

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

探討克雷伯氏肺炎桿菌NarX-NarL雙分子調控系統之
功能

Functional characterization of two component system

NarX-NarL in *Klebsiella pneumoniae*

陳曉蝶

Hsiao-Tieh Chen

指導教授：王錦堂 博士

Advisor: Jin-Town Wang, Ph.D.

中華民國 112 年 8 月

August, 2023

口試委員審定書



國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

MASTER'S THESIS ACCEPTANCE CERTIFICATE
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY

探討克雷伯氏肺炎桿菌雙分子調控系統 NarX-NarL 之功能

(論文中文題目) (Chinese title of Master's thesis)

Functional characterization of two component system NarX-NarL in *Klebsiella pneumoniae*

(論文英文題目) (English title of Master's thesis)

本論文係 陳曉蝶 (姓名) 109445128 (學號) 在國立臺灣大學 微生物 (系/所/學位學程) 完成之碩士學位論文，於民國 112 年 7 月 24 日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明。

The undersigned, appointed by the Department / Institute of Microbiology on 24 (date) 7 (month) 2023 (year) have examined a Master's thesis entitled above presented by Chen Hsiao Tieh (name) 109445128 (student ID) candidate and hereby certify that it is worthy of acceptance.

口試委員 Oral examination committee:

王錦堂

(指導教授 Advisor)

賴信志

黃信連

張景為

系主任/所長 Director:

蔡啟華



誌謝

首先，我想感謝老師在我碰壁的一年伸出了援手，讓我加入了 R739 的家庭，在這裡我左看右瞧都是生命中的貴人，向右一瞥迎來活潑的佩芳學姊，談吐幽默談諧，剛開始因為有了第一年的經驗，做實驗都會擔心結果，但是見過世間風雨及冷暖的學姊會平靜我的心，理性我的思緒讓我能專心思考如何解決問題，真所謂實驗室之寶，非常幸運這兩年有您當我的顧問，而接續這個重任的便是 hard-working 的宗璇學姊，憑著你不屈不饒的精神，帶領著缺乏牧羊人的小羔羊們，一起討論實驗和一起計畫旅行，不管是正事抑或玩樂，都有一把刷子，我們而唱雙簧少不了一位同伴，育涵身為實驗室的資深學姊，也時常提攜後輩，提醒我們該注意的大小事，準備 committee 和 presentation 時你都能提供非常實用的意見，也適時刺激我們為生活帶來色彩。雖然跟小庭萱時間上沒什麼交集，但你早起上班效率工作的精神令我看齊，惠萱雖然安靜但是做事也很認真負責，還會跟我分享信教心路歷程，令我受益良多，好萱的加入也為實驗室增添了歡樂，也時常會提醒我們，彥茹好夥伴則時常幫助我做值日生，最感激你在 meeting 改時間時 morning call 我，也會跟我交流禁忌的話題，希望碩一們的實驗都順利，再來是柏祐的舞蹈也為我第一年轉來時順利的破冰融入實驗室，你努力的態度也有目共睹，將來必成大器，庭萱則是溫柔從容的存在，讓我了解職場的環境，提供未來的方向，漢甦很安靜但是做事挺細心，應該是有個溫柔的靈魂，希望你也能朝目標前進，寫到此已文思枯竭，但尚有同袍兩人，不提同不義，佳育是個可靠的朋友，也為不諳世事的解惑許多，並一起分擔這兩年的壓力，互吐口水，是 indispensable 的存在，Tammy has a funny and yet self-disciplined character which I admire much. Thank you for your emotional encouragement for when I feel stuck at work or just too lazy to go to workout. 最後，能從台大畢業要謝謝各位，希望未來能再相遇。



中文摘要

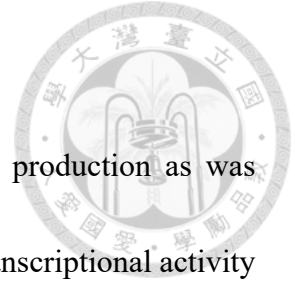
本實驗室先前研究發現在分枝結核桿菌中，過度表現雙分子調控系統 (TCS) 的缺氧反應基因 *devS* 及 *devR* 會抑制 NLRP3 的活化，而克雷伯氏肺炎桿菌的 *narX* 及 *narL* 和前兩者皆有高達 32% 的序列相似度。已有研究指出 NarX-NarL 雙分子調控系統在 *E. coli* 中可以調控硝酸鹽之呼吸作用，但此系統與細菌致病力的關係尚未受到討論。本研究目的為瞭解 NarX-NarL 雙分子調控系統在克雷伯氏肺炎桿菌感染時的重要性，並探討其相關下游傳導路徑。我們以酵素結合免疫吸附分析法測量無標記基因剔除株 $\Delta narX$ 感染 THP-1 巨噬細胞時 IL-1 β 的釋放量，結果顯示野生株及 $\Delta narX$ 之間並無顯著差異，表示 *narX* 不太參與活化發炎小體的路徑。並且，剔除 *narX* 也不會影響生物膜的生成。然而，我們觀察到在厭氧環境的 minimal agar 上， $\Delta narX$ 生長不論有無硝酸鹽的刺激，生長情形都相似，但視野生株的生長情形在添加硝酸鹽後有明顯好轉。基因微陣列分析結果發現 *narX* 在有氧環境下似乎對整體細胞的 total RNA 表現影響不大。接著，*in vitro* 的實驗顯示 $\Delta narX$ 對 THP-1 巨噬細胞的胞噬作用具更高的抵抗力，而從比色法再加上轉錄活性稍微較高的莢膜多醣基因群來推知，此現象可能是由較厚的莢膜多醣所造成。綜合上述，此研究再次證明 *narX* 能夠調節硝酸鹽呼吸作用的相關基因，且可能參與莢膜多醣的合成，影響感染時宿主胞噬作用的效力。

關鍵字：克雷伯氏肺炎桿菌、NarX-NarL 雙分子調節系統、發炎小體、IL-1 β 、胞噬作用



Abstract

Klebsiella pneumoniae genes: *narX* and *narL* exhibit 32% sequence homology with hypoxia-induced two component system genes: *devS* and *devR* in *Mycobacterium tuberculosis*, whose over-expressions were shown to suppress NLRP3 inflammasome activation from our previous study. The molecular function of NarX-NarL two component system was known as the nitrate respiration modulator in *E. coli*. However, the role it plays in bacterial pathogenicity remains unknown. This study aims to understand the importance of NarX-NarL system during *Klebsiella pneumoniae* infection. ELISA was performed to record IL-1 β release upon THP-1 macrophage infection by *narX* deletion mutant, $\Delta narX$, which was constructed through unmarked deletion technique. The result showed no significant change in IL-1 β release compared to the wild type strain, indicating *narX* played a minor role in inflammasome activation. Insignificant change in biofilm formation was also observed upon deletion of *narX*. However, although cell growth assay revealed that the growth of $\Delta narX$ remained the same with or without nitrate induction anaerobically, wild type strain's growth was improved upon nitrate supplementation. DNA array analysis demonstrated that *narX* had less impact on the overall RNA expression profile while growing aerobically. Further *in vitro* experiment showed that $\Delta narX$ displayed increased resistance to phagocytosis by THP-1 macrophage.



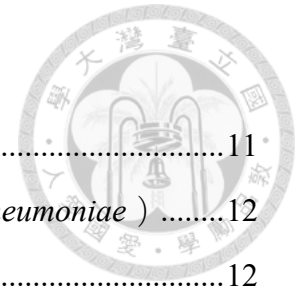
This might be explained by higher capsule polysaccharide (CPS) production as was determined with a colorimetric assay and with a mild elevation in transcriptional activity within the CPS loci. Collectively, these data confirmed the role of *narX* in regulating nitrate respiration genes and capsule polysaccharide production, and demonstrated its relevance to phagocytic escape during infection.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, NarX-NarL two-component system, inflammasome, IL-1 β , phagocytosis



目錄

口試委員審定書	I
誌謝	II
中文摘要	III
Abstract	IV
目錄	VI
表目錄	IX
圖目錄	X
第一章、緒論	1
1.1 克雷伯氏肺炎桿菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)	1
1.2 發炎小體 (<i>Inflammasome</i>)	2
1.3 克雷伯氏肺炎桿菌與發炎小體 (<i>K. pneumoniae</i> and <i>inflammasome</i>)	2
1.4 雙分子調節系統 (<i>Two-component system</i>)	3
1.5 NarX-NarL 雙分子調控系統 (<i>NarX-NarL two-component system</i>)	4
1.6 NarX-NarL 系統及生物膜之形成 (<i>NarX-NarL system and biofilm formation</i>)	5
1.7 研究目標 (<i>Study aim</i>)	7
第二章、材料與方法	8
2.1 菌株 (<i>Bacterial strain</i>)	8
2.2 細胞株 (<i>Cell line</i>)	8
2.3 建構 $\Delta narX$ 之基因剔除株 (<i>Construction of deletion mutant $\Delta narX$</i>)	8
2.4 建構 $\Delta narX$ 之基因補回株 (<i>Construction of $\Delta narX$ complementation strains</i>)	9
2.5 巨噬細胞感染 (<i>Macrophage infection</i>)	10
2.6 酵素免疫吸附分析法 (<i>Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA</i>)	11
2.7 乳酸脫氫酶細胞毒性測試 (<i>LDH cytotoxicity assay</i>)	11
2.8 生物膜形成測試 (<i>Biofilm assay</i>)	11



2.9 藥物感受性測試 (Antimicrobial susceptibility test)	11
2.10 萃取克雷伯氏肺炎桿菌之 RNA (RNA extraction of <i>K. pneumoniae</i>)	12
2.11 DNA 微陣列分析 (DNA microarray)	12
2.12 細菌生長測試 (Bacterial growth assay)	16
2.13 胞噬作用檢測 (Macrophage phagocytosis assay)	17
2.14 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR)	17
2.15 莢膜多醣之定量 (Capsular polysaccharide quantification)	18
2.16 統計分析 (Statistical analysis)	19
第三章、結果	20
3.1 基因序列對比 (BLAST)	20
3.2 $\Delta narX$ 基因剔除確認 ($\Delta narX$ confirmation)	20
3.3 $\Delta narX$ 活化發炎小體之情形 (Effect of $\Delta narX$ infection on inflammasome)	20
3.4 $\Delta narX$ 生物膜之生成 (Biofilm formation of $\Delta narX$)	21
3.5 藥物感受性測試 (Antimicrobial susceptibility test)	21
3.6 基因微陣列分析 (DNA microarray)	21
3.7 NTUH-K2044 和 $\Delta narX$ 補回株之回補確認 (complementation strain confirmation)	23
3.7 $\Delta narX$ 的生長情形 (Growth of $\Delta narX$)	23
3.8 對胞噬作用的影響 (Effect on phagocytosis)	23
3.9 莢膜多醣的生成改變 (Capsular polysaccharide production change)	24
第四章、討論	26
參考文獻	31
表 一、本論文使用之引子	37
表 二、基因微陣列表現量顯著改變之基因	39
圖 一、以 NCBI blast NTUH-K2044 genome 序列之結果	40
圖 二、pKO3- <i>narX</i> -FR-km	41



圖 三、無標記基因剔除 (unmarked deletion) 流程圖	42
圖 四、NTUH-K2044 之突變株 $\Delta narX$ 基因剔除結果	43
圖 五、 $\Delta narX$ 感染 THP-1 的細胞死亡率及 IL-1 β 分泌量	44
圖 六、生物膜之生成	45
圖 七、藥物感受性測試	46
圖 八、基因微陣列分析 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 中 RNA 之表現量流程圖	47
圖 九、NTUH-K2044 與 $\Delta narX$ 的基因微陣列分析	48
圖 十、NTUH-K2044 和 $\Delta narX$ 補回株之回補結果	49
圖 十一、 $\Delta narX$ 生長情形	50
圖 十二、胞噬作用測試	51
圖 十三、莢膜多醣定量	52
圖 十四、莢膜基因群 mRNA 表現量	53
附錄	54
附錄 一、 <i>E. coli</i> 中 NarX-NarL 相關基因的分佈和功能之示意圖	54
附錄 二、pJET1.2/blunt map	55
附錄 三、pCR®-Blunt II-TOPO® vector map	56
附錄 四、初步結果： $\Delta narX$ 感染 THP-1 的細胞死亡率及 IL-1 β 分泌量	57



表目錄

表 一、本論文使用之引子.....	37
表 二、基因微陣列表現量顯著改變之基因.....	39



圖目錄

圖 一、以 NCBI blast NTUH-K2044 genome 序列之結果.....	40
圖 二、pKO3- <i>narX</i> -FR-km	41
圖 三、無標記基因剔除 (unmarked deletion) 流程圖	42
圖 四、NTUH-K2044 之突變株 $\Delta narX$ 基因剔除結果.....	43
圖 五、 $\Delta narX$ 感染 THP-1 的細胞死亡率及 IL-1 β 分泌量	44
圖 六、生物膜之生成.....	45
圖 七、藥物感受性測試.....	46
圖 八、基因微陣列分析 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 中 RNA 之表現量流程圖.....	47
圖 九、NTUH-K2044 與 $\Delta narX$ 的基因微陣列分析	48
圖 十、NTUH-K2044 和 $\Delta narX$ 補回株之回補結果	49
圖 十一、 $\Delta narX$ 生長情形	50
圖 十二、胞噬作用測試.....	51
圖 十三、莢膜多醣定量	52
圖 十四、莢膜基因群 mRNA 表現量	53



第一章、緒論

1.1 克雷伯氏肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae*)

克雷伯氏肺炎桿菌屬於腸內菌科 (*Enterobacteriaceae* family)，為有莢膜不具運動性之革蘭氏陰性菌，平時居住在土壤水源及健康人體胃腸道及咽喉部位，在宿主免疫力低下時，會侵入組織，為伺機性病原菌 (*opportunistic bacteria*)，可造成眼內炎、肺炎、腦膜炎、泌尿道感染、肝膿瘍，嚴重會造成敗血甚至死亡。

全世界院內型感染 (*nosocomial infection*) 中，克雷伯氏肺炎桿菌所造成的病例就佔了 10% [1]。而在台灣，從 1990 年起即發現患有社區型化膿性肝膿瘍 (*community-acquired pyogenic liver abscess; PLA*) 的患者中，有 11% 病例來自單一菌種，也就是克雷伯氏肺炎桿菌所引起，且患有糖尿病的病患受此菌所感染的比率又更高 [2]。而根據台灣衛生福利部統計結果 [3]，醫學中心加護病房的細菌感染菌種排名中，2012 到 2021，其都在前五名，且隨年逐漸往前，2021 年登上第一名，佔 11.3% 細菌感染之病例。

臨床治療上，由於抗生素過多的使用，長期受到藥物壓力的克雷伯氏肺炎桿菌變演化出多種對抗抗生素的機制，包括分泌廣效型以內醯安酶 (*extended-spectrum-lactamases; ESBLs*)，導致頭孢菌素類 (*cephalosporins*)、單環內醯胺類 (*monobactams*) 藥物喪失效果，也使後線藥物碳青黴烯類 (*carbapenems*) 喪失其效力，最終導致 *Carbapenem resistant K. pneumoniae* (*CRKP*) 的出現，都為台灣醫界如何對預防克雷伯氏肺炎桿菌之傳播帶來一大挑戰 [4]。

克雷伯氏肺炎桿菌主要藉由良好的防禦機制來逃避宿主的免疫系統，並能夠在腸道群聚，克雷伯氏肺炎桿菌演化出許多致病因子 (*virulence factor*)，菌株 (*strain*) 之間雖對如何抵抗宿主免疫攻擊有所不同 [5] [6]，但大部分的菌株似乎都對補體系統具抵抗力 [7] [8]，幾個主要的致病因子包括外層莢膜多醣體 (*polysaccharide*



capsule)、脂多醣 (lipopolysaccharide ; LPS)、螯鐵蛋白 (siderophores) 及線毛 (fimbriae)，其中，莢膜可以幫助細菌不受體液免疫及吞噬作用所消滅；LPS 會促使宿主產生發炎反應，嚴重時則會導致休克；克雷伯氏菌所製造的多種螯鐵蛋白，能夠與宿主蛋白競爭鐵來助於感染的進行；線毛則有利菌體依附在宿主上皮細胞。然而，許多掌控與代謝相關路徑之基因，其和致病機制的關係尚未明瞭 [9]。

