

國立交通大學
分子醫學與生物工程所
碩士論文

Functional characterization of the serine threonine kinase

KpnK in *Klebsiella pneumoniae* CG43

克雷白氏肺炎桿菌 CG43 絲胺酸/蘇胺酸激酶 KpnK

的功能性探討

Student: Hui-Yu Cho

學生：卓蕙瑜

Advisor: Hwei-Ling Peng, PhD.

指導教授：彭慧玲 博士

July, 2014

中華民國一百零三年七月

論文摘要

近期研究指出，克雷白氏肺炎桿菌之絲胺酸/蘇胺酸激酶 KpnK 會正向調控細菌抗氧化壓力的反應。本論文探討 KpnK 在肝膿瘍分離株 CG43 中是否還扮演其他調控角色，首先，我們發現剔除 *kpnK* 基因後會增加 CG43 對抗巴拉刈的敏感性，而此突變株並沒有如預期的影響其多醣莢膜的生成，且磷酸甘露糖異構酶第 98 絲胺酸殘基的磷酸化也不受 *kpnK* 基因缺損的影響。接著，啟動子活性分析顯示 *kpnK* 的表現會受調控胞外結構壓力的雙分子磷酸化系統 CpxAR 正向影響。有趣的是，*kpnK* 的基因缺失會增加此菌株凝集酵母菌的活性，此暗示第一型線毛的表現量會增加；相對的，此基因剔除對 CG43 的胞外組成分子包括第三型線毛單位蛋白 MrkA 或纖維素的生成量卻無顯著影響。另外，為了證明 KpnK 的酵素活性，還建構了分別帶有 KpnK 定點突變序列(KpnK-S36A, -D201A, -D217A)的三個 pETQ31 重組質體，並以 Pro-Q Diamond 染色分析帶有其中一個重組質體的 *kpnK* 基因缺損菌株的總蛋白及重組 KpnK 蛋白的磷酸化狀態，卻發現二者的磷酸化程度沒有因 *kpnK* 基因缺損而改變，此結果暗示單一的定點突變對 KpnK 的活性影響不大。更進一步以 Pro-Q Diamond 染色失去自我磷酸化能力的截短 KpnK(N-KpnK 或 C-KpnK)和完整 KpnK 的重組蛋白，結果都呈現被磷酸化的狀態，這些結果顯示其他激酶可能可以代償 KpnK 的磷酸化能力。

Abstract

Klebsiella pneumoniae STK, namely KpnK, has recently been shown to positively regulate the oxidative stress response. The thesis investigates if KpnK plays more regulatory roles in *K. pneumoniae* CG43, a liver abscess isolate. Firstly, the deletion of *kpnK* gene was found to increase *K. pneumoniae* CG43 sensitivity to paraquat, however, the mutant did not exert the changes, as suggested by the previous study, on the CPS production or on the phosphorylation state of ManB-S98, the 98th residue serine of phosphomannosemutase. The subsequent promoter activity analysis demonstrated that *kpnK* was positively affected by the envelope stress regulation two component system CpxAR. It is interesting to note that the *kpnK* deletion mutant exhibited an increased mannose-sensitive yeast agglutination activity suggesting an increased expression of type 1 fimbriae, by contrast, no apparent changes of the production of the envelope component type 3 fimbriae pillin MrkA or cellulose. Furthermore, the 3 pETQ31-derived recombinant plasmids with sequences coding for the site-directed mutated KpnK (respectively KpnK-S36A, -D201A, and -D217A) were constructed. The analysis via Pro-Q Diamond staining assay revealed that the total cellular proteins or the recombinant KpnK protein of $\Delta kpnK$ mutant carrying either of the recombinant plasmids had no change of the phosphorylation pattern, suggesting that the single directed-mutation of the KpnK may have little effect on the KpnK enzymatic activity. Furthermore, the recombinant truncated KpnK proteins, N-KpnK and C-KpnK, which had lost the autophosphorylation activity, remained in phosphorylated form as the recombinant KpnK protein after staining by Pro-Q Diamond. These results suggest that other kinases may compensate the phosphorylation activity of KpnK.

謝誌(Acknowledgement)

碩班時光，說長不長，說短不短。謝謝兩年來許多幫助過我的人，很開心有這個緣分可以加入溫暖的彭大家庭，讓我在這裡可以無憂無慮的學習。首先感謝我的指導教授—彭慧玲老師，您宛如媽媽般，指導著我實驗上邏輯的思考，每在實驗遇瓶頸的時候，就像燈塔般引領我找到新的方向，也在一次次科學新聞討論中，教導我們該注意的許多小細節，在這些討論及指導論文修改的過程中，我總覺得老師的中文、英文以及科學邏輯都好強唷!!(希望我也可以如此)，邏輯思考對我來說是一件要想很久的事，經由老師、學長姐、同學們耐心的訓練，我很開心我進步了，這一切都要歸功於大家細心的教導。除此之外，老師也時常關心我們，尤其在我腳受傷的時候，更貼心的給了我護膝，並也給我們充分的機會，讓我們不僅在實驗上有所成長，在心靈上也有踏實的歸屬感。

也特別感謝中興大學鄧文玲老師以及交通大學梁美智老師，在百忙中撥冗擔任我的口試委員，用心地給予我修正論文的建議及指點我實驗中遇到的盲點。以及感謝清華大學張晃猷老師，在我碩二寒假的 joint meeting 及預口試時給予寶貴的建議，使我有更多方向思考的機會。

感謝實驗室中的夥伴們，因為有你們，我在這裡的生活才能如此絢麗。謝謝氣質又能幹的靜柔學姊及對實驗超有熱忱的哲充學長，在實驗中我有任何的問題，你們總是鉅細靡遺的教導我，在實驗卡關的時候，你們也總是絞盡腦汁協助我如何 trouble shooting，實驗室有你們兩個學長姐的帶領，讓我們可以很快進入狀況。有趣的冠男學長、美麗的燕曦學姊、以及電腦能力超強的子祥學長，謝謝你們除了在實驗上的幫助外，並分別在實驗室報帳的事宜、身體健康及如何保養的觀念、以及幫我處理許多電腦方面的問題上，給予眾多的幫忙，讓我在生活上有更多的體驗。謝謝我的同伴們—邏輯力超強的偉豐，在我百思不得其解的 pathway 前，一步一步指導我理出思緒；英文超好的俐君，在我閱讀文獻有問題時給予適當的協助；個性率直的珍儀，陪我從大學走到研究所 6 年的生活裡，帶領我邁向吃素

的境界(雖然我還是會想吃肉)，有你們這些可愛的同伴們，除了實驗外，我們一起去 KTV 瘋、那兩年我們一起去逛的大潤發、中秋節一起烤肉、一起為畢業生跳的”撐腰”以及許多林林總總的生活大小事，將在我的生命中留下美麗的印記。學長兼學弟的家睿，謝謝你總在我跟你借摩托車的時候，義不容辭借我；兩位可愛又天兵的學妹子芸、瑋芝，謝謝你們總在我需要擺 pose 照相的時候，教我裝一下氣質；以及兩位帥帥的新碩一啟翔、若迪和我一起開心討論著電視劇…等，實驗室有你們 5 個學弟妹，讓我可將實驗結果的煩惱拋之九霄雲外(雖然最後還是得要回來面對)。也謝謝張晃猷老師實驗室的 Anita、Clare、芊瑜學姊在緊急的時刻借我實驗用品以及協助報帳事宜，同學慈芳、韻婷一起修課、討論實驗，互相切磋成長。有你們的陪伴，讓我在研究之路，獲益良多。

感謝我的大學同學：提示我論文目錄編排技巧的雅妃、在我煩心時提供我遊玩住宿的楊蓉、怡君、念慈，好感動有你們的陪伴。感謝暨南大學專題實驗室若梅學姐、椒楹學妹在我舊傷復發的期間，還特別寄那個很厲害的磁石來幫我鎮住腳傷。以及在大學、研究所間，所有關心指導我的任課老師、學長姐們，真的非常謝謝你們，讓我在知識的殿堂裡，有更深的探索。

最重要的是感謝對我無怨無悔、不求回報的家人們，每當在我慌張的時候，總是在我身旁給我力量；在我忙得焦頭爛額時，總是讓我心無旁騖能好好把自己的目標達成。這輩子能和你們成為家人，是多麼的幸運!!在這重要的時刻，我想對你們說，我愛你們，雖然孩子不管長多大，父母總有操不完的心，但現在我已漸漸成熟，請你們放心。最後，我也想謝謝自己，勇敢的以化學系背景接觸生科領域，並在過程中不斷堅持並汲取新知。雖然即將畢業，在這高度競爭的社會中，會有更多的挑戰，但我想告訴自己，勇於創新、不害怕嘗試新事物、別等到失敗才後悔自己還有潛力沒發揮，成功，永遠是留給準備好的人。

中華民國 103 年 7 月 22 日 卓蕙瑜 謹誌

目錄

論文摘要.....	i
Abstract.....	ii
謝誌(Acknowledgement).....	iii
目錄.....	v
表目錄.....	viii
圖目錄.....	ix
縮寫表.....	xi
第一章 前言.....	1
1.1 克雷白氏肺炎桿菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i> , KP).....	1
1.2 莢膜多醣體(CPS).....	2
1.2.1 磷酸甘露糖異構酶(ManB).....	2
1.3 蛋白質的磷酸化修飾(protein phosphorylation).....	3
1.3.1 蛋白 Ser/ Thr 的磷酸化激酶(STK).....	4
1.3.2 ESTK— YihE (RdoA).....	4
1.3.3 KpnK 的調控及功能.....	5
1.4 CpxAR 的調控及功能.....	6
1.5 線毛黏附因子.....	6
1.6 抗壓反應(Anti-stress response).....	8
1.6.1 抗酸機制.....	8
1.6.2 抗氧化機制.....	9
1.7 研究目標.....	10
第二章 實驗材料與方法.....	11
2.1 實驗菌株、質體、核酸引子、培養條件.....	11
2.2 質體建構.....	11
2.2.1 缺失突變體(specific gene-deletion mutants)及回補質體 (complementary plasmid)的建構.....	11

