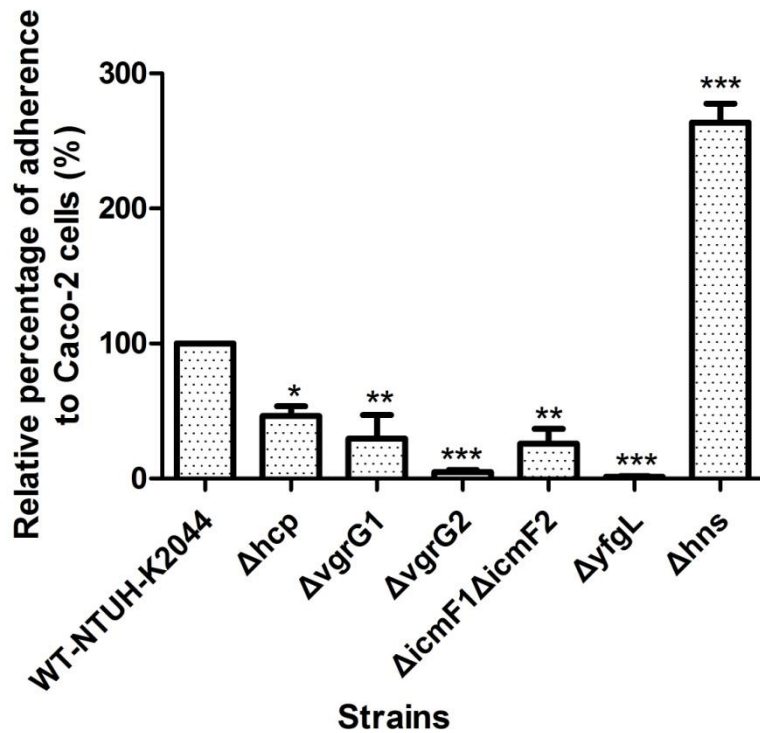
(C)



圖十一、凝膠阻滯分析結果(續前頁)

(A)欲偵測之目標 DNA 片段 F1 (241 bp)及 F2 (308 bp)之序列位置示意圖，所列出鹼基序列為使用線上軟體 Virtual footprint 所尋得可能的 H-NS 蛋白質結合序列；作為 negative control 的 DNA 片段則並沒有偵測到可能的 H-NS 蛋白質結合序列。

(B) lane 1 僅含 DNA 片段，作為實驗中的 negative control；lane 2 分別加入 1  $\mu\text{g}$ 、1.5  $\mu\text{g}$  之 His<sub>6</sub>-H-NS 與固定量 200 ng 的目標 DNA 片段 F1 及 F2 進行反應，紅色箭頭為阻滯的訊號；lane 3 為加入特異性抗體，用以觀察 supershift 之情形，黃色箭頭為 supershift 訊號；lane 4 為加入不相干的抗體進行反應；lane 5 為加入不相干的蛋白質進行反應。(C)目標 DNA 片段 F1 及 F2 與遞增濃度的 H-NS (0~5  $\mu\text{g}$ ) 進行反應後，可見 H-NS 蛋白質與目標 DNA 片段的結合能力呈劑量效應。

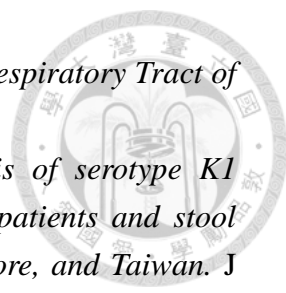


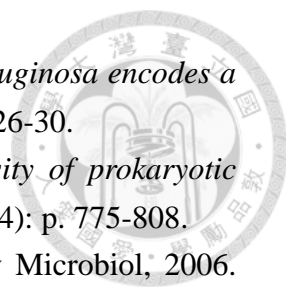
圖十二、野生型 NTUH-K2044 及 T6SS 基因剔除株與 Caco-2 細胞貼附實驗結果以野生型 NTUH-K2044 的細菌貼附比例作為比較基準(100 %)，即得到其他突變株的相對黏附百分比(relative adherence %)。結果為三次獨立試驗的平均值；誤差線(error bars)代表平均值標準誤差(standard error of the mean, SEM)；\*\*\*,  $p < 0.001$ ；\*\*,  $p < 0.01$ ；\*,  $p < 0.05$  (One-way ANOVA : Tukey's Multiple Comparison Test)。