1.2 發炎小體 (Inflammasome)

發炎小體 (Inflammasome) 最初為科學家在 2002 年，從 LPS 刺激後的人類單核球細胞中所發現之大分子量多蛋白之聚合物 [10]，在受到病原相關分子模式 (pathogen-associated molecular patterns; PAMPs) 和損傷相關分子模式 (danger-associated molecular patterns; DAMPs) 的刺激下，會藉由多蛋白的聚集，增強下游的發炎反應，並在許多細胞種類中都會表現，在先天免疫中扮演重要的角色。結構上，它是由傳感器 (sensor)，銜接子 (adaptor) 及效應物 (effector) 所組成，sensor 則主要包括 NLR (NBD leucine-rich repeat-containing receptor) family 及結構上不同的 PYHIN (pyrin and hematopoietic interferon-inducible nuclear domain) family [11]

1.3 克雷伯氏肺炎桿菌與發炎小體 (*K. pneumoniae* and inflammasome)

在克雷伯氏肺炎桿菌感染時，宿主細胞最先以 TLR4 辨認細菌外部 LPS，再進而刺激下游 NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3) 活化，而 NLRP3 就屬於其中一個 NLR family 中的 inflammasome sensor protein，有研究指出在病原體感染時所造成的鉀離子外流可能就是促使了 NLRP3 活化的直接原因 [12]，活化的 NLRP3 則會和 adaptor 及胱天蛋白酶 (pro-caspase 1) 組裝成三分子



結構，多個此結構的複合物便形成 inflammasome，pro-caspase-1 因為鄰近效應而切割並活化彼此 (proximity-induced activation)，活化後的 caspase-1 則會去刺激下游第一型介白素 β (interleukin-1 β ; IL-1 β)，使的細胞激素 IL-1 β 的成熟及釋放，同時 caspase-1 也會造成 gasdermin D (GSDMD) N 端的脫離，GSDMD^{Nterm} 並會聚合插入細胞膜，造成細胞焦亡 (pyroptosis) 另外，也有研究指出活化的 NLRP3 能刺激 NF- κ B 的轉譯，進而增強免疫反應 [13]。

一篇研究利用跟本篇相同雷伯氏肺炎桿菌菌株 NTUH-K2044 去感染老鼠巨噬細胞 J774A.1，當以針對 NLRP3 的小髮夾 RNA (short hairpin RNA ; shRNA) 去抑制其在巨噬細胞的轉譯時，NTUH-K2044 的感染所造成 IL-1 β 釋出的量跟感染正常 J774A.1 比下降了一半以上，代表 NTUH-K2044 感染時 IL-1 β 的釋出主要是由 NLRP3 所引起 [14]。

另外，另一個 NLR inflammasome，NLRC4，能藉由偵測細菌的 flagellin 和 Type 3 secretion system 活化和 NLRP3 下游相似的路徑，刺激 IL-1 β 的釋放和吸引 neutrophils 的聚集。文獻也指出以克雷伯氏肺炎桿菌感染缺乏 NLRC4 的 human-derived 或 mice-derived macrophage 時，相較正常細胞釋放明顯較少 IL-1 β ，在感染缺乏 NLRC4 的小鼠模式中，小鼠死亡率也顯著提高，結果顯示 NLRC4 對於清除克雷伯氏肺炎桿菌有相當的重要性，能提供宿主一定的保護力[15]。

此外，在克雷伯氏肺炎桿菌感染時，IL-1 β 的釋放也可受到 LPS 活化 non-canonical inflammasome caspase-11 而造成 [16]，顯示克雷伯氏肺炎桿菌可能經由刺激宿主細胞多種免疫路徑而引起 IL-1 β 釋放。

1.4 雙分子調節系統 (Two-component system)



經本實驗室已畢業碩士生鐘碩恩學長研究發現，以和分枝結核桿菌基因上高度相似的海洋分枝桿菌 (*Mycobacterium marinum*) 感染已分化成巨噬細胞的人類單核球細胞株 THP-1 時，在菌中過度表現 *devR* 或 *devS* 基因後，經由 NLRP3 刺激所釋放 IL-1 β 的量有明顯的降低，表示 *devR* 及 *devS* 參與了抑制 NLRP3 inflammasome 活化的路徑，並藉由調節此免疫路徑，可能利於細菌在宿主体內的生存 [17]，而本研究藉由 NCBI blast 對比相關序列，找到在克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 基因中具最高序列相似度之蛋白分別屬於：*narX*(*devS*; 32%) 和 *narL* (*devR*; 32%) (圖一)。

和 *devR* 及 *devS* 一樣，*narX* 及 *narL* 屬於一種雙分子調節系統 (two-component system; TCS)，為在細菌內常見且較為上游的訊息傳遞系統，其能偵測外界溫度、酸鹼、離子濃度差等環境變化，進而作出適當反應，且與細菌的致病優勢也息息相關 [18]，典型的雙分子調節系統由一個組氨酸激酶 (histidine kinase) 作為傳感器及一個調節蛋白 (response regulator) 所組成，傳感器位於細胞膜上，當接受到刺激時能夠自體磷酸化 (autophosphorylation) 組氨酸，進而促進調節蛋白的磷酸化，磷酸化的調節蛋白便可以進入細胞核中，結合特定核酸序列，調節相關下游基因之轉譯。

1.5 NarX-NarL 雙分子調控系統 (NarX-NarL two-component system)

NarX-NarL 系統為扮演感應環境中的氮源重要角色之一，細菌可利用外界的含氮物質以達到不同的目的，包括經過硝酸鹽同化作用 (nitrate assimilation)，將無機的氮源轉化成助於細菌生長的生物質 (biomass)；或益於生物體內氧化還原之平衡的硝酸鹽異化作用 (nitrate dissimilation)；抑或在缺乏氧氣時透過硝酸鹽呼吸作用 (nitrate respiration) 來獲得能量 [19]，而主管硝酸鹽之呼吸作用的基因便是



NarX-NarL 系統。細菌本在呼吸作用中可利用不同物質作為最終電子的接收者，由偏好使用的排序高到低為氧氣、硝酸鹽 (NO_3^-)、二甲基亞砜 (DMSO)、氧化三甲胺 (TMAO) 和 fumarate，根據氧化還原之電位高低，細菌在有氧情況下，會傾向使用氧氣接收電子，而獲得最多能量，但在在缺凡氧氣的環境下，則會退而求其次利用硝酸鹽來保持質子驅動力以產生所需之能量 [20]，而此系統在大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 中受到最多的研究，見附錄一，*narL* 基因序列緊接在 *narX* 下游，共用相同的啟動子 (promoter)，當環境缺氧時 FNR (fumarate and nitrate reductase regulation) 蛋白會被活化並結合在硝酸鹽還原酶 (nitrate reductase) 啟動子區域 [21]，而硝酸鹽的添加會引發 NarX 傳感器的活化進而促使 NarL 蛋白進核並黏上硝酸鹽還原酶的啟動子區域，這個 FNR 和 NarL 的 dual-binding 會使 *narGHJI* operon 的表現上升，*narG*、*narH*、*narJ*、*narI* 各為組成硝酸鹽還原酶之次單元 [22]，其可催化硝酸鹽轉化成亞硝酸鹽 (nitrite)，最終經由其他酶的催化釋放代謝產物於體外。

1.6 NarX-NarL 系統及生物膜之形成 (NarX-NarL system and biofilm formation)

在 2017 年的一篇研究當中，科學家發現在有氧環境下，添加 10mM 硝酸鹽便可抑制類鼻疽 (*Burkholderia pseudomallei*) 的生物膜形成，而剔除掉 *narX*、*narL* 等 *nar* 任一相關基因，此現象便不復見，推測是由受硝酸鹽刺激後的 NarX-NarL 系統活化—c-di-GMP 上游的負調控因子後，造成菌內 c-di-GMP 濃度下降，而 c-di-GMP 作為已知細菌形成生物膜機制的調控者，下降的 c-di-GMP 因此抑制生物膜的生成[23]。同一團隊在 2022 年發表的文章中，證明厭氧環境下隨硝酸鹽濃度增高，反而類鼻疽生物膜的生成量會同步上升，顯示在不同氧含量下，細菌 NarX-

NarL 系統對硝酸鹽刺激後反應之差異 [24]，事實上，探討 NarX-NarL 系統和致病力之關係的論文相當稀少，而目前也沒有在克雷伯氏肺炎桿菌中有相關的研究。





1.7 研究目標 (Study aim)

本實驗室先前的研究成果發現，在分枝結核桿菌中與 NarX 及 NarL 序列相似的 DevS 及 DevR 蛋白參與了 NLRP3-mediated 的發炎反應，為潛在之致病因子，而現今對於 NarX-NarL 系統在致病方面的機制未深入探討，也尚未有研究 NarX-NarL 雙分子調控系統在克雷伯氏肺炎桿菌中的生物重要性。

本研究最初欲解答 NarX-NarL 系統在克雷伯氏肺炎桿菌中是否也會參與在 inflammasome 活化的路徑中，然而結果為無明顯差異，所以我們進而探討它對抗生素的感受性以及對生物膜生成的影響，但也無顯著結果。接著，我們期望以 DNA 微陣列了解其可能調控的下游路徑，然而並沒找到相關目標。最後選擇進行巨噬細胞的吞噬作用的實驗，觀察細菌缺乏 *narX* 基因後對宿主細胞吞噬作用力的影響，此一系的實驗旨在瞭解 NarX-NarL 系統在克雷伯氏肺炎桿菌進行感染時的角色。



第二章、材料與方法

2.1 菌株 (Bacterial strain)

克雷伯氏肺炎桿菌NTUH-K2044為台灣大學醫學院附設醫院臨床分離株，屬於K1荚膜型，由患有肝膿瘍併發敗血症及轉移性腦膜炎的40歲病人之血液所分離[25]。克雷伯氏肺炎桿菌一般以LB培養液或固態培養基在37°C下繼代培養。

2.2 細胞株 (Cell line)

THP-1由患有急性單核球細胞白血病之患者所分離之人類單核球細胞株，培養於10%胎牛血清 (Fetal bovine serum; FBS) 之RPMI培養液 (HyClone RPMI 1640 Medium; SH30027) 及額外添加丙酮酸鈉 (sodium pyruvate solution, Biological Industries) 使其最終濃度為1mM，培養箱環境為5%二氧化碳，培養溫度為37°C，兩至三天進行繼代，細胞密度維持在 $10^5 \sim 1.5 \times 10^6$ cells/mL。進行細菌感染實驗前，THP-1細胞濃度調為 10^6 cells/mL、1mL/well於24-well plate中，以含50 ng/ml巴豆醇-12-十四烷酸酯-13-乙酸酯 (Phorbol 12-myristate 13-acetate; PMA) 的RPMI 培養液於37°C下培養48小時，促使其分化為macrophage-like cells。

2.3 建構 $\Delta narX$ 之基因剔除株 (Construction of deletion mutant $\Delta narX$)

利用無標記基因剔除 (unmarked deletion) 的方式，可以避免嵌入 selection marker 後對上下游基因表現之干擾，用來建構及確認突變株基因之引子皆列於(表一)。

首先，NTUH-K2044的基因*NarX*基因編碼區 (coding sequence; CDS) 兩邊各約1kb的側翼區 (flanking region) 會先利用引子*NarX_flanking_F*及*NarX_flanking_R*經由聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction; PCR) 將此片段放大，產物會先



subclone至pJET1.2/blunt (附錄二、Thermo Scientific ; #K1232) 載體上，再利用引子NarX_delete_Inv_F、NarX_delete_Inv_R，經由反向聚合酶連鎖反應(Inverse-PCR)，以去除NarX之CDS，再利用接合酶(ligase) circularize pJET1.2/blunt質體後，以引子NarX_flanking_F及NarX_flanking_R去PCR放大已subclone入pJET的約2kb之側翼區，作為後續同源重組之置換序列，並將其以平滑端接合(blunt-end ligation)的方式接入帶有卡那黴素(kanamycin)的質體pKO3-km上，命名為pKO3-narX-FR-km，請見(圖二)。

隨後將pKO3-narX-FR 以電穿孔(electroporation)以轉型(transform)至菌株NTUH-K2044，其電穿孔之條件為2500V、200 Ω 、50 μ F，在含有卡那黴素的LB培養基上，於30°C篩選有成功轉型之菌株，並利用pKO3為自殺載體的特性(圖三)，於43°C中培養使菌株進行同源重組(homologous recombination)，再運用帶有sacB的pKO3-km會與sucrose造成細胞毒性的原理，於含有5%蔗糖(sucrose)的LB培養基上進行負向篩選(counter-selection)，迫使第二輪同源重組，吐出pKO3質體的序列，再以NTUH_2044_F、NTUH_2044_R引子PCR篩選不含NarX基因編碼區之突變株後，進行三次single colony selection取得單一菌落，並委外進行DNA定序確認，以確認有成功建構無標記基因剔除突變株，並命名此菌株為 $\Delta narX$ 。

2.4 建構 $\Delta narX$ 之基因補回株 (Construction of $\Delta narX$ complementation strains)

為了確認在 $\Delta narX$ 觀察到和野生株不同的表型確實為失去NarX之功能所造成，因而建構由pCR®-Blunt II-TOPO® vector (附錄三、Thermo Scientific ; #K280002) 為骨幹(backbone)的TOPO以及TOPO-narX+L之質體並委外進行DNA定序確認，用以回補到 $\Delta narX$ 中，用來建構及確認補回株基因之引子皆列於(表一)。



以建構TOPO質體，將pCR®-Blunt II-TOPO® vector以*EcoRI* (New England BioLabs ; R0101S) 酵素切割後，利用接合酶進行circularization以形成不帶外加序列或基因之TOPO，再利用電穿孔製作 $\Delta narX::TOPO$ 和NTUH-K2044::*TOPO*，作為補回株實驗的控制組。

為建構TOPO-*narX+L*質體，先利用Berkeley Drosophila Genome Project網站預測出*narX*基因可能的promoter位置，共有兩個潛在的位置，為在*narX*基因編碼區前306bp內，以前306bp為首設計Comp_F之引子，和*narL*最後基因編碼區序列為尾設計引子，PCR出包含promoter、*narX*、*narL*基因之序列，利用接合酶和pCR®-Blunt II-TOPO® vector進行平滑端接合形成TOPO-*narX+L*，再利用電穿孔製作 $\Delta narX::TOPO-narX+L$ ，此後以 $\Delta narX:: narX+L$ 表示，作為 $\Delta narX$ 之基因補回株。

我們也有建構 $\Delta narX:: narX$ ，但實驗初步結果並無利用 $\Delta narX:: narX+L$ 明顯，推測 $\Delta narX$ 中*narL*表現量可能受到剔除緊鄰基因*narX*的影響，因此之後皆利用 $\Delta narX:: narX+L$ 進行後續實驗。

2.5 巨噬細胞感染 (Macrophage infection)

將當天培養至指數期(Exponential phase)之NTUH-K2044及 $\Delta NarX$ 以600nm 的波長測量吸光值 (Optical Density) 以計算菌量，再以不含胎牛血清之RPMI稀釋至所需濃度，依指定感染劑量 (Multiplicity of infection; MOI) MOI=1感染在24-well已分化之THP-1細胞，細胞密度為 10^6 cells/ml。同時將相同指定感染劑量之菌液在序列稀釋後，均勻塗在LB培養基上，於37°C、16小時培養後計算菌落數以確認實際感染菌數。

細胞進行感染前，會先以PBS清洗兩次已分化之THP-1，再加入1 mL以 RPMI培養液稀釋之NTUH-K2044或 $\Delta NarX$ 進行感染，THP-1細胞和克雷伯氏肺炎桿菌共



同培養於24-well感染4小時後，移除細胞上清液並置換為含有100 μ g/mL慶大黴素（Gibco Gentamicin）的RPMI培養液，於37°C下培養16小時。

2.6 酵素免疫吸附分析法（Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA）

克雷伯氏肺炎桿菌感染後之THP-1細胞於含100 μ g/mL慶大黴素的RPMI培養液培養16小時後，收集其細胞上清液，取50 μ l原倍或三十倍稀釋之樣本按照套件（kit）的流程進行酵素免疫分析法（Invitrogen Human IL-1 beta Uncoated ELISA; 88-7261），以450 nm的波長測量吸光值，而推知感染及非感染細胞所釋出之IL-1 β 濃度。