2.2.2	定點突變體(Site-directed mutagenesis)	12
2.3	生長曲線測量.....	12
2.4	莢膜多醣體的低速離心定性分析.....	12
2.5	巴拉刈(paraquat)及過氧化氫(H ₂ O ₂)的氧化壓力能力評估	12
2.5.1	生存率測試.....	12
2.5.2	紙錠分析(Disc diffusion assay)	13
2.6	酸性環境壓力生存率測定.....	13
2.7	西方墨點法(Western Blot analysis).....	13
2.8	蛋白質高量表現之質體建構.....	14
2.9	蛋白質大量誘導.....	14
2.10	Pro-Q diamond 染色分析蛋白質的磷酸化.....	15
2.11	酵母菌凝集測試(Yeast Agglutination).....	15
2.12	啟動子(Promoter)分析.....	15
2.12.1	啟動子報告載體建構.....	15
2.12.2	啟動子活性分析.....	16
2.13	生物膜染色分析.....	16
2.14	剛果紅(Congo red)及鈣螢光(Calcofluor)表現型分析.....	17
2.15	數據分析.....	17
第三章	實驗結果.....	18
3.1	<i>K. pneumoniae</i> CG43S3 Δ <i>kpnK_1</i> 的 CPS 生合成.....	18
3.2	<i>kpnK</i> 下游基因 <i>dsbA</i> 缺失對 CPS 生合成的影響.....	18
3.3	CG43S3 Δ <i>kpnK</i> 基因缺損株的建構與其生長曲線分析.....	18
3.4	<i>kpnK</i> 基因缺損突變株中 ManB 的磷酸化.....	19
3.5	<i>kpnK</i> 基因缺損株的抗氧化能力分析.....	19
3.6	以 LacZ 報導系統探討 CpxAR 對 <i>kpnK</i> 基因的調控.....	19
3.7	<i>kpnK</i> 基因缺損株的抗酸能力.....	20
3.8	<i>kpnK</i> 缺損突變株凝集酵母菌的活性分析.....	20

3.9	<i>kpnK</i> 基因缺失增加第一型線毛單位蛋白 FimA 的生成.....	21
3.10	<i>kpnK</i> 基因缺失對第三型線毛表現及生物膜形成能力的影響	21
3.11	<i>kpnK</i> 基因缺損株的 EPS 表現	22
3.12	KpnK 定點突變質體的選殖與建構.....	22
3.13	KpnK 定點突變對其酵素活性的影響.....	22
3.14	在 CG43S3 中測試 N-及 C-KpnK 的磷酸化.....	23
3.15	N-KpnK 及 C-KpnK 在 <i>kpnK</i> 缺失突變株中激酶活性的探討	23
3.16	在 KPCG43 基因體中有多套 STK 基因	23
第四章	討論.....	25
第五章	參考文獻.....	29



表目錄

表一、本研究所使用與建構的菌株.....	43
表二、本研究所使用與建構之質體.....	45
表三、本研究所使用之核苷酸引子.....	47



圖目錄

圖 一、 <i>kpnK_1</i> 基因缺損突變株在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中的 CPS 生合成	49
圖 二、基因缺損突變株之建構示意圖及低速離心觀察 $\Delta kpnK_1$ 、 $\Delta dsbA$ 及 $\Delta kpnK_1 \Delta dsbA$ 在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中的 CPS 生合成	51
圖 三、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中建構 <i>kpnK</i> 基因缺失突變株及回補株	52
圖 四、 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中的 <i>kpnK</i> 基因缺損突變株及回補株在 LB 及 M9 培 養液中的生長曲線分析.....	53
圖 五、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>kpnK</i> 基因缺損突變株的 CPS 生合成及 ManB 的磷酸化.....	54
圖 六、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>kpnK</i> 基因缺損突變株對抗 H_2O_2 及 paraquat 抗 氧化能力分析.....	55
圖 七、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 CpxR 對 <i>kpnK</i> 基因的轉錄調控.....	56
圖 八、 <i>kpnK</i> 基因缺損突變株在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中的抗酸能力	57
圖 九、 <i>kpnK</i> 基因缺損突變株在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中凝集酵母菌的活性分析	58
圖 十、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>kpnK</i> 基因缺失對第一型線毛表現的影響及轉 錄調控.....	60
圖 十一、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>kpnK</i> 基因缺失對第三型線毛表現的影響	61
圖 十二、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>kpnK</i> 基因的缺失對生物膜形成能力的影響	62
圖 十三、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>kpnK</i> 缺損突變株的纖維素表現	63
圖 十四、 <i>kpnK</i> 在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 及 <i>E. coli</i> 中胺基酸序列比對分析.....	64
圖 十五、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 S36A、D201A、D217A 的定點突變質體建 構及定序確認圖.....	65
圖 十六、以 Pro-Q Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑分析 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中	

KpnK-S36A, -D201A, -D217A 定點突變對其酵素活性之影響	66
圖 十七、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中分析 N-KpnK 及 C-KpnK 磷酸化之變化...	68
圖 十八、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 $\Delta kpnK$ 菌株中分析 N-KpnK 及 C-KpnK 磷酸化 之變化.....	69
圖 十九、 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中共有 4 套 STK 基因	70
圖 二十、 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>kpnK</i> 上下游的可能調控路徑圖	71
附錄 一、在 <i>K. pneumoniae</i> CG43 中 <i>manB</i> 的缺失突變體的 CPS 生合成及 ManB S98 影響其酵素活性	72
附錄 二、在 KP NTUH-K2044 之磷酸蛋白質體(phosphoproteome)分析.....	73



縮寫表

ATP	adenosine triphosphate
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
bp	base pair
CFU	colony forming unit(s)
CIAP	calf intestine alkaline phosphatase
CPS	capsular polysaccharide
DNA	deoxyribonucleic acid
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediamine-tetraacetic acid
ESBL	extended-spectrum β -lactamase
IPTG	isopropyl-1-thio- β -D-galactopyranoside
kb	kilobase(s)
kDa	kilodalton(s)
KpnK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kinase
LB	Luria-Bertani
μ g	microgram
mM	milligram
μ M	micromolar
mM	Millimolar
ManB	phosphomannomutase
NBT	nitro blue tetrazolium chloride
ONPG	ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	polymerase chain reaction
PVDF	polyvinylidene difluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
ST(P)K	serine/ threonine (protein) kinase
TCS	two-component system
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-inodolyl- β -D-galactopyranoside

1.1 第一章 前言

1.1 克雷白氏肺炎桿菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)

KP 是一株伺機性感染的革蘭氏陰性菌，屬腸內菌科，具有厚重莢膜、不具鞭毛、為一不具移動性的兼性厭氧菌。除了自然環境外，KP 在健康人體如：口腔黏膜、眼睛、腸道、尿道，以及肺部等黏膜部位也常被發現(Ryan *et al.*, 2004)。在免疫不全的病人身上，常導致菌血症、敗血症、眼內炎、腦膜炎、肺炎、尿道以及呼吸道感染；而在亞洲，KP 已成為引發肝膿瘍的首要原因，在 2004 年，更有超過 900 個案例在台灣被報導，如不加以治療，則有高達 90% 的致死率(Fang *et al.*, 2004)。另外，KP 也是造成群聚感染以及院內感染常見的病原菌之一(Podschn *et al.*, 1998)。

近年來，由於抗生素的濫用，導致抗藥菌株不斷的出現。1989 年，第一株帶有多重抗藥性 *extended-spectrum-beta-lactamase*(ESBL) 基因的 KP 在美國被發現後，多重抗藥的 KP 菌株隨即在美國境內快速傳播(Colodner *et al.*, 2004)；Carbapenems 原為用來管控多重抗藥性菌株感染之藥物，但在 2008 年，抗 Carbapenems 的 KP 菌株 KPC 出現(French *et al.*, 1996; Hirsch *et al.*, 2010; Nordmann *et al.*, 2009)，接著，更有 NDM-1 KP 的出現，至今，所有帶有 NDM-1 基因的分離株皆有多重抗藥性(Kumarasamy *et al.*, 2010; Yong *et al.*, 2009)，因此，如何管控 KP 所引發的感染，遂成了一項嚴重的挑戰。

KP 的致病因子包含包含酯多醣(lipopolysaccharide, LPS)、攝鐵系統(iron acquisition system)、分泌系統(secretion system)、黏附因子(adhesion)、莢膜多醣體(Capsular polysaccharides, CPS)。而本實驗室所研究的 KPCG43 為長庚紀念醫院從糖尿病患者的肝膿瘍分離株，因其表面受厚重的 CPS 包覆，菌落圓潤光滑並具有高度黏滯性(Chang *et al.*, 1996)；在 KPCG43 中有 8 套攝鐵系統(Lin *et al.*, 2011)，可幫助細菌得以在缺鐵的環境或宿主中增生；另外，第三型線毛為外膜上的髮狀構造，是其主要黏附因子，有助其黏附於生物或非生物器材的表面形

成生物膜 (Huang *et al.*, 2006)。

1.2 莢膜多醣體(CPS)

莢膜多醣體可使細菌躲避補體系統(Complement system)攻擊且具有抗吞噬(anti-phagocytosis)的能力，目前被分離出的莢膜血清型約 77 種，其中以 K1 及 K2 毒性最高，也是造成肝膿瘍主要的血清型(Wacharotayankun *et al.*, 1992)。其莢膜多醣體構成單元為 $[\rightarrow 4)\text{-Glu}\text{-}(1\rightarrow 3)\text{-}\alpha\text{-Glc}\text{-}(1\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-Man}\text{-}(3\rightarrow 1)\text{-}\alpha\text{-GlcA}\text{-}(1\rightarrow]_n$ 。負責 K2 莢膜生合成的 gene cluster 包含 19 個開放讀框(open reading frames)，分屬 3 個轉錄單位，其中有 4 個基因 *wzi-wza-wzb-wzc* 與 *E. coli* 的相對基因具有高度序列相似性。Wzi 是一外膜蛋白，在 Δwzi 中，可以明顯看到多糖莢膜大量減少，暗示著 Wzi 參與連接多醣莢膜於細胞表面的工作；嵌在外膜上的 Wza 是一通道蛋白，與嵌在內膜上的酪胺酸激酶(protein tyrosine kinase, PTK)Wzc 交互作用，而將膜間的多醣莢膜送出外膜；Wzc 酪胺酸激酶能自我磷酸化或磷酸化其他蛋白，而 Wzb 酪胺酸去磷酸酶(protein tyrosine phosphatase, PTP)可去除酪胺酸上共價接合的磷酸根，而 PTKs 及 PTPs 的基因多半坐落與製造及運輸 CPS 有關的基因座上(Cozzone *et al.*, 2009)。我們實驗室也發現 KP CG43cps 基因組的表現，可受 Wzc 磷酸化所調控，其中，磷酸甘露糖異構酶 ManB 可能是 Wzc 磷酸化的標的(萬舉豪，2012)。