## 第五章、 參考文獻



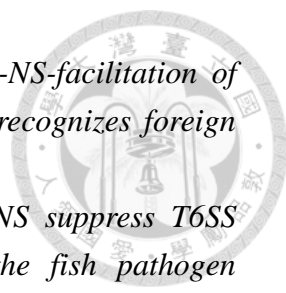
1. Pan, Y.J., et al., *Capsular polysaccharide synthesis regions in Klebsiella pneumoniae serotype K57 and a new capsular serotype*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(7): p. 2231-40.
2. Batra, A.S.S.a.H.V., *Identification of Klebsiella Pneumoniae by Capsular Polysaccharide Polyclonal Antibodies*. International Journal of Chemical Engineering and Applications, 2011. **2**(2): p. 130-134.
3. Hsu, C.R., et al., *Isolation of a bacteriophage specific for a new capsular type of Klebsiella pneumoniae and characterization of its polysaccharide depolymerase*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70092.
4. Pan, Y.J., et al., *Capsular types of Klebsiella pneumoniae revisited by wzc sequencing*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e80670.
5. Pan, Y.J., et al., *Identification of capsular types in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains by wzc sequencing and implications for capsule depolymerase treatment*. Antimicrob Agents Chemother, 2015. **59**(2): p. 1038-47.
6. Pan, Y.J., et al., *Klebsiella Phage PhiK64-1 Encodes Multiple Depolymerases for Multiple Host Capsular Types*. J Virol, 2017. **91**(6).
7. MATSEN., J.M., I.J.A. SPINDLER., and R. BLOSSER., *Characterization of Klebsiella Isolates from Natural Receiving Waters and Comparison with Human Isolates*. APPLIED MICROBIOLOGY, 1974. **28**(4): p. 672-678.
8. BAGLEY., S.T., et al., *Isolation of Klebsiellae from Within Living Wood*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY., 1978. **36**(1): p. 178-185.
9. LINE., M.A. and M.W. LOUTIT, *Non-symbiotic Nitrogen-fixing Organisms from Some NewZealand Tussock-grassland Soils* Journal of General MicrobioZogy, 1971. **66**: p. 309-318
10. EDBERG., S.C., V. PISCITELLI., and M. CARTTER., *Phenotypic Characteristics of Coliform and Noncoliform Bacteria from a Public Water Supply Compared with Regional and National Clinical Species*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1986. **52**(3): p. 474-478.
11. NIEMELA., S.I., et al., *Microbial Incidence in Upper Respiratory Tracts of Workers in the Paper Industry*. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 1985. **50**(1): p. 163-168.
12. Lau, H.Y., G.B. Huffnagle, and T.A. Moore, *Host and microbiota factors that control Klebsiella pneumoniae mucosal colonization in mice*. Microbes Infect, 2008. **10**(12-13): p. 1283-90.