2.7 乳酸脫氫酶細胞毒性測試（LDH cytotoxicity assay）

取得上述受感染之THP-1 16小時後之細胞上清液50 μ l，依照套件步驟進行乳酸脫氫酶細胞毒性測試（CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega; G1780），以490 nm的波長測量吸光值來推算各實驗組之細胞死亡率，細胞死亡比率為各實驗組吸光值減去未受感染之THP-1吸光值，再除以加入裂解液（Lysis Solution, Promega; G1821）之細胞的吸光值。

2.8 生物膜形成測試（Biofilm assay）

將隔夜培養的菌液以LB broth調整至OD=0.02的早期log-phase，在均勻加入nunc 96-well plate中（Thermo Fisher; nunc 26339），在37°C下靜置培養5小時後，移除菌液，以去離子水浸泡洗去殘留之菌液，0.1% crystal violet染色，靜置20分鐘後，再以95% ethanol回溶，移置平底透明96-well，最後以吸光值A550nm測量生物膜的生成量。

2.9 藥物感受性測試（Antimicrobial susceptibility test）



依照 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 的標準，在適合做抗藥性測試的 Mueller-Hinton Agar 上，以抗生素紙錠擴散法或以瓊脂稀釋法測試細菌對藥物的感受性。抗生素紙錠擴散法中，將菌量調整至 McFarland = 0.5，以無菌棉棒在培養基上以三個方向均勻塗滿，將紙錠黏貼在培養基上，37°C 下靜置培養 18 小時後，計算抑制圈的半徑；瓊脂稀釋法中則依照藥物的濃度配置瓊脂中，再點上 10^4 CFU 的菌量，37°C 下靜置培養 18 小時後，依細菌停止生長的最小濃度認定為最小抑制濃度 (MIC)。

2.10 萃取克雷伯氏肺炎桿菌之 RNA (RNA extraction of *K. pneumoniae*)

將當天於指數成長期的克雷伯氏肺炎桿菌，離心沈澱後以細胞裂解液 (cell lysis buffer: 20mM sodium acetate、1mM EDTA、0.5% SDS (w/v)) 來打散回溶，隨後以 98°C 煮菌 10 分鐘後，放置至室溫，再依 RNA 萃取套件 (RNeasy mini kit, Qiagen; 74106) 指示進行 RNA 分離及純化，提供為微陣列分析中核酸探針的合成。

關於即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR; qPCR) 來測定荚膜多糖基因的轉錄活性，則是將當天於指數成長期的克雷伯氏肺炎桿菌塗至含有硝酸鹽的 minimal agar 上 (1.5% agar、0.1mM CaCl_2 、2mM MgSO_4 、0.2% glucose、1× M9 salt solution、18.7mM NaNO_3) 於厭氧操作台 (Whitley DG250) 培養 18 小時後，將培養基上之細菌收集，並同上述的方法抽取 RNA，作為反轉錄的模板。

2.11 DNA 微陣列分析 (DNA microarray)

2.11.1 DNA 微陣列 (Microarray membrane)

基因微陣列為先前實驗室已製備，大部分 DNA 片段是由 NTUH-K2044 全長染色體及質體經過物理受力 hydro-shearing 的方式所打碎而成，切割點為隨機且這



些片段介在 2 至 3kb 間，之後再接入載體；而部分片段則由酵素 *Sau3AI* 所切割成的 1 至 4kb 序列接進 pBK-CMVPhagemid 所得；其餘片段則將上述兩種片段和完整 NTUH-K2044 序列比對後，所遺漏的片段，此由運用自行設計的引子進行 PCR 所獲。集合上述三種資料庫，序列可概括 NTUH-K2044 基因體之 99.9%，再將這些片段利用 PCR 放大後，透過微陣列機器將 PCR 產物，打印在 nylon membrane 上。

2.11.2 核酸探針合成(Probe /cDNA preparation)

- 探針標記反應混合物 (Probe labeling reaction mixture)

Content	Quantity (μ l)	Product Source
total RNA (40 μ g)	45	由上述 2.8 所得
random primer (50 A ₂₆₀ units)	7.5	Roche; 11034731001
Total	52.5	

- 反轉錄 (Reverse transcription)

Content	Quantity (μ l)	Product Source
probe labeling reaction mixture	52.5	由上述所得
5 \times IV RT buffer	20	Invitrogen; 18090010
DTT (0.1M)	10	Invitrogen; D1532
dACGTP (25mM)	2.5	Invitrogen; 1818768, 1818769, 1852359
dTTP (2mM)	2.5	Invitrogen 1605633



25nmol, 1mM biotin-11-dUTP	6	柏森; PK-NEL539
RNase inhibitor (100mM)	1.5	Invitrogen; 10777019
Reverse transcriptase (200U/ μ l)	5	Invitrogen; 18090010
<hr/>		
Total	100	

首先，將上述的探針標記反應混合物於 70°C 加熱 3 分鐘，以避免二級結構的形成，再依上述反轉錄所需成份混合均勻於 25°C 放置 10 分鐘、42°C 90 分鐘、94°C 5 分鐘進行反應。

之後，於反轉錄產物中加入 6.9 μ l 3M 氫氧化鈉 (NaOH) 加熱至 50°C 反應 30 分鐘再加入 6.9 μ l 3M 醋酸 (CH₃COOH) 同樣加熱至 50°C 反應 30 分鐘，以去除殘留的 RNA。

為了沈澱反轉錄完的 DNA，將經過上述鹼和酸處理過的產物加入產物的 1/10 量的 3 M 乙酸鈉 (sodium acetate) 及最終濃度為 1 μ g/ μ l 的肝糖 (glycogen) 混合後，加入前面混合物的 2.5 倍量的 100% 乙醇混合均勻，放置於 -80°C，隔夜後，離心移除上清液，再利用 70% 乙醇打散、清洗隔夜沈澱的 DNA，離心後移除上清液，室溫晾乾 pellet，最後以去離子水回溶。

2.11.3 DNA 雜交 (DNA Hybridization)

- 雜交溶液 (Hybridization Solution)

Content	Quantity	Product Source
---------	----------	----------------



20 × saline-sodium citrate (SSC)	12.5 ml	VWR; 0804-2L
10% N-lauroylsarcosine	0.5 ml	SERVA; 27570
10% SDS	100 μl	Invitrogen; 15553
blocking powder	0.5 g	Roche; 11526800
ddH ₂ O	add up to 50 ml	
<hr/>		
Total	50 ml	

依上述而製的 hybridization solution 和 DNA array membrane 共同 incubate 於 63°C 2 個小時已進行 prehybridization。將準備完成的 probe DNA 於 100°C denature 5 分鐘後，加入 hybridization buffer 中，並與 DNA membrane 在 63°C 進行 18 小時之 hybridization。在呈色反應前，將 membrane 以 washing buffer-1(2×SSC、0.1% SDS) 共同於室溫搖晃 5 分鐘兩次，再用 washing buffer-2 (0.1×SSC、0.1% SDS) 於 63°C 搖晃清洗 membrane 15 分鐘 3 次。

2.11.4 DNA 微陣列之呈色 (DNA array colorimetric detection) 及結果分析

- 阻斷液配方 (blocking buffer) : 1×PBS (pH7.4) 、0.05% tween-20、0.5%酪蛋白 (casein ; Sigma) 上述混合均勻後，以 0.45μm 孔洞過濾混合物
- 牛血清白蛋白阻斷液 (bovine serum albumin; BSA buffer) : 1×PBS (pH7.4) 、0.05% tween-20、1% BSA (w/v)
- SA-AP 反應溶液



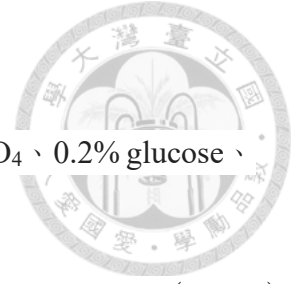
Content	Quantity	Product Source
BSA buffer	2.05 ml	由上述所得
blocking buffer	0.25 ml	由上述所得
50% PEG 8000	0.2 ml	Bioshop; PEG900
SA-AP (alkaline phosphatase-conjugated streptavidin)	2 μ l	Invitrogen; 434322
Total	2.502 ml	

將清洗後的 DNA membrane 以阻斷液 incubate 於室溫 1 小時，再將溶液置換為 SA-AP 反應溶液，於室溫反應 2 小時後，再以 PBST (1×PBS ; pH7.4 、 0.05% tween-20) 清洗 membrane 以去除不具特異性的結合，這步驟共洗 4 次，每次 5 分鐘。最終，以 1-Step NBT/BCIP Substrate Solution (PIERCE ; 34042) 與 membrane incubate 於 37°C 約 10 分鐘來呈色，觀察到藍黑色在 membrane 上形成後加入 stop solution (1×PBS 、 20mM EDTA) 。

Membrane 在掃描後，經過 ImageJ 分析呈色訊號後，可以藉軟體之積分功能將數字化後的顏色深淺程度乘上其面積，算出各點積分數，各數值再以 23S rRNA 為 internal control 來基準化 (normalization) 。

2.12 細菌生長測試 (Bacterial growth assay)

- 5×M9 salt solution : 1.846g of Na₂HPO₄ 、 1.5g of KH₂PO₄ 、 0.25g of NaCl ，加水至 100ml
- Minimal agar-NH₄Cl : 1.5% agar 、 0.1mM CaCl₂ 、 2mM MgSO₄ 、 0.2% glucose 、 1×M9 salt solution 、 18.7mM NH₄Cl



- Minimal agar- NaNO_3 : 1.5% agar、0.1mM CaCl_2 、2mM MgSO_4 、0.2% glucose、 $1\times\text{M9}$ salt solution、18.7mM NaNO_3

取在成長期之細菌 $\text{OD}=0.5$ 進行序列稀釋，已指定之 Colony forming unit (CFU) 點在對應 minimal agar 上，於厭氧操作台 (Whitley DG250) 或有氧 37°C 培養 18 小時，其中作為比較的野生株為 NTUH-K2044::TOPO，為補回空質體的菌株，以統一皆為帶有 multi-copy 質體、生長速率相似的菌株。

2.13 胞噬作用檢測 (Macrophage phagocytosis assay)

將當天培養至指數期 (Exponential phase) 之克雷伯氏肺炎桿菌稀釋成 10^7 CFU 的菌量，加入貼有已分化之 THP-1 細胞的 24-well 中，細胞密度為 10^6 cells/ml，離心 200g，五分鐘後，放置培養箱計時 15 分鐘，同時將相同指定感染菌量在序列稀釋後，均勻塗在 LB 培養基上，於 37°C 、16 小時培養後計算菌落數以確認實際感染菌數，15 分鐘後，以 PBS 清洗細胞兩次移除細胞上清液並置換為含有 $100\mu\text{g}/\text{mL}$ 慶大黴素 (Gibco Gentamicin) 的 RPMI 培養液，作用 30 分鐘後，以 RPMI 培養液在清洗一次，最終加入 0.1% Triton X-100 (Sigma ; X100)，震盪作用五分鐘後打起附著的細胞，混合均勻後移至 eppendorf 中，序列稀釋後，均勻塗在 LB 培養基上，於 37°C 、16 小時培養後計算菌落數以推知巨噬細胞已吞噬之菌量。

2.14 即時聚合酶連鎖反應 (Real-time quantitative PCR)

- 反轉錄 (Reverse transcription)

Content	Quantity (μl)	Product Source
RNA template (800ng)	1	由上述所得



5 × IV RT buffer	4	Invitrogen; 18090010
DTT (0.1M)	2	Invitrogen; D1532
random primer (50 A ₂₆₀ units)	2	Roche; 11034731001
dNTPs (100mM)	1	AB ; 362271
RNase inhibitor (100mM)	0.5	Invitrogen; 10777019
Reverse transcriptase (200U/μl)	1.5	Invitrogen; 18090010
ddH ₂ O	8	
<hr/>		
Total	20	

以上述方法萃取細菌 RNA 後，將上列反轉錄混合物於於 25°C 放置 10 分鐘、42°C 50 分鐘、85°C 5 分鐘、25°C 放置 5 分鐘進行反應，將產物稀釋至適當濃度和 SYBR dye(2×qPCRBIO SYGreen Blue Mix Lo-Rox)、引子(見表一)混合，於 BIO-RAD CFX Connect 788BR10234 機型測定基因之相對表現量，克雷伯氏肺炎桿菌 23S rRNA 之基因序列為內部控制組，cycle 數為 40 個。

2.15 莢膜多醣之定量 (Capsular polysaccharide qauntification)

- Dissolving solution : 1% zwittergent 3-14 in 100mM citric acid (pH2) 溶於水
- Meta-hydroxydiphenyl soluiton : 0.15% meta-hydroxydiphenyl in 0.5% NaOH 溶於水
- H₂SO₄ solution : 12.5mM sodium tetraborate in concentrated H₂SO₄
- D-glucoroninc acid standard solution : Desired amount of D-glucoroninc acid (Sigma ; G5269) 溶於水



此根據 Blumenkrantz 及 Asboe-Hansen 在 1973 年提出的方法 [26]，來測量莢膜多醣的總含量，首先將隔夜以 LB 有氧配養於 37°C 的克雷伯氏肺炎桿菌取出 10^9 CFU 的菌量並以 100 μ l 的 dissolving solution 混合加熱至 50°C，20 分鐘以溶解細菌表面的莢膜多醣，以 17000 \times g 離心 3 分鐘，取出 250 μ l 的上清液，並加入 1 ml 的 absolute ethanol 在 4°C 中放置 30 分鐘，離心 5 分鐘，移除上清液並風乾 pellet 後，以 200 μ l 的水回溶，同時準備七管不同 d-glucuronic acid 含量的 standard solution (0, 2.5, 5, 7.5, 10, 15, 20 μ g)。將回溶後的莢膜多醣及 standard solution，分別加入 1.2 ml 的濃硫酸溶液中，隔水煮沸 5 分鐘後放置室溫，加入 20 μ l meta-hydroxydiphenyl solution 後，在 5 分鐘內測量吸光值 A520nm，之後以 standard 推算 sample 莢膜多醣之含量。

2.16 統計分析 (Statistical analysis)

實驗結果利用單因子變異數分析 (One-way ANOVA)，除生物膜生成實驗數據以雙因子變異數分析 (Two-way ANOVA) 進行分析，分析後數據以平均值 \pm 標準差 (Means \pm SD) 呈現。



第三章、結果

3.1 基因序列對比 (BLAST)

由於先前結果透露過高表現量的分枝結核桿菌 *devR* 及 *devS* 的可能會抑制 NLRP3 inflammasome 活化，因此為瞭解是否克雷伯氏肺炎桿菌也有類似的蛋白參與此免疫路徑，我先進行初步基因序列的比對，利用 NCBI tblastn 以待查序列 (query) 為 *devS* 或 *devR* 搜尋目標序列 (subject) 為 NTUH-K2044 genome，找到各一筆結果，分別為與 *devS* 有 32% 和 *devR* 有 32% 相似度之兩個序列 (圖一)，再利用此兩個序列 blast 搜尋 NTUH-K2044 genome 發現各為 *narX* (*devS*) 及 *narL* (*devR*) 兩基因之片段。

3.2 $\Delta narX$ 基因剔除確認 ($\Delta narX$ confirmation)

為了瞭解 NarX 在克雷伯氏肺炎桿菌中的重要性，建構了以 NTUH-K2044 為模版剔除了 *narX* CDS 的菌株 $\Delta narX$ ，以確認是否有成功剔除目標基因，我用兩組引子進行 PCR 並跑膠驗證 (圖四)，結果顯示菌株 PCR 片段皆符合正確大小或預期結果，由此初步得知有正確剔除掉 *narX* 基因，爾後，將此菌株送定序確認。

3.3 $\Delta narX$ 活化發炎小體之情形 (Effect of $\Delta narX$ infection on inflammasome)

以探討 NarX 在克雷伯氏肺炎桿菌感染細胞時活化發炎小體的重要性，將兩種菌株經由先前乳酸脫氫酶測試感染時細胞毒性後，以 MOI=1 的菌量感染 THP-1 長達 4 小時，此為傷害細胞較小的條件，並以乳酸脫氫酶測試細胞存活率及以 ELISA 測量 IL-1 β 釋放量 (圖五)。