1.2.1 磷酸甘露糖異構酶(ManB)

ManB 具有雙重活性的酵素可以催化 CPS 的前驅物 mannose-1- phosphate 與 mannose-6-phosphate 之間轉換的可逆反應；此外，ManB 也可催化 glucose-1-phosphate 與 glucose-6-phosphate 間之轉換，因此此酵素被稱為 phosphomannomutase 或 phosphoglucomutase (Goldberg *et al.*, 1993)。*manB* 基因座落於多醣莢膜生合成基因組上，與相鄰的基因產物共同參與多醣莢膜的生合成。*Pseudomonas aeruginosa* 的 ManB 酵素的絲胺酸(Ser108)在催化 glucose-1-phosphate 轉換 glucose-6-phosphate 的反應扮演非常關鍵的角色，在反

應中先將第 108 絲胺酸磷酸化，然後以共價鍵接在 glucose-1-phosphate 的 6 號碳上，形成 glucose-1,6-bisphosphate 中間產物，再經由分子翻轉使 1 號碳接近 Ser108 並以共價鍵結磷酸根，最後釋出產物 glucose-6-phosphate (Regni *et al.*, 2006)。我們實驗室的萬舉豪藉由分析序列結果，推測 KPCG43 ManB 的 Ser 98 之磷酸化可能影響其酵素活性，而其磷酸化被一未知的激酶所調控(萬舉豪，2012)。

1.3 蛋白質的磷酸化修飾(protein phosphorylation)

細菌的蛋白質形成後修飾主要包含：乙醯化(acetylation)、甲基化(methylation)、蛋白酶解(proteolytic degradation)、脂化(lipidation)以及磷酸化(phosphorylation)。其中，磷酸化通常發生在絲胺酸(Ser)、蘇胺酸(Thr)、酪胺酸(Tyr)、以及組胺酸(His)的殘基上。其磷酸化系統可分為雙分子調控系統(Two-component system, TCS)、磷酸轉移系統(phosphotransferase system, PTS)和三磷酸腺苷依賴系統(ATP-dependent kinase phosphorylation system)。TCS 包含兩個功能獨特的蛋白質 sensor kinase 受到外界訊息刺激後，藉由消耗 ATP，將磷酸基團以共價鍵接在自身的組胺酸殘基上，經自我磷酸化後，再將磷酸基團傳給另一蛋白 response regulator 的天門冬胺酸殘基，而此 response regulator 的磷酸化與否決定其調控功能。PTS 同樣將磷酸基團接在組胺酸上，與 TCS 最大的不同在於 PTS 的磷酸基團由 phosphoenol-pyruvate (PEP)所提供，而且其磷酸基團經一連串的蛋白質傳遞後，最終傳到糖分子(van Tilbeurgh *et al.*, 2001)。在第三個系統中，磷酸化位置發生於蛋白質的 Ser、Thr 以及 Tyr。絲胺酸/蘇胺酸激酶(STK)和 TCS 的不同在於：(一)形成不同的磷酸酯類：STK 形成 phosphoester 而 TCS 形成 phosphoramidate (Stock *et al.*, 2000)；(二)不同數目的磷酸根傳遞：TCS 只傳遞一個磷酸根，STK 卻可能因多種激酶參與磷酸化，而有多重磷酸根傳遞的現象(Inouye *et al.*, 2008; Stock *et al.*, 2000)；(三)TCS 影響基因的轉錄(transcription)，而 STK 除了轉譯後修飾影響蛋白的活性外，當其磷酸化到標的蛋白為轉錄因子時，也會因而影響其下游基因的轉錄(Lin, 2010)。

1.3.1 蛋白 Ser/ Thr 的磷酸化激酶(STK)

真核細胞的蛋白磷酸化系統已被廣泛研究(Bakal *et al.*, 2000), 而至最近幾十年間, 才陸續有細菌 STK 的報導, 而某些和真核 STK 序列具有高度相似性的一群被稱為類真核型的絲胺酸/蘇胺酸激酶(Eukaryotic-like Ser/ Thr Kinase, ESTK)(Hanks *et al.*, 1995), 但並非所有細菌 STK 都為 ESTK。

典型的 ESTK 和真核細胞中的 STK 催化中心具有高度的結構相似性(Canova *et al.*, 2014), 且符合 “Hanks’ motifs” 法則: 通常 N 端由較小區域的 β -sheets 組成, 主要和磷酸根的供應者 ATP 結合, 為可能的 ATP 鍵結區(ATP binding site); C 端由較大範圍的 α -helices 組成, 會辨認並結合受質的特定序列殘基, 為受質鍵結區 (Pereira *et al.*, 2011)。ESTK 具有 Glycine-rich motif 和 ATP 結合(但有些 ESTK 並無此特徵), 當 Glycine-rich motif 缺失時, 此激酶可藉由 lysine-rich motif 或 Glutamate-rich motif 和 ATP 鍵結以獲得高能磷酸根; 另外, ESTK 具有和金屬 (Mg^{2+} 、 Mn^{2+}) 鍵結的 DFG motif, 以穩定激酶活性; 在 DFG 及 PE motif 間為磷酸化修飾的活化部位, PE 的 Glutamate 會和 Arginine 形成鍵結; 而 RDXXXXN motif 為鍵結 Aspartate, 形成 ATP 傳遞予受質結合的結構。

首先在 *E. coli* 中發現參與檸檬酸循環酵素 IDH (isocitrate dehydrogenase) 的活性與其 Ser/ Thr 磷酸化有關(Garnak *et al.*, 1979), 然而, IDH 是透過雙功能的激酶/去磷酸酶(bifunctional kinase/phosphatase) 在 Ser 的位置進行磷酸化, 此雙功能的激酶/去磷酸酶和 ESTK 的胺基酸序列並不相似(La Porte *et al.*, 1985)。直到 1991 年, 第一個名為 Pkn1 的 ESTK 在 *Mycococcus xanthus* 中被發現, 其激酶活性會影響生長(Munoz-Dorado *et al.*, 1991)。在其他的細菌中, 陸續也發現 ESTK 與其代謝, 孢子、細胞壁及莢膜的生成有關, 也可能是細菌的毒性因子 (Edwards-Jones *et al.*, 2004; Richards *et al.*, 2006; Roque *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2007)。

1.3.2 ESTK— YihE(RdoA)

大腸桿菌、沙門氏菌、志賀氏菌(*Shigella*)的 YihE (RdoA) 具有高度的序列相

似性。*yihE*和其下游基因*dsbA*為一組基因操縱子(operon)，此操縱子受Cpx的轉錄調控(Turcot *et al.*, 2001; Suntharalingam *et al.*, 2003)。而*yihE* (或*rdoA*)相關的表現型，可能會因為在不同種細菌間有所不同(Suntharalingam *et al.*, 2003; Lin, 2010)。許多相關報導*yihE/rdoA*的缺失突變會影響基因的轉錄、表現量、以及磷酸化其他蛋白的能力：*S. flexneri*的微陣列(microarray)分析實驗發現*rdoA*剔除後會影響和能量代謝、碳原子降解、胺基酸及核苷酸的合成及蛋白質運輸相關之基因的轉錄(Li, *et al.*, 2001)；也有研究提出DnaK、GroEL、Ef-Tu具有RdoA依賴性磷酸化的現象，因此推測它們是RdoA的受質(Roque, 2009)，但仍未經證實。*S. flexneri* YihE (RdoA) 會調控*galERKM*表現而影響LPS的生成量，進而決定其毒性高低(Edwards-Jones *et al.*, 2004)；但在*S. typhimurium*中，YihE (RdoA) 並不影響LPS的表現量；另外，RdoA也會影響線毛的生成或造成鞭毛狀態的改變(Richards, 2006; Zheng *et al.*, 2007)。

結構分析的研究結果顯示 YihE (RdoA) 在胺基酸 H199 的位置，會藉由和其他胺基酸的交互作用改變結構，進而影響激酶活性；H199 和 D201 及 V216 的主鏈形成氫鍵鍵結，使得 D201 和 D217 的支鏈方向改變，而 D217 的主要功用是和鎂離子鍵結，進而催化其受質的羧基(hydroxyl group)去質子化(deprotonation)，而受質取得 ATP 的 γ -磷酸根後會被磷酸化，因此，將 D217 突變成 alanine 則會喪失其激酶的活性；另外，S36 會透過其羧甲基(hydroxymethyl group)和 ATP 的 β -磷酸根結合，形成過度態來穩定 ATP(Zheng *et al.*, 2007)。

1.3.3 KpnK 的調控及功能

2012 年，類真核型磷酸化激酶 KpnK (*K. pneumoniae* Kinase)首先在 KP MGH78578 中被證實此激酶會受外界環境壓力的刺激，影響 KP 抗氧化及抗抗生素的生存率(Srinivasan *et al.*, 2012)。KpnK 不具完整的特定 ESTK 胺基酸序列，但仍被歸屬於 APH-3'-IIIa and choline kinase 家族，具有鍵結 ATP、錳離子相關序列，富含賴胺酸(lysine-rich)和 RDX₆N motifs，屬於非典型的 ESTK。

KpnK在中性環境具有自我磷酸化的能力，錳離子為其協同因子(cofactor)，

在*kpnK*的基因缺失會使KP對抵抗滲透壓力、氧化壓力及抗生素的能力降低；同時，KpnK在轉錄過程中會受CpxR的正向調控(Srinivasan *et al.*, 2012)。

1.4 CpxAR 的調控及功能

Cpx是一雙分子訊息傳遞系統(two component system, TCS)，由CpxA (sensor kinase)及CpxR (response regulator)組成。會受胞外結構壓力(Envelope stress)的刺激而提高表現，Envelope stress包含胞外酸鹼度、氧化還原壓力、化學分子濃度造成滲透壓變化、外膜酯蛋白或膜間質(periplasm)中摺疊錯誤蛋白的堆積等(Keller and Hunke, 2009; Nakayama and Watanabe, 1995; Snyder *et al.*, 1995)。