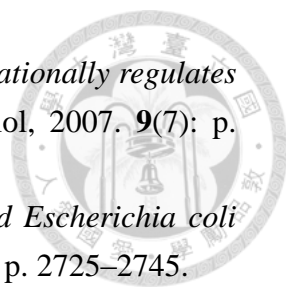
- 
13. Gutierrez., R.C.d., et al., *Microbial Flora Variations in the Respiratory Tract of Mice*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1999. **94**(5): p. 701-707.
  14. Siu, L.K., et al., *Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 Klebsiella pneumoniae strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan*. J Clin Microbiol, 2011. **49**(11): p. 3761-5.
  15. Magill, S.S., et al., *Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections*. N Engl J Med, 2014. **370**(13): p. 1198-208.
  16. Lederman, E.R. and N.F. Crum, *Pyogenic liver abscess with a focus on Klebsiella pneumoniae as a primary pathogen: an emerging disease with unique clinical characteristics*. Am J Gastroenterol, 2005. **100**(2): p. 322-31.
  17. Rahimian., J., et al., *Pyogenic Liver Abscess: Recent Trends in Etiology and Mortality*. Clinical Infectious Diseases, 2004. **39**: p. 1654-1659.
  18. Tsai, F.C., et al., *Pyogenic liver abscess as endemic disease, Taiwan*. Emerg Infect Dis, 2008. **14**(10): p. 1592-600.
  19. Chung, D.R., et al., *Emerging invasive liver abscess caused by K1 serotype Klebsiella pneumoniae in Korea*. J Infect, 2007. **54**(6): p. 578-83.
  20. Paterson, D.L. and R.A. Bonomo, *Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update*. Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(4): p. 657-86.
  21. Yigit, H., et al., *Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(4): p. 1151-61.
  22. Eftekhari., F. and Z. Naseh., *Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and carbapenemase production among burn and non-burn clinical isolates of Klebsiella pneumoniae* Iran J Microbiol., 2015. **7**(3): p. 144-149.
  23. Kang., C.-I., et al., *Community-Acquired versus Nosocomial Klebsiella pneumoniae Bacteremia: Clinical Features, Treatment Outcomes, and Clinical Implication of Antimicrobial Resistance*. J Korean Med Sci 2006. **21**: p. 816-22.
  24. Murdoch, S.L., et al., *The opportunistic pathogen Serratia marcescens utilizes type VI secretion to target bacterial competitors*. J Bacteriol, 2011. **193**(21): p. 6057-69.
  25. Green, E.R. and J. Mecsas, *Bacterial Secretion Systems: An Overview*. Microbiol Spectr, 2016. **4**(1).
  26. AR., R., *The Type VI Secretion System: A Multipurpose Delivery System with a Phage-Like Machinery* Mol Plant Microbe Interact, 2011. **24**(7): p. 751-757.
  27. Pukatzki, S., et al., *Identification of a conserved bacterial protein secretion system in Vibrio cholerae using the Dictyostelium host model system*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(5): p. 1528-33.

- 
28. Mougous, J.D., et al., *A virulence locus of Pseudomonas aeruginosa encodes a protein secretion apparatus*. Science, 2006. **312**(5779): p. 1526-30.
29. Alvarez-Martinez, C.E. and P.J. Christie, *Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems*. Microbiol Mol Biol Rev, 2009. **73**(4): p. 775-808.
30. Cornelis, G.R., *The type III secretion injectisome*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(11): p. 811-25.
31. Pukatzki, S., et al., *Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(39): p. 15508-13.
32. Hood, R.D., et al., *A type VI secretion system of Pseudomonas aeruginosa targets a toxin to bacteria*. Cell Host Microbe, 2010. **7**(1): p. 25-37.
33. Schwarz, S., et al., *Burkholderia type VI secretion systems have distinct roles in eukaryotic and bacterial cell interactions*. PLoS Pathog, 2010. **6**(8): p. e1001068.
34. MacIntyre, D.L., et al., *The Vibrio cholerae type VI secretion system displays antimicrobial properties*. PNAS, 2010. **107**(45): p. 19520-19524.
35. Alcoforado Diniz, J., Y.C. Liu, and S.J. Coulthurst, *Molecular weaponry: diverse effectors delivered by the Type VI secretion system*. Cell Microbiol, 2015. **17**(12): p. 1742-51.
36. Shrivastava, S. and S.S. Mande, *Identification and functional characterization of gene components of Type VI Secretion system in bacterial genomes*. PLoS One, 2008. **3**(8): p. e2955.
37. Boyer, F., et al., *Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources?* BMC Genomics, 2009. **10**: p. 104.
38. Filloux, A., A. Hachani, and S. Bleves, *The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 6): p. 1570-83.
39. Zoued, A., et al., *Architecture and assembly of the Type VI secretion system*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1843**(8): p. 1664-73.
40. Basler, M., *Type VI secretion system: secretion by a contractile nanomachine*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2015. **370**(1679).
41. Leiman, P.G., et al., *Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(11): p. 4154-9.
42. Kanamaru., S., et al., *Structure of the cell-puncturing device of bacteriophage T4*. Nature, 2002. **415**(31): p. 553-557.
43. Pietrosiuk, A., et al., *Molecular basis for the unique role of the AAA+*