結果顯示，野生株或 $\Delta narX$ 對細胞造成的死亡率沒有明顯差異，cytotoxicity 皆在 30% 左右，而在受不管野生株還是 $\Delta narX$ 感染的 THP-1，IL-1 β 分泌量與未受感



染相比皆有顯著的提高升，顯示克雷伯氏肺炎桿菌感染巨噬細胞時的确會促發發炎小體的活化，然而，野生株或 $\Delta narX$ 感染對發炎小體活化的程度並沒有統計上的差異。

3.4 $\Delta narX$ 生物膜之生成 (Biofilm formation of $\Delta narX$)

因先前研究指出類鼻疽在有氧環境中添加 $NaNO_3$ ，能刺激NarX來抑制生物膜的形成[24]，本研究便將克雷伯氏肺炎桿菌於 $37^\circ C$ ，有氧環境下靜置培養5小時後，觀察野生及突變株 $\Delta narX$ 的生物膜生成量之差異。

結果顯示兩者的生物膜生成量在任一個 $NaNO_3$ 濃度下(0mM~ 100mM)，皆無明顯差異，見圖(六)。

3.5 藥物感受性測試 (Antimicrobial susceptibility test)

依照 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 的標準，以抗生素紙錠擴散法或以瓊脂稀釋法測試 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 對藥物的感受性，結果見(圖七)，(A)圖之抗生素紙錠擴散法顯示 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 沒有明顯對下列八種藥物有感受性的差異，包括 bacitracin、imipenem、ertapenem、vancomycin、piperacillin、trimethoprim、ceftazidime 和 aztreonam，(B)表之瓊脂稀釋法結果也顯示，突變和野生菌株間沒有對 Gentamicin、Chloramphenicol 和 Ampicillin 有顯著感受性的差異，最小抑菌濃度皆在兩倍差異內。

3.6 基因微陣列分析 (DNA microarray)

為了更加瞭解 NarX 在克雷伯氏肺炎桿菌的功能及其能調控的相關傳導路徑，我們以基因微陣列方式分析 NTUH-K2044 genome 在剔除較為上游的 TCS 中 sensor



narX 後，整個 mRNA expression profile 的改變，來發掘潛在且未知的受調控的相關基因。基因微陣列操作流程請見(圖八)，結果見(圖九)，詳細基因分析請見(表二)。

其中，將 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 在成長期時所表現的 total RNA 萃取出，再反轉錄為 biotin 所標記的 cDNA probe，和微陣列膜反應後，以 ImageJ 量化呈色的深淺，並相互比較剔除 *narX* 後有明顯差異的 clone 序列，因為整體 RNA 表現量的變化不大，因此以該 clone 之 RNA 表現量在 $\Delta narX$ 相對 NTUH-K2044 為 >1.057 倍作為篩選條件，可以找出 4 個訊號明顯上升的點(dot)，另一方向則以 RNA 表現量在 $\Delta narX$ 相對 NTUH-K2044 ≤ 0.83 作為篩選標準，有 5 個個訊號明顯下降的點。

4 個訊號明顯上升的序列中，其包括了點一：resolvase，但對此蛋白的相關資訊並不多；點二：*trxA* 為 thioredoxin 1 的基因，在細菌中維持細胞氧化還原電位之蛋白，*rho* 則為一 transcription-termination factor、*rfe* 為 Undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase，參與合成 ECA(enterobacterial common antigen)；點三：*nuoN* 為 NADH dehydrogenase I chain N、*nuoM* 則為 NADH dehydrogenase I chain M；點四：KdpD-KdpE 為一 TCS，可藉由感受胞內鉀離子及 ATP 濃度而調控鉀離子通道蛋白的表現 [27]。

5 個訊號明顯下降的序列中，包括了點一：*nirB*，nitrite reductase，large subunit；點二：*narG* 為 nitrate reductase 1，alpha subunit；點三：*nirD*，為另一個 nitrite reductase subunit、*cysG* 為 siroheme synthase，可以製造 nitrite reductase 所需的 cofactor；點四：*narJ* 為 nitrate reductase 1，delta subunit、*narH*，nitrate reductase 1 beta chain；點五：*pfkA*，6-phosphofructokinase isozyme I，為催化 glycolysis 步驟的酶、*menG* 及 *menA* 則為合成維生素 K2 所需的蛋白 [28]。



3.7 NTUH-K2044 和 $\Delta narX$ 補回株之回補確認 (**complementation strain confirmation**)

以確認是否有成功補回目標基因，我用兩組引子進行 PCR 並跑膠驗證 (圖十)，一組驗證細菌本身 genome 有無剔除 *narX*，另一組確認是否有成功電入 TOPO 或 TOPO-*narX*+L 質體，結果顯示菌株 PCR 片段皆符合正確大小或預期結果，由此初步得知有正確剔除掉 *narX* 基因，爾後，將此菌株送定序確認。

3.7 $\Delta narX$ 的生長情形 (**Growth of $\Delta narX$**)

為了更加瞭解 NarX 的生物功能，以營養組成較單一的 minimal agar 在有氧及厭氧環境下培養相同菌量的 NTUH-K2044::TOPO、 $\Delta narX$::TOPO 和 $\Delta narX$::*narX*+L，同時將 minimal agar 原本唯一氮源 NH_4Cl 置換為不同濃度的 $NaNO_3$ 作為 NarX 感應的 substrate，隔夜培養，並觀察細菌在環境及營養來源不同時的生長情形 (圖十一)。

結果顯示一般有氧環境下，野生株及 $\Delta narX$ 的生長在有無 $NaNO_3$ 培養基上皆沒明顯差異，而在厭氧環境下，在正常 minimal agar (NH_4Cl) 上，比較補回 TOPO 質體的菌株，野生株在菌量為 10^6 CFU 時就停止了生長，但 $\Delta narX$ 稀釋至到菌量約為 10^3 才停止生長，差了將近 3 個 log 值， $\Delta narX$::*narX*+L 和 $\Delta narX$::TOPO 相比也生長得較差，在 10^4 就沒有菌落的形成，然而將 NH_4Cl 換成同濃度的 $NaNO_3$ 後，NTUH-K2044::TOPO 和 $\Delta narX$::*narX*+L 兩者生長都有回復的現象，生長情況似 $\Delta narX$::TOPO，顯示 *narX* 在厭氧環境下，利用硝酸鹽幫助生長的情形。

3.8 對胞噬作用的影響 (**Effect on phagocytosis**)

為了理解 *narX* 是否會影響克雷伯氏肺炎桿菌對抗胞噬作用的能力，我們將 THP-1 macrophage 和菌株共同培養短時間 15 分鐘，來計數各菌株遭吞噬的數量，



$\Delta magA$ 則為剔除莢膜多醣之菌株，已知相比野生菌株更顯著容易受到巨噬細胞的吞噬 [25]，見圖 (十二)，結果顯示 macrophage 分別能吞噬共同培養菌量約 2.6% 的 NTUH-K2044 野生株；約 0.23% 的 $\Delta narX$ 菌株；和約 25.7% 的 $\Delta magA$ ，細胞吞入 $\Delta magA$ 菌量和預期相同比野生株約近 10 倍，野生株則比 $\Delta narX$ 有至少多 10 倍。

3.9 莢膜多醣的生成改變 (Capsular polysaccharide production change)

接續胞噬作用的實驗結果，我們想瞭解 $\Delta narX$ 的莢膜多醣生成量是否會有差異因此去測量菌株的 total 莢膜生產量。在萃取及硫酸法測量 total CPS 量後，見圖 (十三)， $\Delta narX$ 明顯比野生株產生較多 CPS。

接著，利用之後建構好的基因補回菌株，測量其莢膜 mRNA 表現量，觀察 *narX* 和莢膜生成的關係。NTUH-K2044 的莢膜是由三種醣分子組成的重複單位，包含 D-glucuronic acid、L-fucose 和 D-glucose [29]，基因層面上則是由 Capsule synthesis locus (K-locus) 負責，從本實驗室先前依萍的博士論文中利用 qPCR 檢測莢膜基因群上轉錄活性，證明 K-locus 上主要有兩個轉錄的單位 [30]，見圖 (十四) (A)，從兩個區間挑出各三個構成 CPS 合成醣單位所需的基因，做為轉錄活性的測量，其中 *galF* 為可催化 α -D-glucose 1-phosphate 成 UDP-glucose 的 UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase；*wcaG* 則為將 GDP-mannose 轉化成下游產物 GDP-fucose 的 GDP-L-fucose synthase；*manB* 為也參與在生產 GDP-fucose 的 phosphomannomutase。qPCR 偵測結果顯示見圖 (十四) (B)，在有效剔除 *narX* 基因後，*galF*、*wcaG*、*manB* 在 $\Delta narX$ 的表現量分別上升 13、3.97、4.2 倍，顯示在莢膜的生產在突變株內更加活躍，呼應了硫酸法測量 CPS 的結果，而在回補 *narX+L* 後和只補回 TOPO 的 $\Delta narX::TOPO$ 相比，*galF*、*wcaG*、*manB* 分別回補 4.39、

12.73、6.77 倍 ($\Delta narX::TOPO / \Delta narX::narX+L$) , *galF* 有部分的表現量回補的情形，而 *wcaG* 和 *manB* 則回補幅度較原本大。





第四章、討論

本研究最初是由分枝結核桿菌 *devR*、*devS* 兩基因在克雷伯氏肺炎桿菌 NTUH-K2044 上，所對應到有一定序列相似度的基因：*narX*、*narL*。在分枝結核桿菌中，DevS 能夠感受環境中氧氣濃度，而 DevR 的缺失會影響分枝結核桿菌在潛伏期 (dormancy) 的生存，並造成細菌無法長期感染宿主 [31]，然而，NarX-NarL 雖同為雙方子調控系統，但偵測的是環境中硝酸根離子的濃度，並且根據感染巨噬細胞的實驗結果，NarX 的缺失對於 inflammasome 的活化並沒有顯著差異因此不繼續探討 NLRP3 的參與度，此與先前 over-expression 的 *devR*、*devS* 會抑制 NLRP3 活化的現象有所不同。

之後，參考相關資料後修改細胞感染實驗的條件，見附錄四，我們為了去除 PMA 可能造成的背景訊號，在分化 THP-1 細胞兩天後置換為無添加 PMA 的細胞培養液隔夜培養，第三天才進行感染，一樣是用 MOI=1 的菌量但感染 1 小時後，置換為含有 200 $\mu\text{g/ml}$ gentamicin 的培養液後在 1 小時後換為無添加抗生素的細胞培養液，當天 4 小時後收集上清液後進行乳酸脫氫酶細胞毒性和 IL-1 β 的含量測試。

結果則和當初有明顯不同，發現 $\Delta narX$ 相比野生株造成細胞多約 20% 的死亡率和高約 1000 pg/ml 的 IL-1 β 釋放濃度，但因為細胞存活率的不同，難以判斷 IL-1 β 釋放濃度的不同是否全由發炎小體活化不同所造成，也不能認定細胞死亡是由發炎小體的細胞焦亡所引起，需要進一步使用 NLRP3 缺失之細胞株或能抑制 NLRP3 活化之抑制劑和 shRNA、siRNA 才能確認和 NLRP3 的相關性。此外，因為收集上清液的時間不同會影響測量的結果，此實驗宜增加測試不同時間點的測量結果。



除了時間點不同的條件外，宜同碩士生鐘碩恩學長利用過度表現 *devR*、*devS* 菌株的方式，建構 NTUH-K2044 過度表現 *narX*、*narL* 感染 THP-1 巨噬細胞，觀察相同條件下過度表現 *narX-narL* 系統對細胞的影響，以對照學長的結果。

基因微陣列結果在剔除較為上游的基因 *narX* 後，對整體 RNA 表現量上其實沒有預期上的差異，上升幅度最大也只有 1.078 倍，下降則是 0.71 倍，有些差異較多的基因為 hypothetical protein 或 putative protein，未受到深入的研究，而其他表現顯著上升的基因 (*trxA*、*rho*、*rfe*、*nuoN*、*nuoM*)，雖大多和細菌的電子傳遞、呼吸作用有關，但沒太多研究證明他們與造成細菌致病力直接的關係，反而較特別的為剔除 *narX* 會影響另一雙方子調控系統 KdpD-KdpE 的表現，也有研究顯示 *kdpD-kdpE* 對於細菌在宿主細胞內生存為重要的角色 [27]，但是 *narX* 和 *kdpD-kdpE* 的關係尚未清楚。另外，我們也觀察到與 nitrate reductase 合成的相關基因表現量有明顯的下降 (*narG*、*narH*、*narJ*、*cysG*)，再次證明 *narX* 為可以調控下游 nitrate reductase *narGHJI* operon 的表現。

基因微陣列量化後差異介在 0.7 倍至 1.1 倍內，差距甚小，2006 年文獻中，Tim W. Overton 的團隊利用螢光標記 cDNA 的方式雜交晶片上，觀察 *E.coli* 中，在有硝酸鹽的刺激下 $\Delta narX+narL$ 和野生株的整體 RNA 轉錄活性差異，其中 *narG* 在 $\Delta narX+narL$ 中表現量為野生株的 0.03 倍，相比我們在 $\Delta narX$ 中 *narG* 只有中野生株的 0.77 倍；表現量上升的基因，*E.coli* 中的 *frdA* (fumarate reductase flavoprotein subunit) 上升了 29 倍，相比我們數據最大差異不到一成。

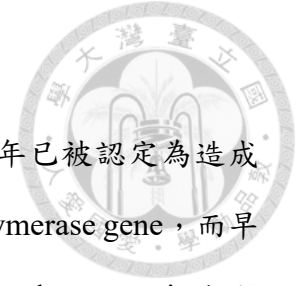
本實驗室有進行過本篇操作基因微陣列量之方法，肉眼可觀察到的差異通常會有明顯數據差異，在此探討本研究關於為何基因微陣列的數據不理想，主要可能有兩種原因，見附錄五，一為過度呈色，也就是在加入 1-Step NBT/BCIP Substrate Solution 後呈色時間不理想，導致點的顏色過深無法反映出真正的訊號差異；二為



點的形狀應為圓形，但實則機器打出的點並非每張膜都一樣，由附錄五圖可看到，右邊 23s 點非圓形但在左邊卻是圓形，這兩點在軟體分析時皆會有量化上的差異，且作為的內控制組的 23s 訊號如稍微偏差，會影響整體基因表現數據。

細菌生長的方面，我們發現在厭氧環境 NH_4Cl 培養基上，NTUH-K2044 生長會受到抑制， $\Delta narX$ 反而長得較好，而含有硝酸鹽的培養基上，NTUH-K2044 相比 $\Delta narX$ ，明顯受到硝酸根的刺激，有菌落數量上的回復， $\Delta narX$ 則生長上似乎不受硝酸根所影響，顯示添加硝酸根能幫助細菌生長，此可能是經由先前提到下游 *narGHJI* operon 受活化來代謝硝酸根進行硝酸鹽呼吸作用，以產生生長所需之能量，這種現象或許能夠解釋細菌為了在缺氧且釋放 nitrate 的巨噬細胞中生存，利用 NarX-NarL 這個傳感系統來適應此環境，並提供在生長時應對環境變化的優勢 [32] [33]。

然而在單純以 NH_4Cl 作為氮源的情況下，野生株生長明顯受到干擾，顯示 *narX* 的存在會影響生長相關途徑，其中 *narX* 的剔除可能造成另一基因的補償作用，此基因上調後也促進細菌的生長，但此尚未有相關實驗支持；另一種解釋，則是在沒有添加硝酸鹽、二甲基亞砷、氧化三甲胺或 fumarate 作為厭氧呼吸原料的 NH_4Cl 培養基上，細菌會退而求其次，進行發酵作用來產能，發酵過程亦會產生 fumarate 供給細菌進行呼吸作用，以維持細菌的生存，而對於 *narX*、*narL* 完好的野生株，其 *narX* 和 *narL* 就如其他雙分子調控系統的基因，不受刺激的狀況下還是會表現一定的基礎生成量 [34]，來偵測外界環境變化，NarL 可能在沒有添加硝酸鹽的情況下，也有少量磷酸化的 NarL [35]，會抑制 fumarate reductase 或 *dcuB* (dicarboxylate uptake B) 基因的表現 [36]，干涉細菌利用 fumarate 產生能量以及影響 DcuB 在發酵作用中的物質運輸功能，進而造成生長上的劣勢，而後來硝酸鹽的添加使得細菌能有效率進行呼吸作用產生 ATP，回復野生菌生長情形。