CpxA受刺激活化後將訊號傳遞給CpxR，CpxR是轉錄因子，參與蛋白質折疊、外膜結構以及毒性因子等基因的轉錄調控(Humphreys *et al.*, 2004; Nevesinjac and Raivio, 2005; Price *et al.*, 2009; Stefanie *et al.*, 2011)。Cpx的活化可增加CpxAR和CpxP的表現，CpxP為CpxA的負向調控子，當外界無刺激時，CpxP直接和CpxA鍵結而抑制其下游途徑的調控；當膜間質中出現了摺疊錯誤的蛋白時，CpxP抑制CpxA的能力減弱，隨之，與折疊錯誤的蛋白結合後，交給DegP水解酶將折疊錯誤的蛋白水解(Raivio *et al.*, 1999)。

Cpx 會藉由抑制 *csgBADEFG* 而影響線毛的表現，也可抑制鞭毛的 motor 蛋白活性與其他如：*motABcheAW*、*tsr* 及 *aer* 等可影響細菌移動之基因的表現；相對的，CpxR 也可正向調控基因的表現，譬如：CpxR 可促進合成二級訊息分子 cyclic di-GMP 的 diguanylate cyclase YdeH 的基因表現，進而影響細菌的移動及生物膜(biofilm)的生合成(Stefanie *et al.*, 2011)。

1.5 線毛黏附因子

KP 外膜的主要結構組成包括 CPS、LPS 和黏附因子第一型和第三型線毛(type 1 and type 3 fimbriae)，第一型和第三型線毛幫助 KP 黏附人體的呼吸道或尿道得以形成菌落後進一步造成感染。線毛由主要蛋白 major pillin 聚合形成線

狀，這些單位蛋白在膜間質中被 chaperone 保護，免於被蛋白水解酶降解，在外膜上的 usher protein 為基座，可啟動單位蛋白的聚合，而在細菌表面形成線毛。第一型線毛是大腸桿菌造成尿道感染決定性的黏附因子 (Connell *et al.*, 1996)，具有被甘露糖 mannose 糖基化的蛋白專一性的鍵結能力，其組成基因序列、基因結構以及調控路徑和 KP 的第一型線毛有很高的相同性 (Struve *et al.*, 2008; Clegg *et al.*, 1987; Gerlach *et al.*, 1989; Schembri *et al.*, 2005)。大腸桿菌第一型線毛由 *fimAICDEFGH* 構成，主要的單位結構蛋白為 FimA，次要蛋白由 FimI、FimF 和 FimG 組成，FimH 為位於線毛頂端的黏附蛋白，FimC 保護蛋白及 FimD 基座蛋白共同參與線毛的聚合作用。KP 的第一型線毛基因組在 *fimAICDEFGH* 後還有 *fimK* 基因，FimK 可以活化 KP 第一型線毛的表現 (Wang *et al.*, 2013)。FimB 及 FimE 具有 DNA 重組酶的能力，負責調控第一型線毛的表現，KP 第一型線毛表現量較少，可能是由於厚重莢膜和線毛的交互表現影響 (Schembri *et al.*, 2005; Matatov *et al.*, 1999; Sahly *et al.*, 2000)，也可能是 KP 在胞外主要表現第三型線毛所致 (Wu *et al.*, 2012)。

第三型線毛可凝集經單寧酸 (tannic acid) 處理過的紅血球，此外，第三型線毛受 c-di-GMP 調控且和 Biofilm 的生合成有關 (Wu *et al.*, 2012)；第三型線毛和導尿管相關的尿道感染有很密切的關係即可能是形成生物膜所致 (Warren *et al.*, 2001; Maki *et al.*, 2001)。第三型線毛 *mrkABCDF* 操縱子 (operon) 轉譯的主要結構蛋白為 MrkA、MrkF 為次要結構蛋白、MrkD 為黏附蛋白，三者均有助於生物膜的生成 (Huang *et al.*, 2009)；MrkB 及 MrkC 分別為保護蛋白及基座蛋白；*mrkF* 下游 *mrkH*、*mrkI* 與 *mrkJ* 構成決定第三型線毛活性的調控基因組，MrkH 為一 PilZ domain 蛋白，可與 c-di-GMP 鍵結；MrkI 為一 LuxR 型的轉錄因子；MrkJ 為一解環化 c-di-GMP 的 phosphodiesterase (吳健誠，2010)。在 KPCG43 中已發現 *mrkI* 或 *mrkH* 的基因缺失會降低 MrkA 的啟動子活性及蛋白生成，而高量表現 MrkH 時會顯著增加第三型線毛的表現；另外，*mrkJ* 基因缺失會些微增加 MrkA 的表現 (鄭威芸，2011；Wu *et al.*, 2012)。

1.6 抗壓反應(Anti-stress response)

細菌須克服各式各樣的壓力，以能生存在這個環境中。常見的壓力來源，包括：環境中不同的酸鹼度(pH)、滲透壓、以及氧化壓力。細菌在感染人體後，首當其衝的是胃酸所造成的影響，而通過腸道時，則需要耐受鹼性的消化液，以及高度的滲透壓力，為了適應這些嚴峻的環境，細菌發展出一些特定的生存機制，以保護生物分子結構免受破壞。

1.6.1 抗酸機制

在低酸鹼值下，胃幽門桿菌產生大量的尿素分解酵素(urease)消耗氫離子，將 ammonia 轉換成 amine，以中和細胞質及膜間質的酸鹼度；此外，胃酸刺激也可影響其泳動性，使胃幽門桿菌移動至胃黏膜上皮細胞的近中性區(Boot *et al.*, 2002)。大腸桿菌以不同的抗酸機制通過胃酸，志賀氏菌(*Shigella flexneri*)和大腸桿菌一樣擁有強的抗酸能力，相對的，霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*)的抗酸能力較低(Merrell *et al.*, 2001)。

大腸桿菌有 5 種抗酸途徑為 AR(acid resistance)1~AR5(Foster *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2010)。大腸桿菌於 pH5.5 LB 培養至穩定生長期(stationary phase)後換置於 pH2.5 的限制培養基(minimal media)，即可啟動 AR1 抗酸系統，AR1 的活性受 σ^S 與 CRP(cAMP receptor protein)調控，並受葡萄糖抑制；AR2~AR5 都是以胺基酸去羧基酵素(amino acid decarboxylase)消耗特定胺基酸與氫離子，產生終產物胺類(amines)與二氧化碳而提高 pH 值；一般而言，厭氧的酸性環境能夠誘導去羧基酵素的作用，AR2 及 AR3 作用於 pH2.5 的強酸環境；AR4 及 AR5 的抗酸系統則與細菌在 pH4.5 環境下的生存有關(Kashiwagi *et al.*, 1992)。

革蘭氏陰性菌的抗酸系統，除了細胞質中的去羧基酵素外，膜間質的伴隨蛋白也能夠辨識酸刺激而保護蛋白質使其維持活性並避免蛋白沉澱或堆積。大腸桿菌參與膜間質抗酸反應的伴隨蛋白為 HdeA 及 HdeB，此二基因位於同一 operon，受酸誘導表現(Kern *et al.*, 2007)。阻斷 HdeAB 表現可明顯降低大腸桿菌、痢疾桿菌或布氏桿菌(*Brucella abortus*)在酸壓力下的存活率(Malki *et al.*, 2008；

Valderas *et al.*, 2005)；恢復 HdeA 或 HdeB 任一功能，可增進大腸桿菌存活率。HdeA 能結合的膜間質蛋白包含轉運蛋白、代謝酵素、伴隨蛋白、酯蛋白及蛋白質分解酵素等 (Zhang *et al.*, 2011)。

KP 與大腸桿菌同屬於腸內菌科，但缺乏 AR2 及 AR3，在 pH3 的存活率極低。在 KPCG43 中，TCS 的調控基因 *rcsB* 的缺損，可導致其在 pH3 的存活率降低 30%，進一步以二維電泳分析 RcsB 基因缺損株於酸性環境下的蛋白質體變化，發現表現量改變幅度最高的蛋白質為 YfdX，而 YfdX 的表現決定其在靜態培養條件下的抗酸反應(林志桓，2009)；而 YfdX 在酸性環境具備伴隨蛋白的活性，可保護膜間質蛋白免於發生沉澱反應(樊力成，2012)；另外，剔除 KPCG43 的 *hdeB*，可降低其在 pH3 的存活率降低，HdeB 的伴隨蛋白活性也被證實(曾品瑄，2011)；然而，剔除 KPCG43 尿素酵素基因並不影響其於酸性環境下的存活率(林芳瑜，2013)，但可降低 KP 在腸胃道中與野生菌株的競爭力(Maroncle *et al.*, 2006)。

1.6.2 抗氧化機制

在感染的過程中，細菌的抗氧化防禦機制對於其毒性扮演著重要的角色。氧化壓力主要是由 reactive oxygen species(ROS)和 reactive nitrogen species(RNS)所造成，ROS 包含超氧自由基 (superoxide anion, $O_2^{\bullet-}$)、過氧化氫 (hydrogen peroxide, H_2O_2) 以及氫氧自由基 (hydroxyl radical, OH^{\bullet})，而 RNS 則包含了帶電的一氧化氮 (nitric oxide radical, NO^{\bullet}) 及過氧化氮 (peroxynitrite, $ONOO^-$)。細菌體內 DNA 的受損，以及折疊錯誤的蛋白質、脂質都會對細菌造成氧化壓力，進而影響細菌的生長及繁殖。而在感染過程中，細菌處在一個充滿氧化壓力的環境，這時氧化壓力的來源主要來自 (一) 細菌本身體內的氧化壓力：例如電子傳遞鏈 (electron transport chain, ETC)；(二) 外在環境：除了環境中原本就存在的氧化還原反應所造成的氧化壓力外，在感染宿主的過程中也會出現競爭的細菌，這時競爭者也會產生 ROS 來與之競爭；(三) 宿主体內的吞噬細胞 (phagocytic cells)：細菌進到宿主体內之後，受到吞噬細胞的辨識，而將細菌吞進細胞裡，

吞噬細胞裡的 NADPH oxidase 會與氧氣作用而形成大量的超氧自由基及過氧化氫，來攻擊入侵的細菌 (Imlay, 2003)。

在這些氧化壓力下，細菌酵素 SodA、SodB、SodC、KatE、KatG 可清除氧化自由基以免受到傷害 (Yang *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2010; Cruz-Ramos *et al.*, 2002)。KP CG43 $\Delta katG$ 對 H_2O_2 處理敏感，KP CG43 *sodA* 及 *yjcC* 的基因缺失突變會增加對 paraquat 的敏感性，這些結果顯示 SodA、YjcC 或 KatG 可能是 KP 抗氧化壓力的反應因子；另外，*kvgA* 的缺失突變體，會降低 *sodC* 與 *katG* 的表現；而 *rpoS* 的缺失，也會降低 *kvgAS* 的表現量(吳宛怡，2012；黃靜柔，2013)。