- chaperone ClpV in type VI protein secretion.* J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 30010-21.
44. Durand, E., et al., *VgrG, Tae, Tle, and beyond: the versatile arsenal of Type VI secretion effectors.* Trends Microbiol, 2014. **22**(9): p. 498-507.
  45. Weber, B.S., et al., *The Secrets of Acinetobacter Secretion.* Trends Microbiol, 2017.
  46. Alteri, C.J. and H.L. Mobley, *The Versatile Type VI Secretion System.* Microbiol Spectr, 2016. **4**(2).
  47. Hachani, A., T.E. Wood, and A. Filloux, *Type VI secretion and anti-host effectors.* Curr Opin Microbiol, 2016. **29**: p. 81-93.
  48. Schwarz., S., et al., *VgrG-5 Is a Burkholderia Type VI Secretion System-Exported Protein Required for Multinucleated Giant Cell Formation and Virulence.* Infection and Immunity, 2014. **82**(4): p. 1445-1452.
  49. Ma, A.T., et al., *Translocation of a Vibrio cholerae type VI secretion effector requires bacterial endocytosis by host cells.* Cell Host Microbe, 2009. **5**(3): p. 234-43.
  50. Jiang, F., et al., *A Pseudomonas aeruginosa type VI secretion phospholipase D effector targets both prokaryotic and eukaryotic cells.* Cell Host Microbe, 2014. **15**(5): p. 600-10.
  51. Russell, A.B., et al., *Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells.* Nature, 2011. **475**(7356): p. 343-7.
  52. Carpenter, B.M., J.M. Whitmire, and D.S. Merrell, *This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis.* Infect Immun, 2009. **77**(7): p. 2590-601.
  53. ESCOLAR., L.A., J. PE REZ-MARTI N., and V.C.D. LORENZO., *Opening the Iron Box : Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein.* JOURNAL OF BACTERIOLOGY, 1999. **181**(20): p. 6223–6229.
  54. Chakraborty, S., et al., *Two-component PhoB-PhoR regulatory system and ferric uptake regulator sense phosphate and iron to control virulence genes in type III and VI secretion systems of Edwardsiella tarda.* J Biol Chem, 2011. **286**(45): p. 39417-30.
  55. Brunet, Y.R., et al., *An epigenetic switch involving overlapping fur and DNA methylation optimizes expression of a type VI secretion gene cluster.* PLoS Genet, 2011. **7**(7): p. e1002205.
  56. Lucchini, S., et al., *H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria.* PLoS Pathog, 2006. **2**(8): p. e81.
  57. Fang., F.C. and S. Rimsky., *New Insights into Transcriptional Regulation by H-NS.* Curr Opin Microbiol. , 2008. **11**(2): p. 113–120.