在胞噬實驗中 $\Delta magA$ 扮演已知控制組的菌株，在 2006 年已被認定為造成 NTUH-K2044 致病力和組成 K1 CPS 的重要基因[37]，為一 polymerase gene，而早在 2004 年的論文中，科學家已知 $\Delta magA$ 對於 mouse macrophage phagocytosis 和野生株比起更容易遭吞噬[25]，因此從本篇實驗結果推測，*narX* 的剔除也是藉由提升 CPS 的生成量來增加對 phagocytosis 的抵抗力。

在 qPCR 三個莢膜基因表現量中，兩菌株間表現量的差異在皆至少有 3.9 倍以上，然而利用濃硫酸測定法去測量莢膜生成量卻只有不到 1.5 倍，在此強調 qPCR RNA 來源的細菌是在經過硝酸鹽的刺激下培養的，而濃硫酸測定法的細菌則是利用沒添加硝酸鹽的 LB 所培養的，因此條件上不同，再者，濃硫酸測定法會有 LPS 的干擾，因為莢膜構造中含有 LPS，而無法有效分離兩者，所以測到的莢膜量並非準確的。

關於 NarX-NarL 系統在分子上的機制，已知先前研究指出在厭氧環境下，活化的 FNR 蛋白會和 NarL 一起結合在某些 operon 的 promoter 上，共同調控活化或抑制下游基因表現，像是組成 nitrite reductase 的 *nirB* (Nitrite reductase (NADH) large subunit) 基因、構成 Formate dehydrogenase-O, major subunit 的 *fdnG*、製造 Fumarate reductase flavoprotein subunit 的 *frdA* 以及 DMSO reductase (dimethyl sulfoxide reductase, anaerobic, subunit A)，這些基因皆曾被報導指出會受到 FNR 及 NarL 的雙重調控[38]。另外，先前研究指出在厭氧環境下，在克雷伯氏肺炎桿菌菌株 CG43S3 中，活化的 FNR 蛋白會透過 *rmpA* (regulator of mucoid phenotype A) 來間接抑制 CPS 的表現量[39]，作為一個負向調控因子。綜合上述，我們猜測 NarL 可能也會和 FNR 一同參與控制基因 *rmpA* 的表現，進而影響 CPS 的生成量，但 NarL 和 *rmpA* 蛋白的關聯性需要更多實驗來證明。



CPS 為眾所皆知的主要致病因子之一，CPS 的缺失會讓克雷伯氏肺炎桿菌無法在人類血清中存活，而失去造成小鼠肺炎及其他致病的能力[25, 40]，另一方面，也有研究指出厚厚的莢膜會影響克雷伯氏肺炎桿菌其他構造的功能，像是會干擾線毛的活動而抑制生物膜的型成[41]，或是阻礙細菌黏附及侵入上皮細胞[42]，所以在對應不同的環境壓力時，適時控制 CPS 的表現就顯得相當重要，而 CPS 的降低，並不一定代表會減弱細菌在當下環境的生存能力。

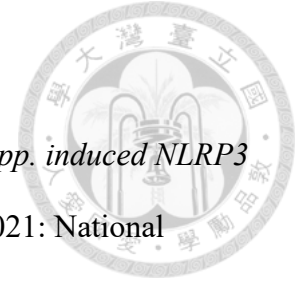


參考文獻

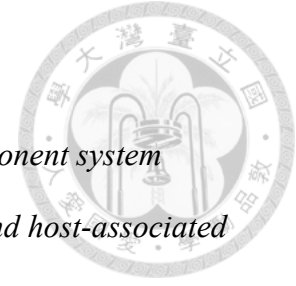
1. Ashayeri-Panah, M., M.M. Feizabadi, and F. Eftekhari, *Correlation of Multi-drug Resistance, Integron and blaESBL Gene Carriage With Genetic Fingerprints of Extended-Spectrum beta-Lactamase Producing Klebsiella pneumoniae*. Jundishapur J Microbiol, 2014. **7**(2): p. e8747.
2. Wang, J.H., et al., *Primary liver abscess due to Klebsiella pneumoniae in Taiwan*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(6): p. 1434-8.
3. 台灣醫院感染管制與抗藥性監測管理系統(THAS 系統)2021 年第 3 季監視報告. 2021, 衛生福利部疾病管制署.
4. Mohd Asri, N.A., et al., *Global Prevalence of Nosocomial Multidrug-Resistant Klebsiella pneumoniae: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Antibiotics (Basel), 2021. **10**(12).
5. Sahly, H., et al., *Activity of human beta-defensins 2 and 3 against ESBL-producing Klebsiella strains*. J Antimicrob Chemother, 2006. **57**(3): p. 562-5.
6. Clements, A., et al., *Secondary acylation of Klebsiella pneumoniae lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides*. J Biol Chem, 2007. **282**(21): p. 15569-77.
7. Alberti, S., et al., *Analysis of complement C3 deposition and degradation on Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun, 1996. **64**(11): p. 4726-32.
8. Alberti, S., et al., *Clq binding and activation of the complement classical pathway by Klebsiella pneumoniae outer membrane proteins*. Infect Immun, 1993. **61**(3): p. 852-60.



9. Paczosa, M.K. and J. Mecsas, *Klebsiella pneumoniae: Going on the Offense with a Strong Defense*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016. **80**(3): p. 629-61.
10. Martinon, F., K. Burns, and J. Tschopp, *The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta*. *Mol Cell*, 2002. **10**(2): p. 417-26.
11. Zheng, D., T. Liwinski, and E. Elinav, *Inflammasome activation and regulation: toward a better understanding of complex mechanisms*. *Cell Discov*, 2020. **6**: p. 36.
12. Swanson, K.V., M. Deng, and J.P. Ting, *The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics*. *Nat Rev Immunol*, 2019. **19**(8): p. 477-89.
13. Kinoshita, T., et al., *NLRP3 mediates NF-kappaB activation and cytokine induction in microbially induced and sterile inflammation*. *PLoS One*, 2015. **10**(3): p. e0119179.
14. Hua, K.F., et al., *Capsular polysaccharide is involved in NLRP3 inflammasome activation by Klebsiella pneumoniae serotype K1*. *Infect Immun*, 2015. **83**(9): p. 3396-409.
15. Cai, S., et al., *NLRC4 inflammasome-mediated production of IL-1beta modulates mucosal immunity in the lung against gram-negative bacterial infection*. *J Immunol*, 2012. **188**(11): p. 5623-35.
16. Wang, J., et al., *Caspase-11 deficiency impairs neutrophil recruitment and bacterial clearance in the early stage of pulmonary Klebsiella pneumoniae infection*. *Int J Med Microbiol*, 2017. **307**(8): p. 490-6.



17. Chung, S.-E., *Bacterial factors involved in Mycobacterium spp. induced NLRP3 inflammasome activation*, in *Department of microbiology*. 2021: National Taiwan University.
18. Barrett, J.F. and J.A. Hoch, *Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998. **42**(7): p. 1529-36.
19. Moreno-Vivian, C., et al., *Prokaryotic nitrate reduction: molecular properties and functional distinction among bacterial nitrate reductases*. *J Bacteriol*, 1999. **181**(21): p. 6573-84.
20. Katsir, G., et al., *The Escherichia coli NarL receiver domain regulates transcription through promoter specific functions*. *BMC Microbiol*, 2015. **15**: p. 174.
21. Spiro, S. and J.R. Guest, *FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, 1990. **6**(4): p. 399-428.
22. Rabin, R.S. and V. Stewart, *Either of two functionally redundant sensor proteins, NarX and NarQ, is sufficient for nitrate regulation in Escherichia coli K-12*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(18): p. 8419-23.
23. Mangalea, M.R., B.A. Plumley, and B.R. Borlee, *Nitrate Sensing and Metabolism Inhibit Biofilm Formation in the Opportunistic Pathogen Burkholderia pseudomallei by Reducing the Intracellular Concentration of c-di-GMP*. *Front Microbiol*, 2017. **8**: p. 1353.



24. Mangalea, M.R. and B.R. Borlee, *The NarX-NarL two-component system regulates biofilm formation, natural product biosynthesis, and host-associated survival in Burkholderia pseudomallei*. Sci Rep, 2022. **12**(1): p. 203.
25. 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.
26. Blumenkrantz, N. and G. Asboe-Hansen, *New method for quantitative determination of uronic acids*. Anal Biochem, 1973. **54**(2): p. 484-9.
27. Freeman, Z.N., S. Dorus, and N.R. Waterfield, *The KdpD/KdpE two-component system: integrating K(+) homeostasis and virulence*. PLoS Pathog, 2013. **9**(3): p. e1003201.
28. Dhiman, R.K., et al., *Characterization of MenA (isoprenyl diphosphate:1,4-dihydroxy-2-naphthoate isoprenyltransferase) from Mycobacterium tuberculosis*. PLoS One, 2019. **14**(4): p. e0214958.
29. Ho, J.Y., et al., *Functions of some capsular polysaccharide biosynthetic genes in Klebsiella pneumoniae NTUH K-2044*. PLoS One, 2011. **6**(7): p. e21664.
30. 莊依萍, *The cps region responsible for capsular serotype K1 in klebsiella pneumonia causing human primary pyogenic liver abscess.*, in *Department of microbiology*. 2005: National Taiwan University.
31. Mehra, S., et al., *The DosR Regulon Modulates Adaptive Immunity and Is Essential for Mycobacterium tuberculosis Persistence*. Am J Respir Crit Care Med, 2015. **191**(10): p. 1185-96.



32. Tazzyman, S., et al., *Macrophage-mediated response to hypoxia in disease*. *Hypoxia* (Auckl), 2014. **2**: p. 185-96.
33. Stuehr, D.J. and M.A. Marletta, *Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1985. **82**(22): p. 7738-42.
34. Martin, B., et al., *Expression and maintenance of ComD-ComE, the two-component signal-transduction system that controls competence of Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*, 2010. **75**(6): p. 1513-28.
35. Ruanto, P., et al., *Activation by NarL at the Escherichia coli ogt promoter*. *Biochem J*, 2020. **477**(15): p. 2807-20.
36. Goh, E.B., et al., *Hierarchical control of anaerobic gene expression in Escherichia coli K-12: the nitrate-responsive NarX-NarL regulatory system represses synthesis of the fumarate-responsive DcuS-DcuR regulatory system*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(14): p. 4890-9.
37. Chuang, Y.P., et al., *Genetic determinants of capsular serotype K1 of Klebsiella pneumoniae causing primary pyogenic liver abscess*. *J Infect Dis*, 2006. **193**(5): p. 645-54.
38. Berg, B.L. and V. Stewart, *Structural genes for nitrate-inducible formate dehydrogenase in Escherichia coli K-12*. *Genetics*, 1990. **125**(4): p. 691-702.
39. Lin, T.H., et al., *FNR-Dependent RmpA and RmpA2 Regulation of Capsule Polysaccharide Biosynthesis in Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol*, 2019. **10**: p. 2436.



40. Cortes, G., et al., *Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a murine model of pneumonia*. *Infect Immun*, 2002. **70**(5): p. 2583-90.
41. Schembri, M.A., et al., *Capsule and fimbria interaction in Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 2005. **73**(8): p. 4626-33.
42. Sahly, H., et al., *Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 2000. **68**(12): p. 6744-9.



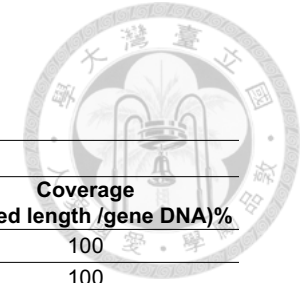
表一、本論文使用之引子

Primer	Sequence	Purpose
NarX_flanking_F	CTTTCGAAGCCGACAGGTCGTTC	$\Delta narX$ construct
NarX_flanking_R	GGTGGTGGAGTATCGTCAGCGC	
NarX_delete_Inv_F	GGAGACCCTCATGAGTCAACAGGAACG	$\Delta narX$ construct
NarX_delete_Inv_R	GGAATGCGTGGCTCCTGACCG	
NTUH_2044_F	GAGCAGAAGAACGAGATCCTCGC	$\Delta narX$ construct
NTUH_2044_R	GGCAGTAAAGGGAGCTGGTTCGTG	
NarX_CDS_F	GGCGAGTCCGTCCAGGAGAC	$\Delta narX$ construct
pKO3-R	CAGTTTTATTGTTTCATGATG	$\Delta narX$ construct
KmF-inverse	TCCCGTTGAATATGGCTCAT	
Comp_F	CCTCTGATTATTCATATTTCTGCCGC	$\Delta narX::narX+L$ construct
NarL_CDS_R	TTAGAAGATTCGCTCCTGGTG	
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	$\Delta narX$ complementation strain check
TOPO_R	CTTTATCTGACAGCAGACGTGCAC	
NarX_end_F	CCGAACGG GTAACCATTACG	qPCR
NarX_CDS_R	TTATTGGATGGAAAACGTTTTTCCGGG	
galF_F	GCCGGGATCAAAGAGATTGTT	qPCR
galF_R	AGGAGGTGTCTGAAGTGGTTTTTC	
wcaG_F	TTCCACTACCCCAAACAACGA	qPCR
wcaG_R	TGCGGCGCTTTCATGA	
manB_F	CGCTGCGGGTCACGAT	qPCR
manB_R	GCCGGGAGCGAAAATCA	



23s_rRNA_F	AGGCGATGAAGGACGTGCTA	qPCR
23s_rRNA_R	TTCGGACATCGCCGGTTATA	internal control

表二、基因微陣列表現量顯著改變之基因



Overexpression (fold change > 1.057)							
Dot	fold change	Length (bp)	ORFid	ORF Length (bp)	Gene Name	Product	Coverage (aligned length /gene DNA)%
1	1.078	2757	KPP279	560	none	resolvase	100
2	1.066	2634	KP0144	341	<i>trxA</i>	Thioredoxin 1	100
			KP0145	1331	<i>rho</i>	Transcription termination factor rho	100
			KP0146	1103	<i>rfe</i>	Undecaprenyl-phosphate alpha-N-acetylglucosaminyltransferase	35.17
3	1.066	2411	KP3908	1457	<i>nuoN</i>	NADH dehydrogenase I chain N	45.57
			KP3909	1529	<i>nuoM</i>	NADH dehydrogenase I chain M	100
4	1.058	2878	KP1666	677	<i>kdpE</i>	KDP operon transcriptional Regulatory protein kdpE	100
			KP1667	2687	<i>kdpD</i>	sensor for high-affinity potassium transport system	22.18
Downregulation (fold change ≤ 0.83)							
Dot	fold change	Length (bp)	ORFid	ORF Length (bp)	Gene Name	Product	Coverage (aligned length /gene DNA)%
1	0.71	2453	KP5082	2543	<i>nirB</i>	nitrite reductase, large subunit	96.4
2	0.77	2464	KP3325	3743	<i>narG</i>	nitrate reductase 1, alpha subunit	54.7
3	0.79	2661	KP5083	326	<i>nirD</i>	nitrite reductase subunit D	100
			KP5084	1373	<i>cysG</i>	siroheme synthase	52.1
4	0.82	2670	KP3323	710	<i>narJ</i>	nitrate reductase 1, delta subunit	81.4
			KP3324	1535	<i>narH</i>	respiratory nitrate reductase 1 beta chain	100
5	0.83	2597	KP0082	962	<i>ptkA</i>	6-phosphofructokinase isozyme I	100
			KP0084	485	<i>menG</i>	menaquinone biosynthesis protein	100
			KP0085	926	<i>menA</i>	1,4-dihydroxy-2-naphthoate octaprenyltransferase	87.5



(A)

NCBI tBLASTn

Query: DevS_Rv3132c (Mtb) 578 a.a
 Sbjct: whole genome seq_NTUH_K2044 (K. p)