1.7 研究目標

根據前人的研究(2012)顯示，ManB 扮演決定莢膜生合成的重要角色，而 ManB-Ser 98 可被未知的磷酸激酶所磷酸化，此位置的磷酸化可能影響其酵素活性。本實驗目的則在於證實 KpnK 是否為 ManB-Ser 98 的磷酸激酶及其抗氧化的活性，同時，確認 KpnK 是否受 CpxAR 所調控及可能影響其表現的因子；進一步探討其可能影響胞外組成分子表現的調控功能：確認 *kpnK* 基因剔除是否影響胞外主要組成分子 CPS、第一型及第三型線毛的生合成、抗酸能力反應及生物膜形成能力；最後，也將驗證 KpnK 重組蛋白的磷酸激酶活性。

第二章 實驗材料與方法

2.1 實驗菌株、質體、核酸引子、培養條件

實驗用菌株、質體、核酸引子分別詳列於表一、表二、表三。用於鏈聚合酶連鎖反應(PCR)中，作為增幅目標基因之模版之核酸，源自於林口長庚紀念醫院臨床分離株 *K. pneumonia* CG43(K2)，分離自肝膿瘍病患(Peng *et al.*, 1992)，在小鼠體內具有很高的致命性(Chang HY *et al.*, 1996)。實驗中，細菌皆培養於 37°C、Luria-Bertani (LB)液態培養基或固態 LB 洋菜膠培養基上，並依不同使用條件加入不同濃度之抗生素包括 kanamycin(25 µg/ml)、ampicillin(100 µg/ml)、tetracycline(5 µg/ml)、streptomycin(500 µg/ml)以及 chloramphenicol(35 µg/ml)。細菌的生長狀態則藉由波長 600 奈米(nm)光吸收度(OD₆₀₀)所測量。

2.2 質體建構

2.2.1 缺失突變體(specific gene-deletion mutants)及回補質體(complementary plasmid)的建構

KP CG43 基因體上的缺失突變及回補，是將特定目標基因的前後約 ~800-1000 bp 的片段，選殖(clone)入 pKAS46 這個自殺型載體，因此當 KP CG43 在複製時，會將攜帶的片段置換入基因體上，且由於 pKAS46 含 *rpsL*，空載體(vector only)會被鏈黴素(streptomycin)所淘選(selection)掉。建構完成的質體會由 *E.coli* S17-1λ *pir* 以 conjugation 的方式送入 KP CG43，之後則會與基因體進行同源互換(homologous recombination)，再以 M9 kanamycin(25 µg/ml)與 ampicillin(100 µg/ml)固態洋菜膠培養基進行篩選，所得菌落再以 streptomycin(500 µg/ml)固態 LB 洋菜膠培養基進行篩選，則會得到同時對 kanamycin 與 ampicillin 型以及抗 streptomycin 型的菌落，即為所求突變體或基因體回補。最後，再以 PCR 的方式確認。

另一種，質體型的回補則是分別將包含及不包含啟動子(promoter)的該基因

選殖(clone)入 pRK415 的載體中，(不包含啟動子的質體之後實驗時，須加 IPTG 以誘導表現)，建構完成的質體會由 *E.coli* S17-1 λ *pir* 以 conjugation 的方式送入 KP CG43，再以 M9 tetracycline(5 μ g/ml)固態洋菜膠培養基進行篩選，所得菌落再以 streptomycin(500 μ g/ml)及 tetracycline(5 μ g/ml)固態 LB 洋菜膠培養基進行篩選，則會得到同時抗 tetracycline 及抗 streptomycin 型的菌落，即為所求質體回補菌落。其中，pRK415-stk 和 pRK415-kpnK 位分別代表包含及不包含啟動子(promoter)的 KpnK 質體型回補。

2.2.2 定點突變體(Site-directed mutagenesis)

定點突變以 yT&A-HY5 為板模，並以 Thermo scientific Inc.的 Phusion High-Fidelity DNA Polymerase kit 分別製作了 S36A、D201A、D217A、T325A，實驗流程皆參考操作手冊(Thermo scientific Inc.)。再以 *Bam*HI、*Sac*I(選購自 MBI Fermentas)酵素切下，並與 pETQ31 相接。實驗所需之核酸引子，皆由 MDBio, Inc. (Taiwan)及 IDT, Inc. (Taiwan)所合成。建構的所有質體詳列於表一及表二。

2.3 生長曲線測量

菌株在 LB 中培養 16 小時(overnight)，將 20 μ l 的菌液以 200 倍稀釋加入 4 ml 的 LB 中，並以 37°C、搖動培養，在特定時間點記錄 OD₆₀₀ 的吸光值以得到生長曲線圖。呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

2.4 莢膜多醣體的低速離心定性分析

菌株在 LB 中培養 16 小時(overnight)，再以 5000 rpm，3 分鐘低速離心，並將結果以照相呈現。

2.5 巴拉刈(paraquat)及過氧化氫(H₂O₂)的氧化壓力能力評估

2.5.1 生存率測試

細菌在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，以 40 倍稀釋至 LB，在培養至 OD₆₀₀

約 0.6~0.8 左右，取 1 ml 菌液至微量離心管，以 15000 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，再加入 1 ml 濃度為 3 mM 的巴拉刈(paraquat, PQ)或 10 mM 的 H₂O₂，培養 40 分鐘後，取出 100 μl 菌液系列稀釋至 10⁻⁶ 倍後，均勻塗抹在 LB 固態培養基上，於 37°C 培養 16 小時後，數菌落數。存活率是根據實驗組每 1 ml 所存活的菌數，與未加入 3 mM 的 PQ 或 10 mM 的 H₂O₂ 的控制組，每 1 ml 的菌數比值；每次獨立實驗，以三重複數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

2.5.2 紙錠分析(Disc diffusion assay)

細菌在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，稀釋 40 倍至 LB 液中培養至 OD₆₀₀ 約 0.3~0.4 左右，接著用無菌棉花棒沾取菌液均勻塗抹在 LB 培養基上，接著以無菌鑷子將紙錠置入培養基中央，再吸取 5 μl 20 mM PQ 或 50 mM H₂O₂ 至紙錠上於 37°C 正置培養隔夜。

2.6 酸性環境壓力生存率測定

細菌在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，以 20 倍稀釋至 LB，在培養至 OD₆₀₀ 約 0.6~0.7 左右，取 1 ml 菌液至微量離心管，以 15000 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，再加入 1 ml、pH4.4 的 LB 培養液培養 1 小時，使細菌在酸性環境處理前，有一段時間適應。之後，以 15000 rpm 離心 5 分鐘後去掉上清液，再加入 1 ml、pH3.0 的 M9 培養液培養 45 分鐘後，立即取出 100 μl 菌液系列稀釋至 10⁻⁶ 倍後，均勻塗抹在 LB 固態培養基上，於 37°C 培養 16 小時後，數菌落數。存活率是根據實驗組每 1 ml、處理 pH3.0 的 M9 培養液所存活的菌數，與僅加入 1 ml、pH4.4 的 LB 的控制組，菌數的比值；每次獨立實驗，以三重複數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

2.7 西方墨點法(Western Blot analysis)

細菌在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，取 1 ml 菌液 15000 rpm、離心 5 分

鐘後，去掉上清液，再以 200 μ l 二次水回溶，並以 95°C、10 分鐘加熱破菌。測定濃度後，將蛋白依等比例混合蛋白質染劑(0.0626 M Tris-HCl pH6.8、2% SDS、10% glycerol、0.01% bromophenol blue 以及 100 mM dithiothreitol)，再以 95°C 加熱 10 分鐘，取適量蛋白質(10 μ g/lane)加入 13.5% SDS-PAGE 電泳分離蛋白(80V~100V)。蛋白質經過電泳分離後，將膠上之蛋白質轉漬(400 mA、60 分鐘)於聚偏二氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride, PVDF; Millipore, Billerica, MA, USA)上，再以溶於 1X TBS(Tris-buffered saline; pH 7.4)的 5% 脫脂奶粉 4°C 處理隔夜，遂以 1X TBS 洗去殘留於膜上的脫脂牛奶。接著，加入一級抗體、室溫 2 小時作用，以 1X TBS 洗去殘留於膜上非專一性的一級抗體訊號，再以二級抗體(alkaline phosphatase- conjugated anti rabbit immunoglobulin G)在室溫下處理 1 小時，以 1X TBS 洗去殘留於膜上非專一性的二級抗體訊號。隨後，加入鹼性磷酸酶緩衝液(alkaline phosphatase buffer)、呈色劑 BCIP(5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate)、NBT(nitro blue tetrazolium chloride)避光呈色。

2.8 蛋白質高量表現之質體建構

高量表現之質體的引子設計，詳列於表三。將欲高量表現蛋白質的編碼區(coding regions) DNA 片段，以 PCR 增幅後，皆入 yT&A 選殖載體中，再轉殖至蛋白質表現載體 pETQ31 中，使欲表達蛋白質之 DNA 片段與 pETQ31 黏合，將質體送入 KpCG43 中，再藉由 0.5 mM 異丙基- β -D-硫代半乳糖苷(Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, IPTG)誘導，大量表達欲取得之蛋白質。

2.9 蛋白質大量誘導

將帶有欲表達片段的菌株以 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，以 40 倍稀釋至含有 kanamycin 的 LB 培養液中，培養至 OD₆₀₀ 約 0.5~0.6 時，加入 0.5 mM IPTG 誘導目標基因，表現 5 小時後，誘導的細菌以 15000 rpm、3 分鐘離心，去除上清液後，回溶於二次水中。接著以超音波震盪破菌，收集之蛋白質以 13.5%