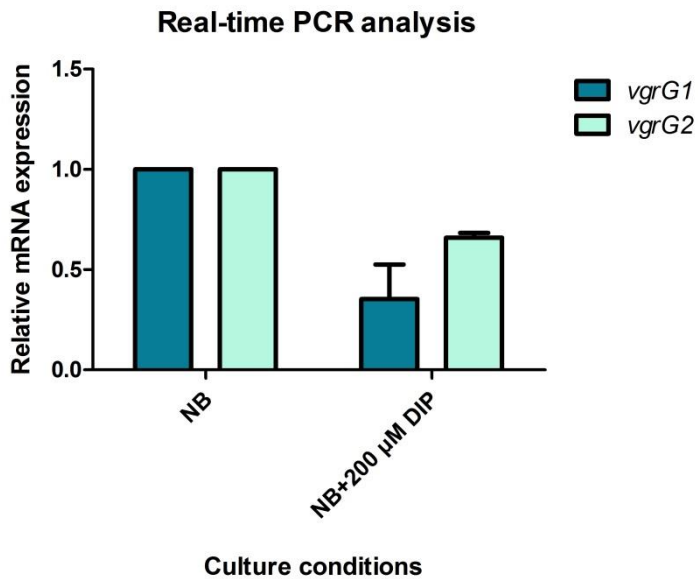
- 
58. Navarre, W.W., et al., *Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA*. *Genes Dev*, 2007. **21**(12): p. 1456-71.
59. Zhang, J., et al., *A new target for the old regulator: H-NS suppress T6SS secretory protein EvpP, the major virulence factor in the fish pathogen Edwardsiella tarda*. *Lett Appl Microbiol*, 2014. **59**(5): p. 557-64.
60. Cui, S., et al., *H-NS binding to evpB and evpC and repressing T6SS expression in fish pathogen Edwardsiella piscicida*. *Arch Microbiol*, 2016. **198**(7): p. 653-61.
61. Salomon, D., J.A. Klimko, and K. Orth, *H-NS regulates the Vibrio parahaemolyticus type VI secretion system I*. *Microbiology*, 2014. **160**(Pt 9): p. 1867-73.
62. Brunet, Y.R., et al., *H-NS Silencing of the Salmonella Pathogenicity Island 6-Encoded Type VI Secretion System Limits Salmonella enterica Serovar Typhimurium Interbacterial Killing*. *Infect Immun*, 2015. **83**(7): p. 2738-50.
63. Lapouge, K., et al., *Gac/Rsm signal transduction pathway of gamma-proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour*. *Mol Microbiol*, 2008. **67**(2): p. 241-53.
64. Goodman, A.L., et al., *Direct interaction between sensor kinase proteins mediates acute and chronic disease phenotypes in a bacterial pathogen*. *Genes Dev*, 2009. **23**(2): p. 249-59.
65. Coggan, K.A. and M.C. Wolfgang., *Global Regulatory Pathways and Cross-talk Control Pseudomonas aeruginosa Environmental Lifestyle and Virulence Phenotype*. *Curr Issues Mol Biol*, 2012. **14**(2): p. 47-70.
66. Li, K., et al., *SuhB is a regulator of multiple virulence genes and essential for pathogenesis of Pseudomonas aeruginosa*. *MBio*, 2013. **4**(6): p. e00419-13.
67. Ng, W.L. and B.L. Bassler, *Bacterial quorum-sensing network architectures*. *Annu Rev Genet*, 2009. **43**: p. 197-222.
68. Parsek, M.R. and E.P. Greenberg, *Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms*. *Trends Microbiol*, 2005. **13**(1): p. 27-33.
69. Zheng, J., et al., *Quorum sensing and a global regulator TsrA control expression of type VI secretion and virulence in Vibrio cholerae*. *PNAS*, 2010. **107**(49): p. 21128–21133.
70. Ishikawa, T., et al., *Quorum sensing regulation of the two hcp alleles in Vibrio cholerae O1 strains*. *PLoS One*, 2009. **4**(8): p. e6734.
71. Ishikawa, T., et al., *Pathoadaptive conditional regulation of the type VI secretion system in Vibrio cholerae O1 strains*. *Infect Immun*, 2012. **80**(2): p. 575-84.

- 
72. Mougous, J.D., et al., *Threonine phosphorylation post-translationally regulates protein secretion in Pseudomonas aeruginosa*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(7): p. 797-803.
73. A. J. Varshavsky, et al., *Histone-like proteins in the purified Escherichia coli deoxyribonucleoprotein*. Nucleic Acids Research, 1977. **4**(8): p. 2725–2745.
74. Hommais F1, et al., *Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS*. Molecular Microbiology, 2001. **40**(1): p. 20-36.
75. Winardhi, Rickson S., J. Yan, and Linda J. Kenney, *H-NS Regulates Gene Expression and Compacts the Nucleoid: Insights from Single-Molecule Experiments*. Biophysical Journal, 2015. **109**(7): p. 1321-1329.
76. Picker, M.A. and H.J. Wing, *H-NS, Its Family Members and Their Regulation of Virulence Genes in Shigella Species*. Genes (Basel), 2016. **7**(12).
77. Singh, K., J.N. Milstein, and W.W. Navarre, *Xenogeneic Silencing and Its Impact on Bacterial Genomes*. Annu Rev Microbiol, 2016. **70**: p. 199-213.
78. Grainger, D.C., *Structure and function of bacterial H-NS protein*. Biochem Soc Trans, 2016. **44**(6): p. 1561-1569.
79. Lang, B., et al., *High-affinity DNA binding sites for H-NS provide a molecular basis for selective silencing within proteobacterial genomes*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(18): p. 6330-7.
80. Park, H.S., et al., *Novel role for a bacterial nucleoid protein in translation of mRNAs with suboptimal ribosome-binding sites*. Genes Dev, 2010. **24**(13): p. 1345-50.
81. Sarris, P.F., et al., *Distribution of the putative type VI secretion system core genes in Klebsiella spp*. Infect Genet Evol, 2011. **11**(1): p. 157-66.
82. Fang, C.T., et al., *A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications*. J Exp Med, 2004. **199**(5): p. 697-705.
83. Lin, T.L., et al., *Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in Klebsiella pneumoniae*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 31644.
84. Hsieh, P.F., et al., *The Klebsiella pneumoniae YfgL (BamB) lipoprotein contributes to outer membrane protein biogenesis, type-1 fimbriae expression, anti-phagocytosis, and in vivo virulence*. Virulence, 2016. **7**(5): p. 587-601.
85. Collins SJ, et al., *Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1978. **75**(5): p. 2458-62.
86. Ian D. Trayner, et al., *Changes in antigen expression on differentiating HL60*