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044 DNA, complete genome

Sequence ID: [AP006725.1](#) Length: 5248520 Number of Matches: 1

Range 1: 3157794 to 3158357 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
68.9 bits(167)	1e-12	Compositional matrix adjust.	62/195(32%)	100/195(51%)	20/195(10%)	+3
Query 375		QRRMRELDVLTDRDRIARDLHDHVIQRLFV-----GLALQG-AVPHERNPE				
Sbjct 3157794		Q + ++L V+ +R IAR+LHD + Q L + L +QG A+P E				
Query 429		VDDLQDVIOEIRT--TIYDLHGASQGITRLRQRIDAAVAQF-ADSGRLTSVQ				
Sbjct 3157962		++L ++R T + L G LR ++A+ ++ A G +				
Query 486		DSALADQAEAVVREAVSNAVRHAKASTLTVRV-KVDDDLCEVTDNDRGLPD				
Sbjct 3158133		S A + REA+SNA++HA A+ +TV V + D+ + + V DNGRG+PD				
Query 542		GLTNLRQRAEQAGGE 556				
Sbjct 3158313		GL +R RA+ G+ GLIIMRDRAQSLRGD 3158357				

(B)

NCBI tBLASTn

Query: DevR_Rv3133c (Mtb) 217 a.a
 Sbjct: whole genome seq_NTUH_K2044 (K. p)

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae NTUH-K2044 DNA, complete genome

Sequence ID: [AP006725.1](#) Length: 5248520 Number of Matches: 10

Range 1: 3158473 to 3159084 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps	Frame
84.7 bits(208)	9e-20	Compositional matrix adjust.	66/204(32%)	117/204(57%)	1/204(0%)	+1
Query 4		VFLVDDHEVVRRLVLDLGLADPELDVVGEGSVAEAMarvpaaarpdvavldv				
Sbjct 3158473		+ L+DDH ++R G+ L+ P++ V+GEA + A+ + + PD+ +LD+				
Query 64		ELCRDLLSRMPDLRCLILTSYTSDEAMLDAIAGASGYVVKDIKGMELARAV				
Sbjct 3158653		E L + R ++ + +E ++ A+ GA GY++KD++ +L +A+				
Query 124		lldnraaaaalmaklrgaaEKQD-PLSGLTDQERTLLGLLSEGLTNKQIADRM				
Sbjct 3158833		+L L A LR D +S LT +ER +L L+++GL NK IA R+				
Query 183		NYVSRLLA KLGMERRTQA AVFATE 206				
Sbjct 3159013		+V +L K+ ++ R +AAV+ + VHVKHMLKKMKLSRVEAAVWVHQ 3159084				

圖 一、以 NCBI blast NTUH-K2044 genome 序列之結果

(A) 結核桿菌H37Rv蛋白DevS於NTUH-K2044對比之最高相似氨基酸序列。

(B) 結核桿菌H37Rv蛋白DevR於NTUH-K2044對比之最高相似氨基酸序列。

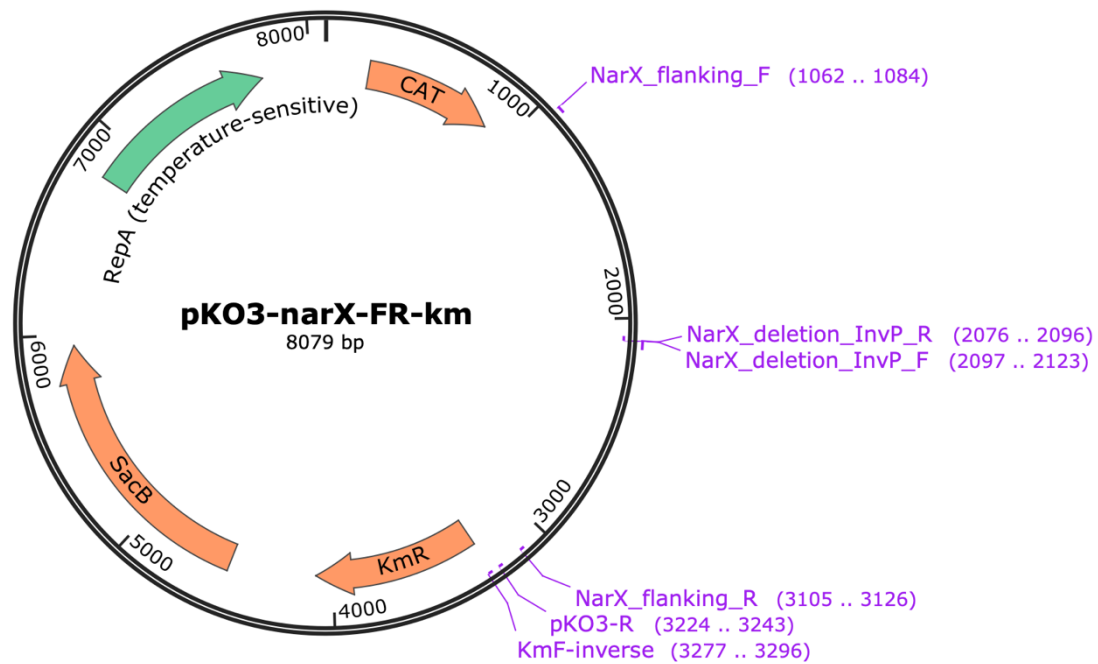
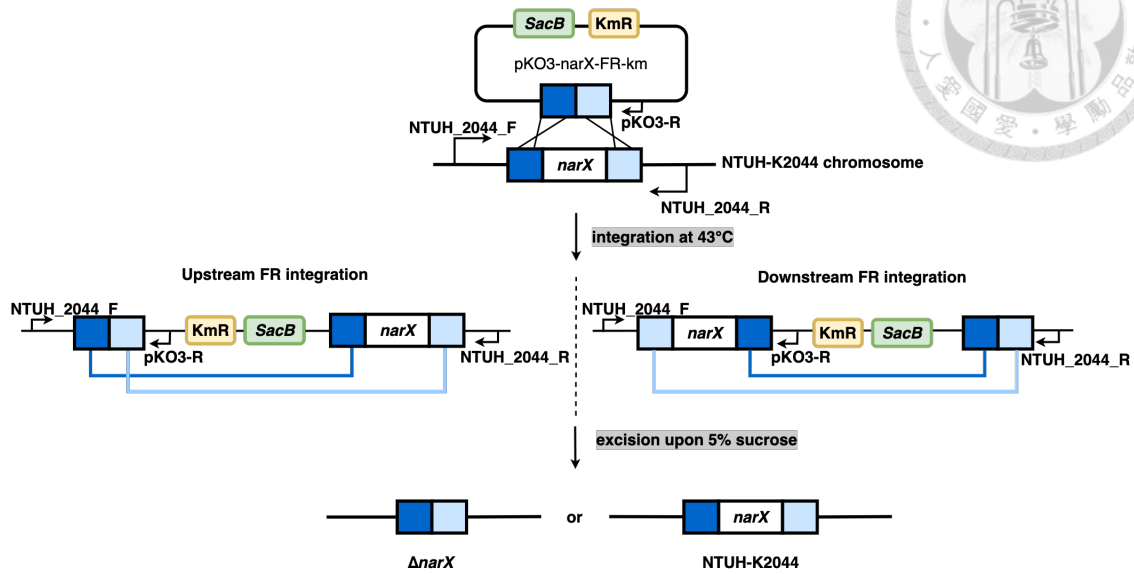


圖 二、pKO3-*narX*-FR-km

圖為建構完成後之integration vector pKO3-*narX*-FR-km，RepA為一temperature-sensitive replication origin；KmR表示kanamycin-resistant gene；SacB為左旋糖蔗糖酶 (levansucrase) 之基因，會和sucrose反應產生毒性，可作為逆向篩選的marker，建構質體所用之引子以紫色字體呈現。Map以snapgene軟體所繪。

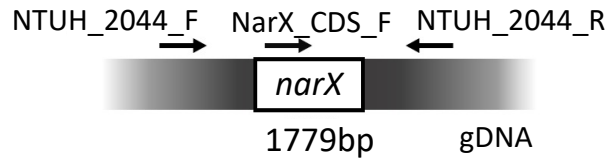


圖三、無標記基因剔除 (unmarked deletion) 流程圖

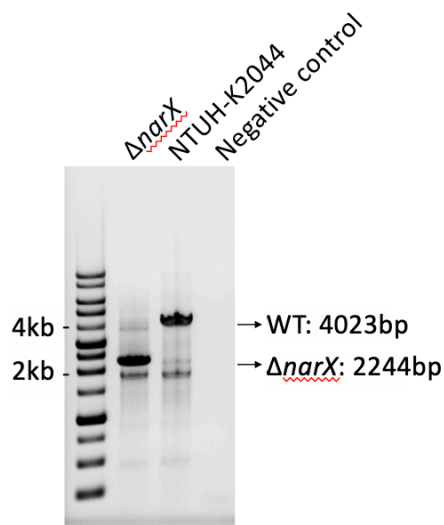
首先，將帶有 pKO3-narX-FR-km 的 NTUH-K2044 培養於 43°C，促使質體以上游或下游與 NTUH-K2044 同源側翼區進行第一次同源重組，形成兩種可能之重組情形，以引子 NTUH_2044_F 及 pKO3_R 進行 PCR 能確認同源重組的結果，再將成功重組的菌株劃在 5% sucrose LB 盤上進行負向篩選，培養於 30°C，經由第二次同源重組吐出含有 sacB 的 pKO3-km 序列，形成目標菌株 $\Delta narX$ 或變回 NTUH-K2044 wild-type，之後再以引子 PCR 進一步篩選出 $\Delta narX$ 。pKO3-narX-FR-km 上的 *narX* 上下游側翼區分別以深藍及淺藍表示，相關引子以箭頭表示，由 draw.io 所構圖。



(A)

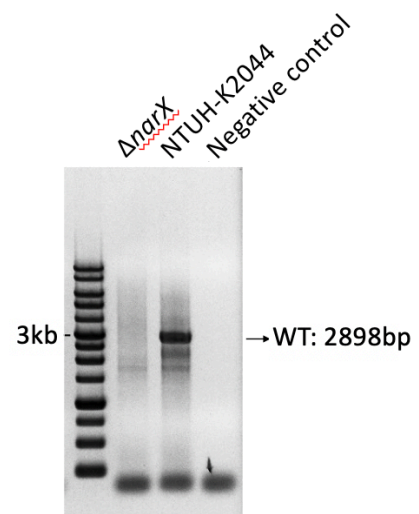


(B)



Primers: NTUH_2044_F + NTUH_2044_R

(C)

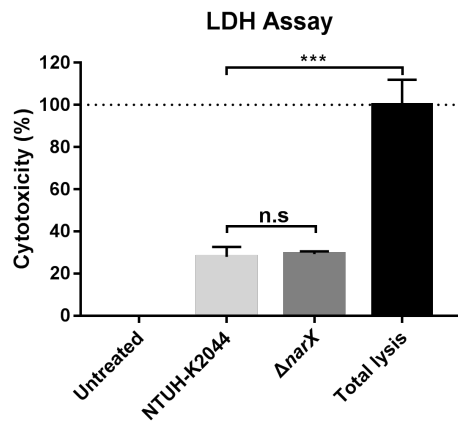


Primers: NarX_CDS_F + NTUH_2044_R

圖 四、NTUH-K2044 之突變株 $\Delta narX$ 基因剔除結果

(A) 圖為 NTUH-K2044 基因剔除後 $\Delta narX$ 菌株之基因示意圖和引子 NTUH_2044_F、NTUH_2044_R、NarX_CDS_F 所在之相對位置，圖中數字代表 $narX$ 之基因大小：1779bp。(B) 圖為以 NTUH_2044_F、NTUH_2044_R 所 PCR 之結果。(C) 圖為以 NarX_CDS_F、NTUH_2044_R 所 PCR 之結果。(Negative control 陰性對照組為二次去離子水，箭頭標示為預期產物大小。)

(A)



(B)

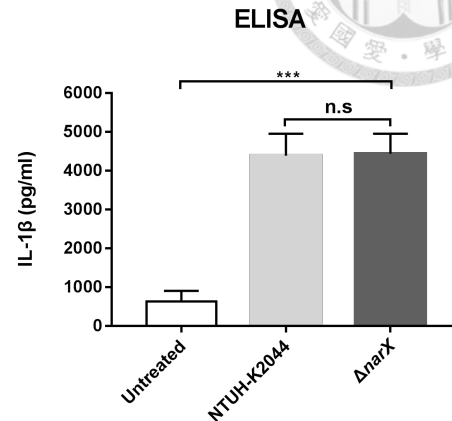


圖 五、 $\Delta narX$ 感染 THP-1 的細胞死亡率及 IL-1 β 分泌量

克雷伯氏肺炎桿菌突變株 $\Delta narX$ 及野生株 NTUH-K2044 以 MOI=1 感染 THP-1 細胞 4 小時後，更換培養液，並在 16 小時後，收集細胞上清液進行分析 (A) 為以乳酸脫氫酶測試細胞毒性之結果，untreated 為未受感染之細胞組，作為 control (0%)，total lysis 為加入細胞裂解液且未受感染之組別，代表全數細胞死亡所釋放之 LDH 的最大值 (100%)。(B) 為以 ELISA 測量細胞所釋放之 IL-1 β 分泌量。兩圖為兩次獨立實驗結果之平均，每個條件為三重複。分析後數據以平均值 \pm 標準差 (Means \pm SD) 呈現。誤差棒 (error bar) 代表標準偏差 SD，***表示 P value $<$ 0.001，n.s 表示差異不顯著，統計方法皆為單因子變異數分析 (One-way ANOVA)。

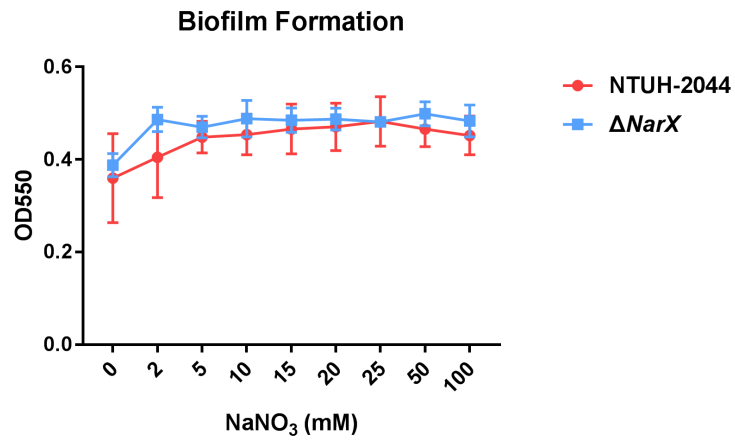
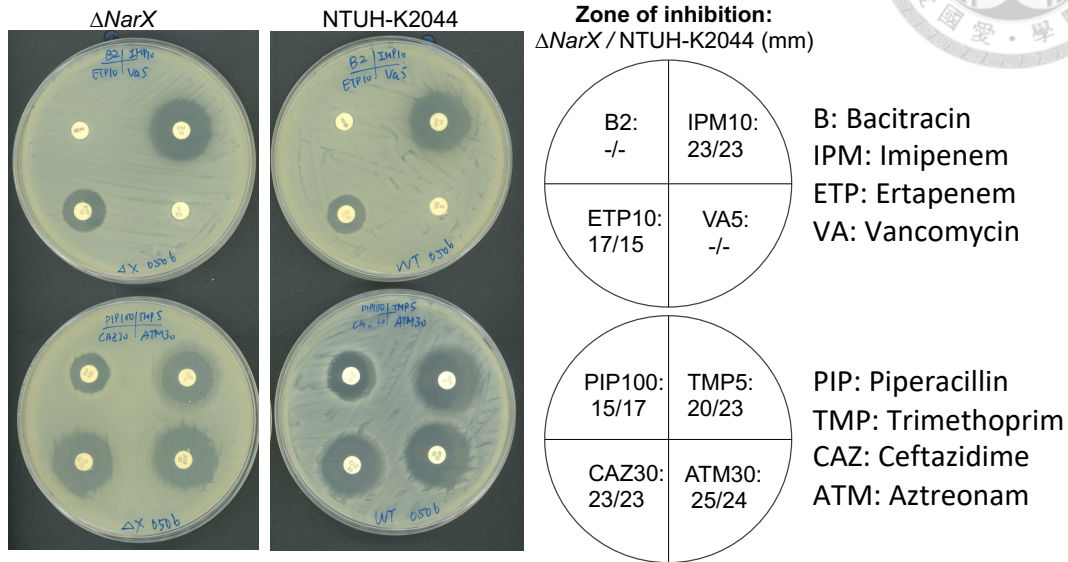