SDS-PAGE 電泳分離蛋白並確認。

2.10 Pro-Q diamond 染色分析蛋白質的磷酸化

將絲胺酸/蘇胺酸磷酸化激酶(Ser/ Thr Kinase)與欲磷酸化之目標蛋白混合，並加入緩衝溶液(10 mM ATP、25 mM Tris-HCl、1 mM DTT、5 mM MgCl₂、1 mM EDTA、pH7.0)中，於 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘，隨後以 95°C 加熱 10 分鐘終止反應，以 13.5% SDS-PAGE 電泳將蛋白分離。將電泳後的膠，以 Fix buffer(50% 甲醇、10% 乙酸)固定蛋白 30 分鐘、重複兩次，以二次水洗淨膠上殘餘的甲醇及乙酸，隨後以 Pro-Q Diamond 染劑(Invitrogen)染膠 90 分鐘，再用 Destain buffer(Invitrogen)退染三次、每次 30 分鐘，最後以二次水洗淨，並以 UV 光照影。實驗流程皆參考操作手冊(Invitrogen, Pro-Q Diamond phosphoprotein gel stain)。

2.11 酵母菌凝集測試(Yeast Agglutination)

實驗相關流程參考文獻(Blumer *et al.*, 2005)。細菌在 LB 培養液 37°C 隔夜培養後，將 1 ml 菌液以 15000 rpm、2 分鐘離心並去除上清液後，分別以 saline (0.85% NaCl)或(溶於 saline 的)5 % D- mannose 回溶，再將此對照組及實驗組混著 1%之酵母菌(Sigma-Aldrich)於 24 孔盤、反應 5 分鐘，並在室溫下於 100 rpm 的震動儀(shaker)上晃動，並觀察其結果。

2.12 啟動子(Promoter)分析

2.12.1 啟動子報告載體建構

將預測的啟動子片段或截短片段，以 PCR 增幅後，接入 yT&A 選殖載體中，再轉殖至啟動子報導質體 placZ15 中，使啟動子片段與 lacZ 報導基因結合，將此質體以電菌方式送入 Kp Δ lacZ 菌株中，再藉由 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)活性評估報告啟動子的活性。

2.12.2 啟動子活性分析

根據 Miller 方法(Miller, 1972)，細菌在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，將菌液 40 倍稀釋至含有抗生素的 LB 培養液中，37°C 培養至 OD₆₀₀ 約 0.8~1.0 時，取 100 μ l 菌液於試管中，並混以 900 μ l 之 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -mercaptoethanol)、17 μ l 之 0.1% SDS、及 35 μ l 之氯仿(Chloroform)，並混合均勻。在 30°C 水浴槽中反應 10 分鐘後，加入 200 μ l 的 4 mg/ml ONPG(ortho-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside)(Sigma-Aldrich)，直到反應液呈現黃色，以 500 μ l 之 1M Na₂CO₃ 終止反應，記錄每個反應株 OD₄₂₀ 的數值，並以 Miller unit [1 Miller unit = 1000* OD₄₂₀/(t * v * OD₆₀₀)；OD₄₂₀ 為加入 ONPG 反應呈黃色後的吸光值； t =反應時間(min)； v =加入反應的體積(ml)；OD₆₀₀=未反應前菌液的吸光值]換算出 β -半乳糖苷酶活性。每次獨立實驗，以三重複數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中，較具代表性的一次。

2.13 生物膜染色分析

細菌在 LB 培養液中培養 16 小時後，以 200 倍稀釋至 4 ml LB 中，於玻璃管或加 150 μ l 稀釋菌液於塑膠 96 孔盤中，在 37°C 靜置或 50 rpm 搖晃培養 24 或 48 小時，小心去除菌液後，以一次水清洗兩次，再分別加入 4 ml 或 180 μ l 1% 結晶紫於玻璃管或塑膠 96 孔盤中，分別以(玻璃管中)靜置或(96 孔盤中)60 rpm 染色處理(玻璃管中)15 或(96 孔盤中)50 分鐘，以一次水清洗黏附不專一的結晶紫 3 次，96 孔盤再以 95%、180 μ l 乙醇溶解結晶紫，並以 ELISA reader 定量。每次獨立實驗，以五重複數據換算出平均值及標準差，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。

2.14 剛果紅(Congo red)及鈣螢光(Calcofluor)表現型分析

配置包含 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ brilliant blue、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剛果紅(Congo red)的(不含 NaCl)LB 固態培養基，及包含 4 mg/L glucose、1mM HEPES、20 $\mu\text{g}/\text{L}$ 鈣螢光(calcofluor)的 LB 固態培養基，將 37°C 培養 16 小時的菌液，各以 10 μl 一次 3 重複滴於剛果紅固態培養基上，在 28°C 培養 48 小時、並於 37°C 再培養 24 小時，以觀察菌落現象。將 37°C 培養 16 小時的菌液，以接菌環塗佈於鈣螢光固態培養基上，37°C 避光培養 16 小時後，利用黑燈管照射，以觀察是否有螢光顯現。呈現的數據為三次獨立實驗中，較具代表性的一次。

2.15 數據分析

氧化壓力或酸性環境生存率測定、啟動子活性分析以及生物膜染色定量分析，皆為每次獨立實驗，以至少三重複數據換算出平均值及標準差(standard deviation, SD)，呈現的數據為三次獨立實驗中具代表性的一次。數據以平均值 \pm 標準差呈現，群組間的差異以雙尾(two tailed)的 Student's *t*-test 計算，*P*-value 小於 0.05 具統計差異。

第三章 實驗結果

3.1 *K. pneumoniae* CG43S3 $\Delta kpnK_1$ 的 CPS 生合成

前人研究(萬舉豪, 2012)指出, CG43S3 $\Delta manB$ 在 4000 rpm 低速離心 5 分鐘後, 比 CG43S3 更容易沉降, 顯示 *manB* 基因缺失會降低 CPS 的生合成(附錄一 A、B)。若將影響 CPS 前驅物合成的酵素 ManB 之活化位 Ser98 突變成 Alanine, 藉由 Pro-Q Diamond assay 證明, ManB 會失去磷酸化訊號(附錄一 B), 且可能因其酵素活性降低而影響 CPS 的生成(萬舉豪, 2012)。如圖一 A、B 所示, 前人建構的 *kpnK* 基因缺損突變株 *kpnK_1*, 比其親本株 CG43S3 更容易以低速離心沉降下來, 此暗示 $\Delta kpnK_1$ 會影響 CPS 的生合成, 但在質體回補株 $\Delta kpnK_1$ [pRK415-*kpnK*] 卻無法恢復其 CPS 的生成。

3.2 *kpnK* 下游基因 *dsbA* 缺失對 CPS 生合成的影響

為了確認此核酸片段移除, 是否影響下游基因 *dsbA* 的啟動子(圖二A)而造成 polar effect, 進而降低 CPS 的生合成, 於是分別建構突變株 $\Delta dsbA$ 及 $\Delta kpnK \Delta dsbA$, 如圖二B、圖二C, 分別將 577-bp 的 *dsbA* 或 2021-bp 的 *kpnK* 與 *dsbA* 移除後, 以引子對 HY20F/HY21R 及 HY18F/HY21R 進行聚合酶連鎖反應確認, 再將突變菌株隔夜培養後, 以 4000 rpm 低速離心 3 分鐘, 結果發現當 $\Delta kpnK_1$ 沉降時, $\Delta dsbA$ 及 $\Delta kpnK \Delta dsbA$ 仍呈現與 CG43S3 相同懸浮的狀態, 顯示 $\Delta kpnK_1$ 降低了 CPS 的生成, 並非因為破壞 *dsbA* 所導致; 而此結果暗示 $\Delta kpnK_1$ 突變株可能在 *kpnK* 基因外發生二次突變而影響 CPS 表現。

3.3 CG43S3 $\Delta kpnK$ 基因缺損株的建構與其生長曲線分析

如圖三 A, 為了排除前項因素, 我重新設計了另一個不破壞 *dsbA* 啟動子的 *kpnK* 基因缺損突變體及回補株, 分別以引子對 HY18F/HY18R 及 HY19F/HY19R 進行鏈狀聚合反應, 產生 504-bp 及 837-bp 的 A、B 片段, 並利用 pKAS46 自殺

性載體承載此 A、B 兩片段，藉兩次同源互換剔除 711-bp 的目標基因後，如圖三 B，以引子對 HY18F/HY19R 進行鏈聚合酶連鎖反應確認 *kpnK* 的缺失；如圖三 C，以引子對 HY18F/HY19R 進行鏈狀聚合酶反應確認 *kpnK* 回補株。進一步，透過生長曲線量測結果顯示，不論是在 LB(圖四 A)或是 M9(圖四 B)震盪培養的條件下，*kpnK* 基因的缺失對其生長都沒有明顯影響。

3.4 *kpnK* 基因缺損突變株中 ManB 的磷酸化

圖五 A 將新建構的 $\Delta kpnK$ 及 $\Delta kpnK::kpnK$ 以 4000 rpm 離心 3 分鐘後仍呈懸浮狀態，此暗示 *kpnK* 基因缺失並不影響 CPS 的生成；圖五 B 顯示，相對於 CG43S3[pETQ33-ManB]，CG43S3[pETQ33-ManB-S98A] 中 ManB 位置的磷酸化訊號會消失，暗示 ManB 受一 STK 所調控，然而 $\Delta kpnK$ [pETQ33-ManB] 仍保有 ManB 相對位置的磷酸化訊號，此結果顯示 ManB-S98 磷酸化與 KpnK 可能無關。

3.5 *kpnK* 基因缺損株的抗氧化能力分析

根據文獻指出在 KPMGH78578 中，當 KpnK 受外界環境壓力刺激後，會影響細菌的抗氧化能力 (Srinivasan *et al.*, 2012)。如圖六 A 所示，將 CG43S3、 $\Delta kpnK$ 及其基因回補株處理 5 mM 的過氧化氫，生存率皆分佈於 75% ~80% 間，並無明顯差異；而圖六 B 指出，在 3 mM paraquate 處理後，CG43S3 和 $\Delta kpnK$ 的生存率分別為 94% 和 64%，且在 $\Delta kpnK::kpnK$ 中也恢復到 84% 的生存率，說明 $\Delta kpnK$ 對 paraquate 的氧化壓力有敏感性，但對 H₂O₂ 則無差異。

3.6 以 LacZ 報導系統探討 CpxAR 對 *kpnK* 基因的調控

在大腸桿菌及 Kp MGH78578 中被報導，*kpnK* 會被具有感受外界壓力的雙分子調控系統 CpxAR 所影響 (Suntharalingam *et al.*, 2003; Srinivasan *et al.*, 2012)。於是，將 KPCG43S3 的 *kpnK* 基因上游非轉譯區進行分析，如圖七 A 所示，在啟