cells treated with dimethylsulphoxide, all-trans retinoic acid,  $\alpha$ 1,25-dihydroxyvitamin D3 or 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate. Leukemia Research 1998. **22**: p. 537–547.

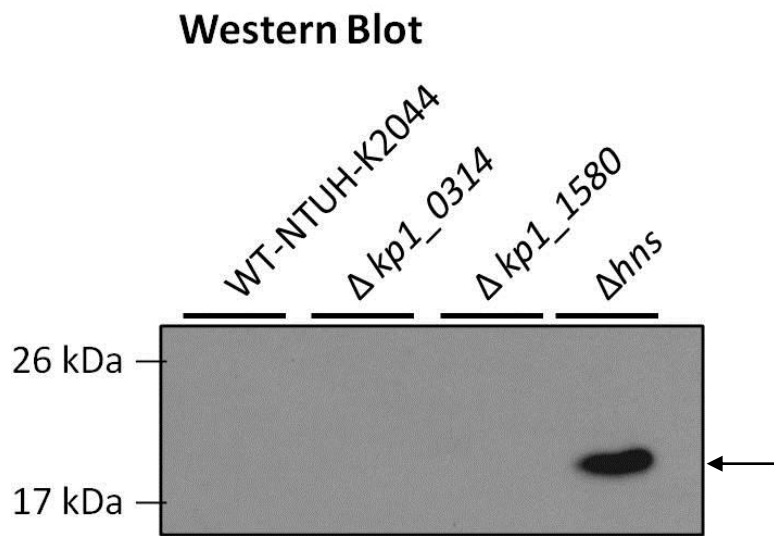
87. Deshpande, A., et al., *Quantitative analysis of the effect of cell type and cellular differentiation on protective antigen binding to human target cells*. FEBS Lett, 2006. **580**(17): p. 4172-5.
88. Miyata, S.T., V. Bachmann, and S. Pukatzki, *Type VI secretion system regulation as a consequence of evolutionary pressure*. J Med Microbiol, 2013. **62**(Pt 5): p. 663-76.
89. Bleumink-Pluym, N.M., et al., *Identification of a functional type VI secretion system in Campylobacter jejuni conferring capsule polysaccharide sensitive cytotoxicity*. PLoS Pathog, 2013. **9**(5): p. e1003393.

## 附錄



### 附錄一、鐵離子濃度對 NTUH-K2044 之 *vgrG1* 及 *vgrG2* mRNA 表現量的影響

圖中深藍色柱狀為 *vgrG1* mRNA 表現量，而淺藍色柱狀為 *vgrG2* mRNA 表現量。實驗結果以培養於 Nutrient broth (NB) 之野生型 NTUH-K2044 為基因表現量的比較基準，並使用 200  $\mu$ M 鐵螯合劑 2,2'-dipyridyl (DIP) 來創造低鐵的培養環境。結果為三次獨立試驗的平均值；誤差線(error bars)代表平均值標準誤差(standard error of the mean, SEM)。



#### 附錄二、*suhB* 基因剔除株( $\Delta kp1\_0314$ 和 $\Delta kp1\_1580$ )之 Hcp 蛋白質表現

收取經隔夜培養的 *suhB* 基因剔除株( $\Delta kp1\_0314$  和  $\Delta kp1\_1580$ )之細菌細胞溶解物，以西方墨點法並未偵測到 Hcp 蛋白質的表現，箭頭所示為 Hcp 蛋白質的訊號，實驗中以稀釋倍數 1:100,000 之 Rabbit anti-*Kp* Hcp 進行偵測。