圖 六、生物膜之生成

圖為 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 在含有不同 NaNO_3 濃度 LB，於 37°C 下靜置培養 5 小時後生物膜形成的量。每個條件為三重複，分析後數據以平均值 \pm 標準差 (Means \pm SD) 呈現，誤差棒 (error bar) 代表標準偏差 SD，統計方法為雙因子變異數分析 (Two-way ANOVA)。



(A)



(B)

Strain	Gentamicin MIC (μg/ml)
WT	100
ΔNarX	100
Chloramphenicol MIC (mg/L)	
WT	25
ΔNarX	50
Ampicillin MIC (μg/ml)	
WT	200
ΔNarX	100

圖 七、藥物感受性測試

(A) 為利用抗生素紙錠擴散法測試 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 的藥物感受性，最右圖為各紙錠在培養基上位置示意圖，數值為抑制圈的半徑長度以毫米為單位，“/”左側 $\Delta narX$ ，“/”右側為 NTUH-K2044 的結果，“-”為無抑制圈形成。其中各紙錠藥物的全名及濃度為 B2: bacitracin 2 IU、IPM10: imipenem 10μg、ETP10: ertapenem 10μg、VA5: vancomycin 5 μg、PIP100: piperacillin 100μg、TMP5: trimethoprim 5μg、CAZ30: ceftazidime 30μg、ATM30: aztreonam 30μg。(B) 為利用瓊脂稀釋法測試 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 對藥物的最小抑菌濃度 (MIC)，此實驗重複兩次，圖為其中一次。

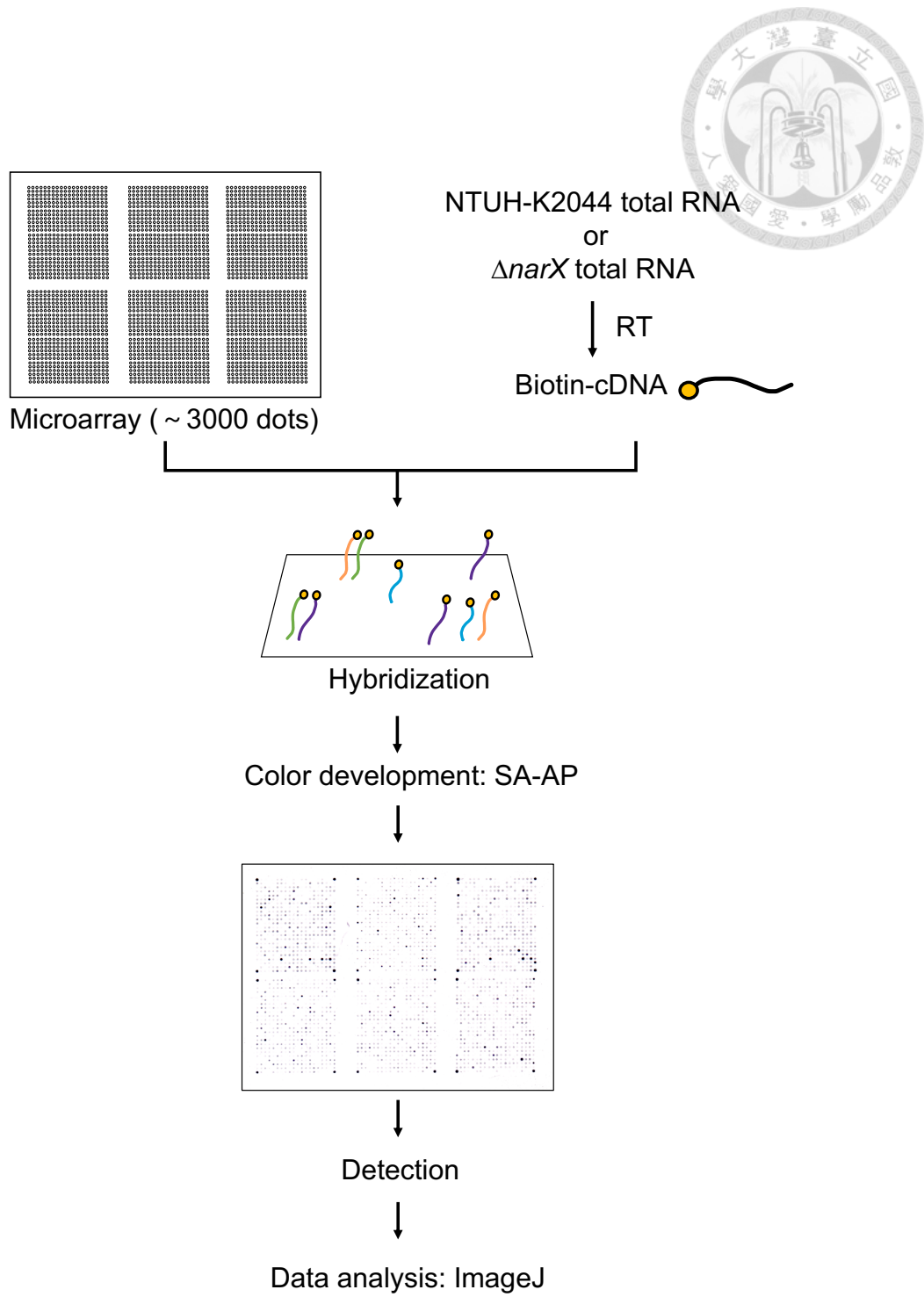


圖 八、基因微陣列分析 NTUH-K2044 及 $\Delta narX$ 中 RNA 之表現量流程圖

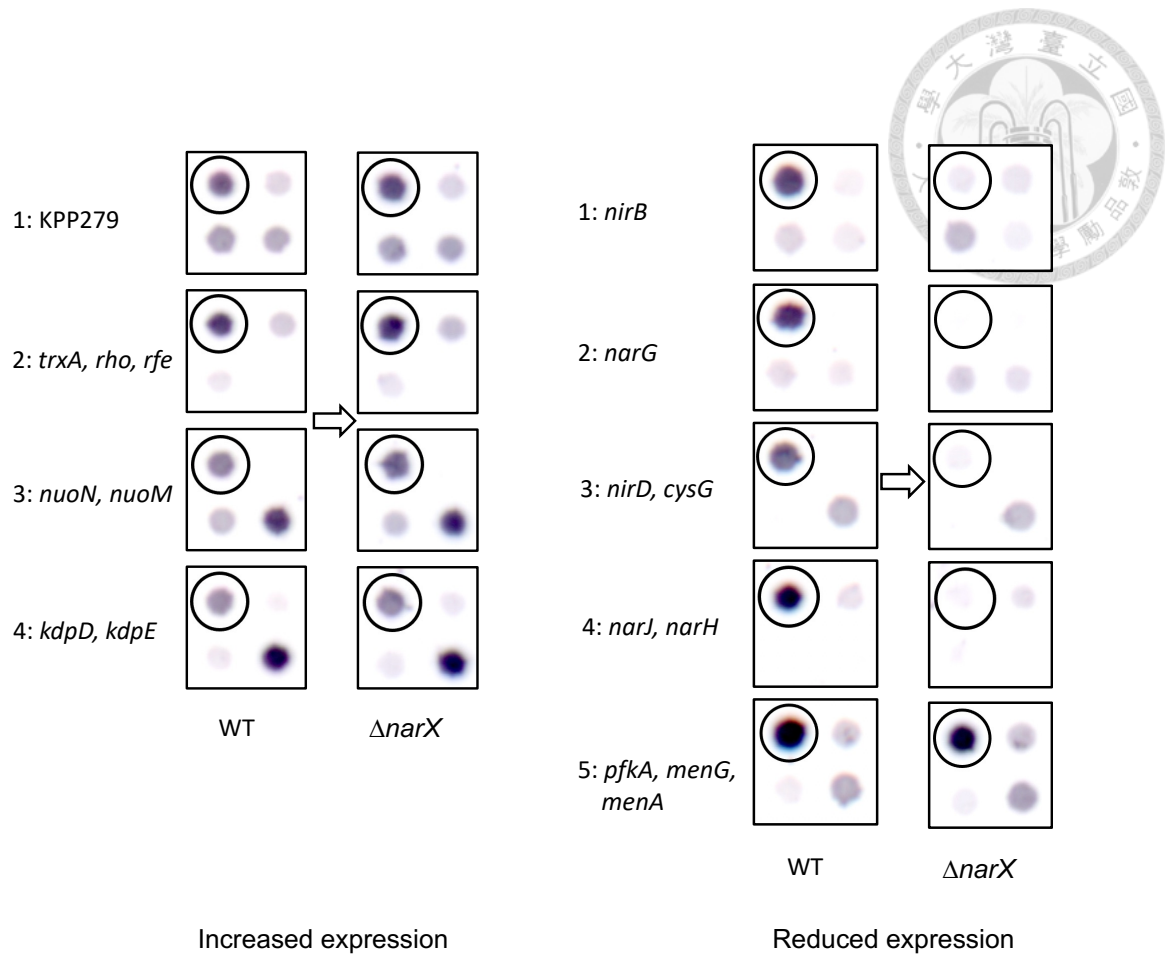
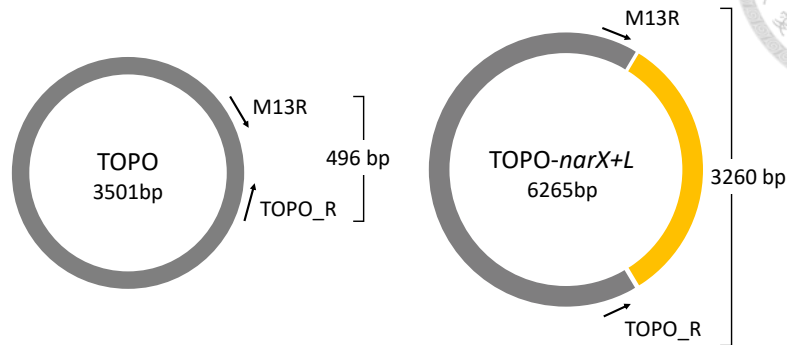


圖 九、NTUH-K2044 與 $\Delta narX$ 的基因微陣列分析

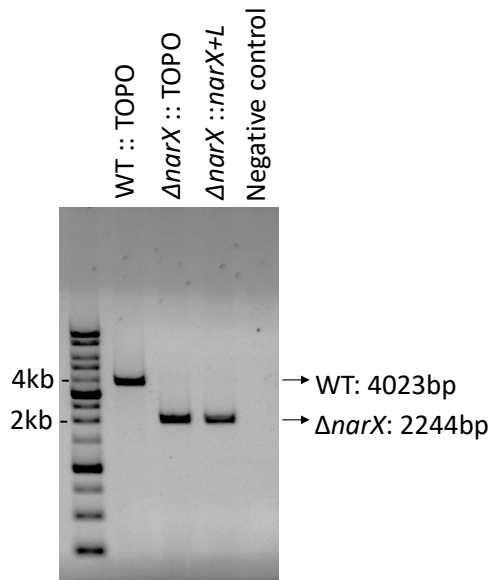
將基因微陣列有顯著差異之結果部分放大於上圖，左排圈起四點代表四個在剔除 *narX* 後明顯有表現量上升之 cloned 序列；右排圈起五點代表五個在剔除 *narX* 後明顯有表現量下降之 cloned 序列，點的編號從表現量差異最大排到最小，而各點片段對應之基因標示於編號旁，基因內容請參照（表二）。



(A)

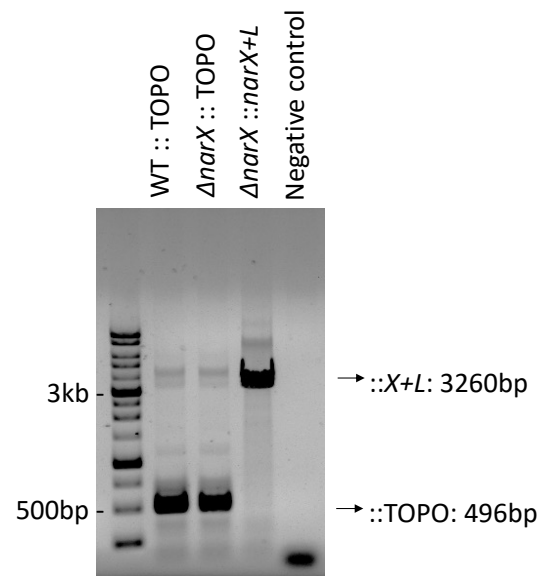


(B)



Primers: NTUH_2044_F + NTUH_2044_R

(C)



Primers: M13R + TOPO_R

圖 十、NTUH-K2044 和 $\Delta narX$ 補回株之回補結果

(A)圖為 TOPO 以及 TOPO-*narX+L* 質體之示意圖和引子 M13R、TOPO_R 所在之相對位置，圖中數字代表質體和 PCR 產物之大小。(B)圖為以 NTUH_2044_F、NTUH_2044_R 所 PCR 之結果。(C)圖為以 M13R、TOPO_R 所 PCR 之結果。(Negative control 陰性對照組為二次去離子水，箭頭標示為預期產物大小。)

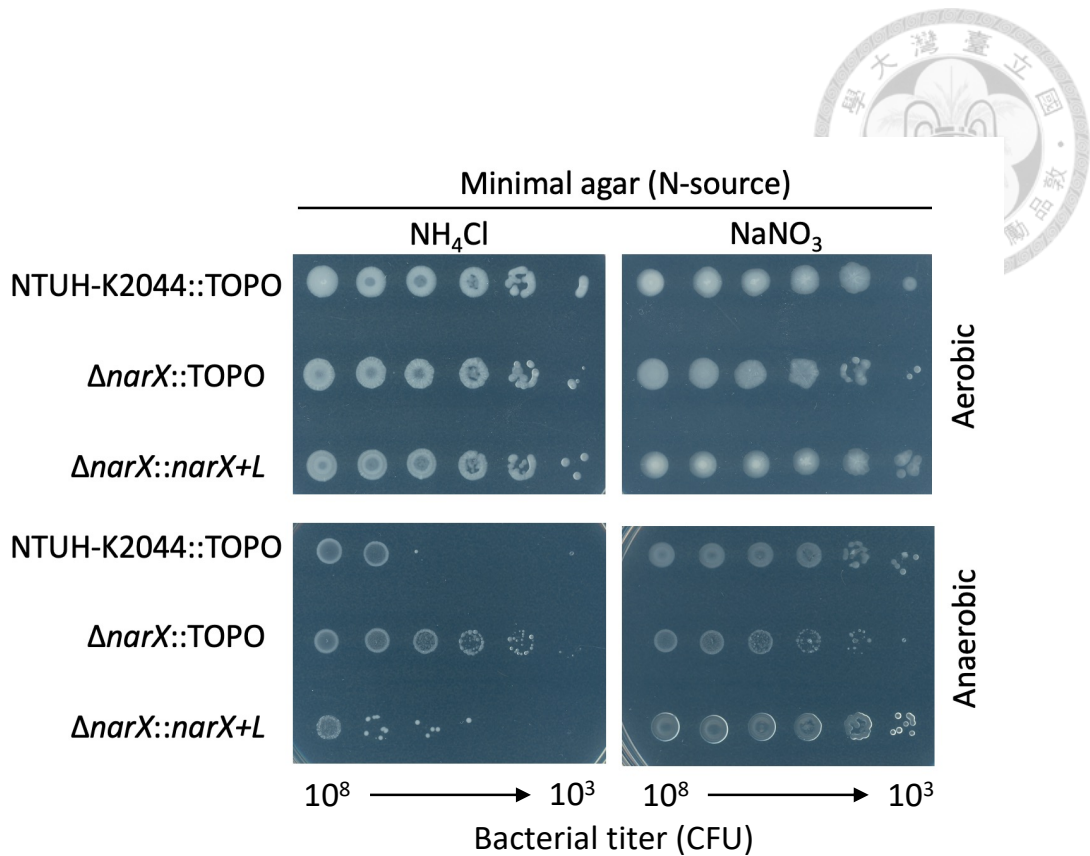


圖 十一、 $\Delta narX$ 生長情形

圖為分別在 18.7 mM NH₄Cl、18.7 mM NaNO₃ 為唯一氮源的 minimal agar 上細菌在有氧及厭氧環境的生長情形，菌株包含 NTUH-K2044::TOPO、 $\Delta narX$::TOPO 和 $\Delta narX$::*narX+L*，由左至右點上序列稀釋十倍後的菌液 10⁸ 至 10³CFU。