動子區域含有與 CpxR 鍵結區 GTAAAX₄₋₈GTAAA 極度相似的序列 GTAAAAGGTTGTAAG，定義為可能的 CpxR 鍵結位，於是分別將包含 CpxR 鍵結區的 P1(216 bp)及不包含 CpxR 鍵結區的 P2(102 bp)片段(圖七 B)與 LacZ 報導基因結合，再以接合作用轉殖入 KPCG43S3 Δ lacZ 及 KPCG43S3 Δ lacZ Δ cpxR 菌株中，分析其 β -半乳糖苷酶活性。圖七 C 顯示，失去 CpxR 鍵結區的 P2 活性低於 P1 啟動子；而 P1 啟動子活性在 Δ lacZ Δ cpxR 中的活性也明顯低於 Δ lacZ，暗示 *kpnK* 的表現會受 CpxR 的正向調控。

3.7 *kpnK* 基因缺損株的抗酸能力

由於 CpxAR 會受諸多的胞外環境壓力，包含：酸鹼度、氧化還原壓力、化學分子、外膜酯蛋白或膜間質(periplasm)中摺疊錯誤的蛋白所造成的壓力所影響 (Keller and Hunke, 2009; Nakayama and Watanabe, 1995; Snyder *et al.*, 1995)，圖七顯示 KpnK 可能是 CpxAR 調控網路之一員，因此進一步探討 KpnK 和抗酸能力之相關性。如圖八 A 所示，將 OD₆₀₀ 為 0.7-0.8 間對數生長期(log phase)的細菌培養於 pH4.4 LB 培養液中適應 60 分鐘後放入 pH3.0 M9 培養液中 45 分鐘，再將培養菌液後系列稀釋後塗盤分析，由 10⁻⁵ 菌落比較發現經酸處理過後，CG43S3 和 Δ *kpnK* 及其基因回補株的菌落數差異不大；且由圖八 B 定量菌數顯示，在 CG43S3、 Δ *kpnK* 及其基因回補株的生存率分布為 60%~70%間，並沒有因酸處理後而有明顯差異。

3.8 *kpnK* 缺損突變株凝集酵母菌的活性分析

在 *E. coli* 中，CpxAR 會影響線毛的表現，也會正向調控 YdeH，進而抑制細菌的移動及促進生物膜(biofilm)的生合成(Stefanie *et al.*, 2011)。圖七 B 顯示 CpxAR 在 KPCG43 中正向調控 KpnK 表現，於是，先以酵母菌凝集試驗分析 *kpnK* 基因剔除對第一型線毛表現的影響。如圖九於 24 孔盤中，將回溶於 0.85% 生理食鹽水的細菌分別在有或無添加 5% 甘露糖後，加入 1% 之酵母菌，反應結果發

現在不表現第一型線毛的親本株 CG43S3 沒有酵母菌凝集反應發生；而 $\Delta kpnK$ 出現很明顯凝集酵母菌的能力，且此凝集現象會受甘露糖競爭而散去，而 $\Delta kpnK::kpnK$ 失去凝集酵母菌的能力，這結果顯示 KpnK 具有負向影響細菌表現第一型線毛的能力。

3.9 *kpnK* 基因缺失增加第一型線毛單位蛋白 FimA 的生成

為了探討 KpnK 負向影響第一型線毛單位蛋白 FimA 的表現，如圖十 A 以 FimA 抗體偵測的西方點墨結果得知，*kpnK* 缺失後 FimA 的表現量會明顯增加，進一步分析 FimA 啟動子活性發現 *kpnK* 的缺失也會提高 *fimA* 啟動子活性(圖十 B)，此結果顯示 KpnK 可能透過磷酸化修飾直接或間接影響 FimA 表現。而有關 KP NTUH-K2044 的磷酸化蛋白質體(phosphoproteome)報導指出 FimA 在 Ser、Thr、Tyr 或 Asp 的殘基上會被磷酸化(Lin *et al.*, 2009, 附錄二)，而比對 KPCG43 及 KP NTUH-K2044 的 FimA 胺基酸序列發現 T68、T72、S73 及 S74 為可能被磷酸化的殘基均被保留(圖十 C)，FimA 是否被 KpnK 磷酸化還待進一步查證。

3.10 *kpnK* 基因缺失對第三型線毛表現及生物膜形成能力的影響

第一型及第三型線毛是 KP 最常被報導的胞外膜黏附因子，為探討 KpnK 對第三型線毛表現的影響，圖十一以西方點墨法分析在 *kpnK* 基因缺損後 MrkA 的表現量，發現並無明顯差異。有關克雷白氏肺炎桿菌的研究均指出第三型線毛的表達與其生物膜的形成有重要的關聯性(Boddicker *et al.*, 2006；Burmolle *et al.*, 2008；Di Martino *et al.*, 2003；Langstraat *et al.*, 2001)，如圖十二所示，將隔夜培養之菌液以 200 倍稀釋，培養 24 小時後並以 1% 結晶紫染色觀察及定量其生物膜的形成，結果發現分別以靜置(圖十二 A)或是搖晃(圖十二 B)培養，不論是在玻璃管或 96 塑膠孔盤中，CG43S3 及 $\Delta kpnK$ 形成的生物膜皆無明顯差異。

3.11 *kpnK* 基因缺損株的 EPS 表現

不同的胞外聚合基質(extracellular polymeric substance, EPS)也是決定生物膜形成的重要因子，在革蘭氏陰性菌中，其組成主要包含纖維素(cellulose)、蛋白質、核苷酸和酯質。圖十三分別以 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剛果紅(Congo red)及 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 鈣螢光(calcofluor)固態培養基觀察細菌 EPS 的分泌情形，當剛果紅染劑和 EPS 鍵結時，會產生紅色菌落，反之為白色菌落；圖十三 A 中，CG43S3、 $\Delta kpnK$ 及其基因回補株的 EPS 表現均呈粉色，相對於 $\Delta cpxAR$ 的紅色菌落，均無纖維素的產生；進一步以對纖維素辨識較專一的鈣螢光固態培養基培養檢測，當纖維素產生時，利用波長 360nm 的黑燈管照射鈣螢光固態培養基，會有螢光顯現。如圖十三 B，除了 $\Delta cpxAR$ 外，其他菌株都沒有產生螢光反應，因此推測 KpnK 對纖維素的生成沒有影響。

3.12 KpnK 定點突變質體的選殖與建構

為確認 KpnK 具有激酶活性，由於先前報導指出，*E. coli* YihE 在 S36、H199、D201、D217 殘基位置變化會影響其酵素活性(Zheng *et al.*, 2007)。如圖十四，KpnK 和 YihE 胺基酸序列以 Vector NTI 軟體進行比對，結果發現兩者有高達 80% 的相似度，且在這四個活性殘基均被保留。因此，建構 S36A、D201A、D217A 的 KpnK 突變株，並以 pETQ31 為表現載體(圖十五 A)，選殖鏈聚合酶連鎖反應的產物(圖十五 B)，並以定序方式確認 S36、D201 及 D217 皆成功突變成 alanine(圖十五 C)。

3.13 KpnK 定點突變對其酵素活性的影響

接著，在細菌中以 IPTG 將這些單點突變的蛋白高量表現，並利用會標示出 Ser/ Thr/ Tyr 被磷酸化的磷酸根染劑 Pro-Q Diamond 來分析 KpnK 激酶活性。結果顯示，不論是在 CG43S3(圖十六 A)或 $\Delta kpnK$ (圖十六 B)中，pETQ31-KpnK-S36A、-D201A 及 -D217A 相對於 pETQ31-KpnK，磷酸化現象皆無

變化，暗示著單一活性殘基突變可能不會明顯降低其活性，需幾個活性位點同時變化才能影響 KpnK 的激酶活性；另一方面，雖然這些點突變使 KpnK 活性降低，但因為高量表現的結果而無法偵測出其缺失；當然，也無法排除受其他未知激酶磷酸化的可能性。

3.14 在 CG43S3 中測試 N-及 C-KpnK 的磷酸化

由於 KpnK 的受質未知，而其自我磷酸化的特性曾被報導，為了證實 KpnK 可以本身為受質，首先將可轉譯 *kpnK* 的 N(766-bp)及 C(241-bp)端的鏈聚合酶連鎖反應產物分別轉殖至 pETQ31 載體(圖十七 A)，再將這些重組質體分別轉型入 Kp CG43S3 中以 IPTG 誘導蛋白大量表現後，在有無 ATP 的添加處理後，以電泳膠體展開抽取的總蛋白，分別以 Coomassie Blue 及 Pro-Q Diamond 染色。圖十七 B 顯示，在未加入 ATP 時，pETQ31-KpnK 和 pETQ31-N-KpnK 即會被磷酸化，暗示 KpnK 具有自我磷酸化活性或二者皆可受未知激酶磷酸化，圖十七 C 也顯示，pETQ31-C-KpnK 片段蛋白有磷酸化現象，而且，無論 N-KpnK 或 C-KpnK 的磷酸化訊號與是否加入 KpnK 相似。

3.15 N-KpnK 及 C-KpnK 在 *kpnK* 缺失突變株中激酶活性的探討

為了避免 CG43S3 中內在 KpnK 的活性干擾並探討未知激酶磷酸化 KpnK 的可能性，將上述質體在 $\Delta kpnK$ 中以 IPTG 誘導蛋白大量表現後(圖十八 A、B)，分別以有無 ATP 處理，藉由電泳膠體展開抽取的總蛋白後，分別以 Coomassie Blue 及 Pro-Q Diamond 染色。圖十八 A 中顯示，在未加入 ATP 時，pETQ31-KpnK 及 pETQ31-N-KpnK 即會被磷酸化，暗示未知激酶參與磷酸化的可能性；圖十八 B 也顯示，pETQ31-C-KpnK 蛋白會受未知激酶磷酸化。

3.16 在 KPCG43 基因體中有多套 STK 基因

為了瞭解未知激酶參與磷酸化的可能性，分析 NCBI 網站註解的 KPCG43 基

因體發現，如圖十九所示，除了 KpnK 外尚有 3 套被註解為 STK 的基因，分別為 D364_08540、D364_11195、D364_12490，然而，除了 KpnK 已有少數文獻報導外，其他 3 套目前並無相關研究，有關特性尚待探討。