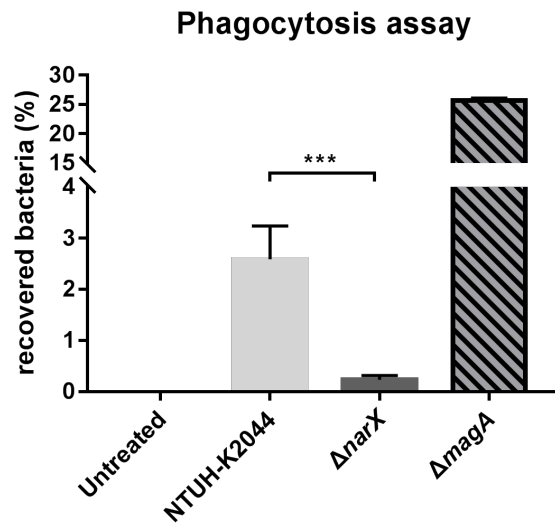


圖 十二、胞噬作用測試

克雷伯氏肺炎桿菌突變株 $\Delta magA$ 、 $\Delta narX$ 及野生株 NTUH-K2044 以 10^7 和 THP-1 分化之巨噬細胞 15 分鐘後，置換為含有 $100\mu\text{g/mL}$ 慶大黴素之培養液，並在 30 分鐘後破菌，計數細胞吞噬隻之菌量。untreated 為未受感染之細胞組，作為 control， $\Delta magA$ 為已知易受細胞吞噬並缺乏 CPS 之菌株，recovered bacteria 數值為被胞噬之菌量佔初加入之菌量的百分比。圖為三次獨立實驗結果之平均，每個條件為兩重複。分析後數據以平均值 \pm 標準差 (Means \pm SD) 呈現。誤差棒 (error bar) 代表標準偏差 SD，***表示 P value <0.001 ，統計方法皆為單因子變異數分析 (One-way ANOVA)。

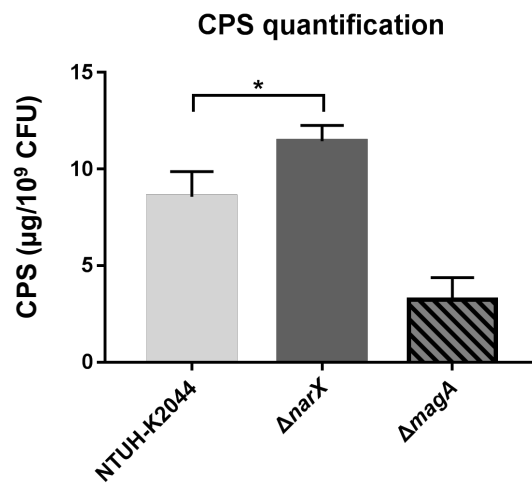
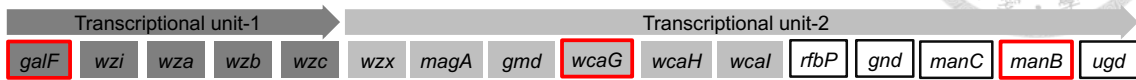


圖 十三、莢膜多醣定量

根據作者 Blumenkrantz 及 Asboe-Hansen 提出的方法，來定量突變株 $\Delta magA$ 、 $\Delta narX$ 及野生株 NTUH-K2044 的莢膜多醣，兩圖為兩次獨立實驗結果之平均，每個條件為三重複。分析後數據以平均值 \pm 標準差(Means \pm SD) 呈現。誤差棒(error bar)代表標準偏差 SD，*表示 P value < 0.05 ，統計方法皆為單因子變異數分析(One-way ANOVA)。



(A)



(B)

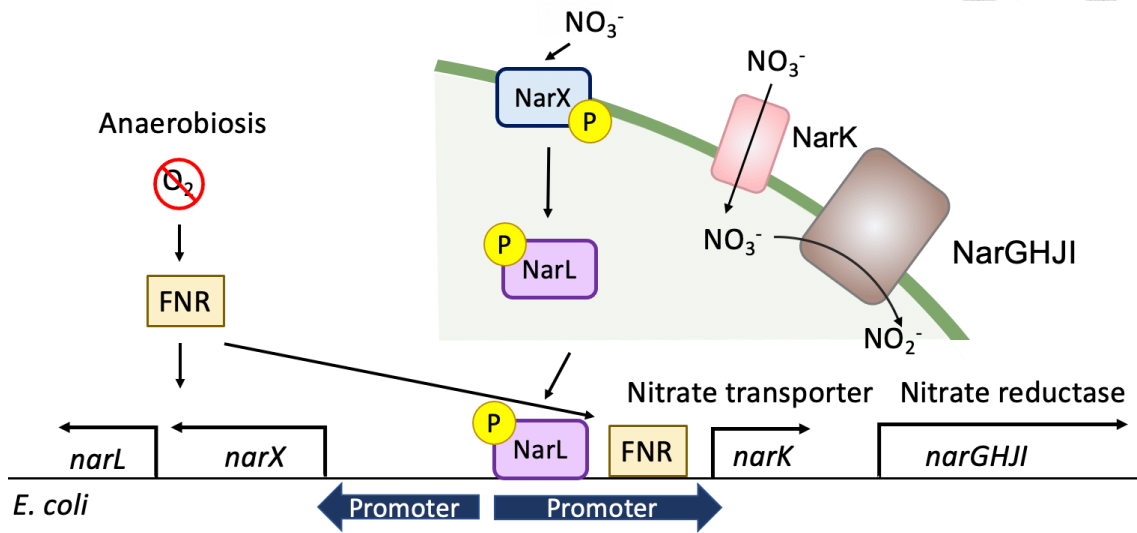
Gene name	Symbol	Fold change	
		($\Delta narX$ / WT)	($\Delta narX :: TOPO / :: narX+L$)
Nitrate sensor gene	<i>narX</i>	7.53E-05	5.35E-07
UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	<i>galF</i>	13.00	4.39
GDP-L-fucose synthase	<i>wcaG</i>	3.97	12.73
Phosphomannomutase	<i>manB</i>	4.20	6.77

圖 十四、莢膜基因群 mRNA 表現量

(A) 為在 NTUH-K2044 的 K-locus(莢膜基因群) 上基因的相對位置示意圖，共包含兩個轉錄的單位，紅色匡起的為選為 qPCR 的目標基因。(B) 為利用 qPCR 檢測 K-locus 基因 mRNA 表現量差異之結果。Relative quantity 為剔除 *narX* 基因後相對野生株的倍數差異或補回 TOPO 質體後相對補回 *narX+L* 的 $\Delta narX$ ，數值以 23S rRNA 表現量為內部控制組，qPCR cycle 數為 40 個。表為兩次獨立實驗結果之平均，每個條件為三重複。分析後數據以平均值呈現。

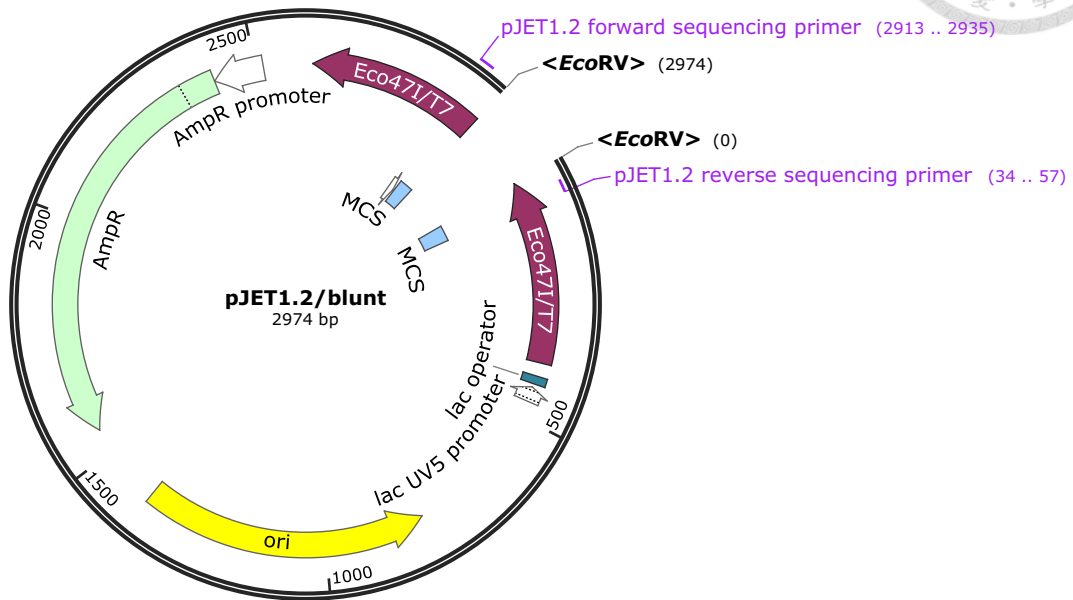


附錄



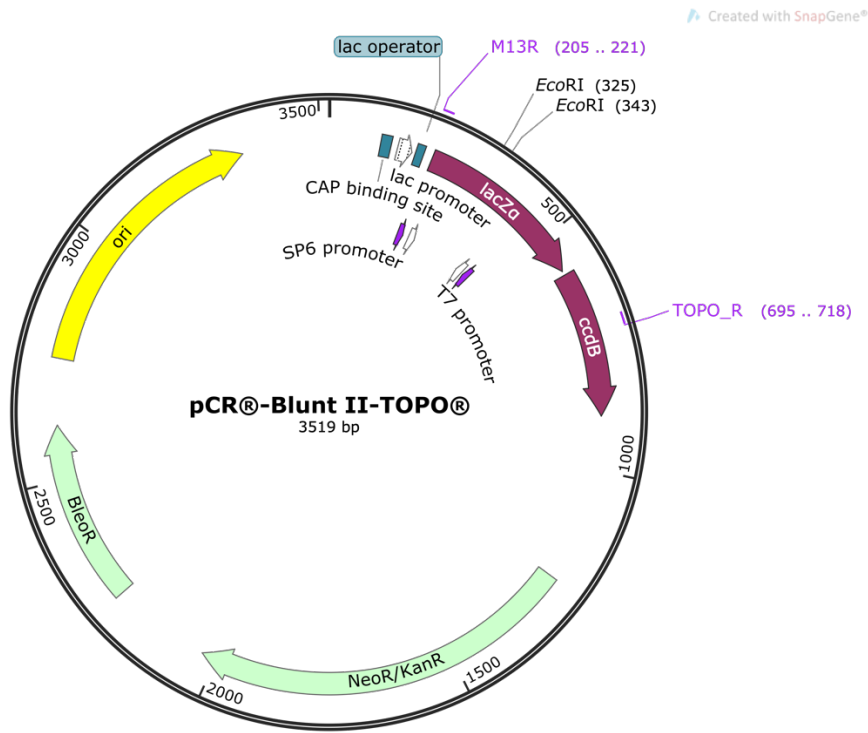
附錄 一、*E. coli* 中 NarX-NarL 相關基因的分佈和功能之示意圖

FNR: fumarate and nitrate reductase regulation protein



附錄 二、pJET1.2/blunt map

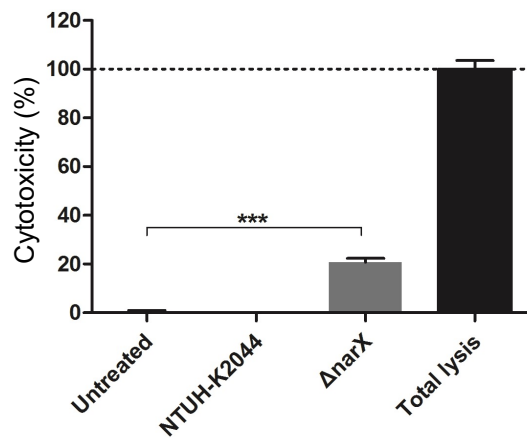
引子以紫色字體表示，subclone 基因 *narX* 至 pJET1.2/blunt 後，可以 pJET1.2 forward or reverse sequencing primer 確認轉型後序列之大小，此序列由 Thermo Scientific 網頁所提供，並以 snapgene 呈現。



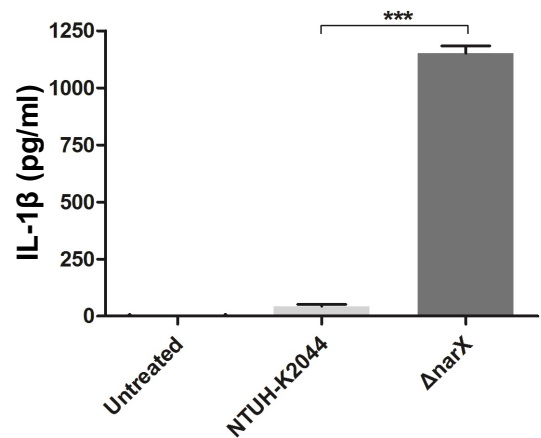
附錄 三、pCR®-Blunt II-TOPO® vector map

引子以紫色字體表示，序列有兩個 *EcoRI* 位置，此序列由 Thermo Scientific 網頁所提供，並以 *snappgene* 呈現。

(A)

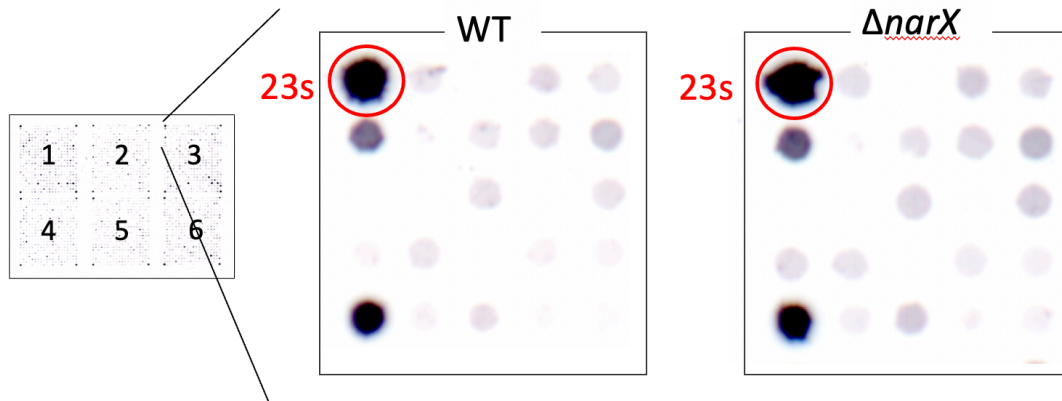


(B)



附錄 四、初步結果： $\Delta narX$ 感染 THP-1 的細胞死亡率及 IL-1 β 分泌量

克雷伯氏肺炎桿菌突變株 $\Delta narX$ 及野生株 NTUH-K2044 以 MOI=1 感染 THP-1 細胞 1 小時後，更換培養液，並在 4 小時後，收集細胞上清液進行分析。(A) 為以乳酸脫氫酶測試細胞毒性之結果，untreated 為未受感染之細胞組，作為 control (0%)，total lysis 為加入細胞裂解液且未受感染之組別，代表全數細胞死亡所釋放之 LDH 的最大值 (100%)。(B) 為以 ELISA 測量細胞所釋放之 IL-1 β 分泌量。兩圖為一次獨立實驗結果三重複之平均。分析後數據以平均值 \pm 標準差 (Means \pm SD) 呈現。誤差棒 (error bar) 代表標準偏差 SD，***表示 P value < 0.001，n.s 表示差異不顯著，統計方法皆為單因子變異數分析 (One-way ANOVA)。



附錄 五、基因微陣列部分區域放大圖

圖為野生株及 $\Delta narX$ 分別和 NTUH-K2044 微陣列膜共同作用呈色，並將第三區左上角 25 點放大的結果，紅色圈起的點為 23s 序列的 clone，訊號作為內部控制組，數據量化後的基準點。

全文完