第四章 討論

細菌的磷酸化調控路徑中，以雙分子系統最常被報導。但近幾十年間，Ser/Thr 的磷酸化激酶也在原核生物中被發現，和能量代謝、碳原子降解、胺基酸及核苷酸的合成、蛋白質運輸以及孢子的形成有關(Li, *et al.*, 2001)，雖然 STK 在真核細胞中已有許多研究，但在原核細菌中的相關研究仍偏少。細菌中，包含原核型及類真核型的 STK，在 KpCG43 中發現了 KpnK，由於不具完整特定的 ESTK 胺基酸序列，KpnK 為一非典型的 ESTK。

前人研究指出，負責催化 CPS 前驅物的酵素 ManB，在 Ser98 位置會被未知的激酶磷酸化以影響其酵素活性(萬舉豪, 2012; 附錄一)。然而，無法以質體回補其建構的 *kpnK_1* 基因缺損株的 CPS 表現(圖一)。在 *S. typhimurium* 中，*yihE-dsbA* 只會個別轉錄(Suntharalingam *et al.*, 2003)，但 *E. coli yihE-dsbA* 為一基因組(operon)。且 DsbA 在膜間質(periplasm)具有摺疊錯誤蛋白的能力，因此，推測 DsbA 的缺損可能會增加膜間質壓力，進而造成 CPS 或細菌其他莢膜構造的改变；為了避免因建構時影響下游基因 *dsbA* 的表現而間接降低 CPS 的生成，因而重新建構 $\Delta dsbA$ 及 $\Delta kpnK_1 \Delta dsbA$ 突變菌株，但結果顯示 $\Delta kpnK_1$ 降低 CPS 的生成，並非因為破壞 *dsbA* 表現所致。而重新建構不破壞 *dsbA* 啟動子的 *kpnK* 基因缺失突變株，其 CPS 生成和親本株 CG43S3 相似，且 ManB 磷酸化的現象也沒有因 *kpnK* 的缺失而消失，此結果表示 KpnK 不具磷酸化 ManB-S98 的能力，也驗證不具影響 CPS 生成的能力。

KpnK 與 YihE 序列相似度達 80%，而 KP CG43 和 KP MGH78578、Kp 342 及 NTUH-K2044 的 KpnK 序列也分別有高達 99%、99% 及 80% 的序列相似度，且其 gene organization 也一樣。有趣的是，KPCG43S3 $\Delta kpnK$ 對 H₂O₂ 不似 MGH78578 $\Delta kpnK$ 敏感(Srinivasan *et al.*, 2012)，可能因為菌株間的差異而造成對抗 H₂O₂ 的能力不同；但在處理 3 mM PQ 後，CG43S3 $\Delta kpnK$ 生存率會降低(圖六 B)，顯示其 *kpnK* 的缺失影響其不同形式之氧化自由基的敏感性。

由於在大腸桿菌及 Kp MGH78578 中均報導此 STK 基因會被具有感受外界壓力的 CpxAR 雙分子系統所調控(Suntharalingam *et al.*, 2003 ; Srinivasan *et al.*, 2012)，而且在 *kpnK* 啟動子的序列分析中可以發現典型的 CpxR binding box，利用 LacZ 報導質體分析結果顯示 *kpnK* 表現受 CpxR 正向調控(圖七 C)。由於 CpxAR 會受諸多的胞外環境壓力，包含酸鹼度壓力，但 CG43S3Δ*kpnK* 對酸的敏感度與 CG43S3 並無明顯差異。

大腸桿菌 CpxAR 會影響線毛的表現，且沙門氏菌中，KpnK 的同源體 RdoA 會影響纖毛(curli)的生成(Richards., 2006; Zheng *et al.*, 2007)。而實驗結果指出 *kpnK* 的第一型線毛單位蛋白 FimA 表現和凝聚酵母菌的活性均明顯增加，啟動子活性分析顯示 *kpnK* 剔除會增加 *fimA* 啟動子活性，但由於 KpnK 為一激酶並非轉錄因子，因此推測可能是透過磷酸化一未知的轉錄因子，進而影響 *fimA* 的啟動子活性。在 *E. coli* 中，*fimA* 的啟動子會受重組酶 *fimB* 或 *fimE* 間接影響，造成啟動子 Phase-ON 及 Phase-OFF 向位的轉換，進而調控 *fim* 操縱子的轉錄：當只有 FimB 坐落於 *fimA* 啟動子區域時，Phase-ON 及 Phase-OFF 的情況都會發生 (McClain *et al.*, 1991)；但當 FimB、FimE 同時坐落此區域時，主要會使得 *fimA* 啟動子由 Phase-ON 轉換成 Phase-OFF，僅有極少數情況使得 Phase-OFF 轉換成 Phase-ON (Stentebjerg-Olesen *et al.*, 2000)。除此之外，也有直接調控 *fimA* 啟動子向位的轉錄因子。H-NS (heat-stable nucleoid-structuring) 具有直接鍵結 *fimA* 啟動子片段，抑制 *fimA* 轉錄的能力 (Donato *et al.*, 1999; Schembri *et al.*, 1998)；或具有抑制 *fimB* 和 *fimE* 的轉錄，間接影響 *fimA* 向位轉換的能力 (Olsen *et al.*, 1994; Olsen *et al.*, 1998; Schwan *et al.*, 2002)；或是 H-NS 也會抑制 *lrp* (leucine-responsive regulatory protein) 使得 *lrp* 無法讓 *fimA* 啟動子處於 Phase-ON 狀態 (Oshima *et al.*, 1995; William, 2013)。且被磷酸化修飾的 H-NS 被發現會影響其鍵結 DNA 的能力 (Arold *et al.*, 2010)，雖然 H-NS 目前被發現只在 Tyr 的殘基上被磷酸化，但已有文獻指出，有些 STK 可能會對 Tyr 的位置進行磷酸化修飾 (Ubersax *et al.*, 2007)，因此推測 KpnK 可能透過磷酸化 H-NS 的 Tyr 或其他未知的 Ser/Thr 活化位，而

影響 *fimA* 的啟動子活性(圖二十 B)。有趣的是，KP NTUH-K2044 解出的磷酸蛋白質體分析發現 FimA 及 FimD 會在特定的 Ser/Thr/Tyr/Asp 被磷酸化(Lin *et al.*, 2009)，而這些胺基酸的磷酸化是否與 KpnK 激酶活性相關尚待探討。

此外，在 *K. pneumoniae* CG43 中，MrkI 會因為將 D56 的位置突變成丙胺酸(alanine)而降低第三型線毛的表現量，其可能原因是 MrkI 藉由調控 FimB 及 FimE 重組酶的表現，使 *fimA* 啟動子由 Phase-OFF 轉換成 Phase-ON，而 MrkI 在天門冬胺酸(aspartate)的磷酸化狀態可能影響其鍵結 *fimA* 啟動子的能力(吳健誠，2010)，因此，KpnK 不是磷酸化 MrkI D56 的激酶；然而，我們也不能排除 KpnK 磷酸化 MrkI 的 Ser 或 Thr 殘基位置而影響第一型線毛的表現(圖二十 B)，但其相關性仍待探討。

生物膜主要由纖維素、多種菌毛及各種不同的胞外聚合基質(extracellular polymeric substances, EPS)組成。Congo red(CR)用以觀察纖毛(curli)及纖維素的表現，而 Calcofluor(CF)會和(1-3)- β -或(1-4)- β -D-glucopyranosides 類的纖維素、chitin 和 succinoglycans 結合(Weiner *et al.*, 1994; Da Re *et al.*, 2006)。在沙門氏菌中，CF 只會和基因組 *bcsABZC* 及 *bcsEFG* 所產生之纖維素產物結合(Solano *et al.*, 2002; Zogaj *et al.*, 2001)。然而，無論 CR 或 CF 分析皆沒能偵測 KpnK 基因缺失對纖維素合成的影響，此與 KpnK 基因缺失對生物膜合成沒有明顯影響的結果交互應證。

經 Vector NTI 軟體比對發現 KpnK 保有酵素活性位置 S36、H199、D201、D217，定點突變結果顯示，KpnK-S36A、-D201A 及 -D217A 單一突變可能仍具有相當程度的激酶活性，因而在 Pro-Q Diamond 染色後，偵辦不出定點突變的影響，未來可以雙或三定點突變株的建構分析來證實此可能性。除此之外，在 *kpnK* 的菌株中，KpnK 截短蛋白 N-KpnK 及 C-KpnK 仍有被磷酸化的現象，這個結果暗示其他未知激酶的影響，而在 CG43 中另外 3 套 STK 是否參與這兩個截短蛋白及 ManB serine 98 的磷酸化，還有待進一步的研究探討。

本研究指出 *K. pneumoniae* CG43 的 *kpnK* 在轉錄過程中會受 CpxR 正向調控

(圖二十 A)；下游會抑制細菌的抗氧化能力及第一型線毛的表現(圖二十 B)，而第一型線毛主要是引起尿道感染的主要原因之一，因此仍須經由動物試驗證實 KpnK 與尿道感染具有直接關聯性。除此之外，未來可設計針對 KpnK 的標的藥物或是以 $\Delta kpnK$ 菌株誘導而產生的疫苗，以降低細菌所造成的尿道感染。



第五章 參考文獻

1. 彭冠男(2013)。克雷白氏肺炎桿菌CG43中RcsFCDB訊息傳遞所扮演的角色。未出版碩士論文，生物科技所，國立交通大學，新竹市。
2. 樊力成(2012)。YfdX在克雷白氏肺炎桿菌CG43抗酸反應中所扮演的角色。未出版碩士論文，生物科技所，國立交通大學，新竹市。
3. 林芳瑜(2013)。克雷白氏肺炎桿菌CG43全基因體解序、抗酸轉錄體分析與尿素酶基因群功能探討。未出版碩士論文，分子醫學研究所，國立清華大學，新竹市。
4. 林志桓(2009)。RcsB蛋白質在克雷白氏肺炎桿菌CG43中抗酸能力所扮演的角色。未出版碩士論文，生物醫學所，國立交通大學，新竹市。
5. 黃靜柔(2013)。克雷白氏肺炎桿菌CG43磷酸二酯酶YjcC與二級訊息分子c-di-GMP在壓力調控之功能性研究。未出版博士論文，分子醫學及生物工程所，國立交通大學，新竹市。
6. 鄭燕曦(2013)。雙分子系統反應調節因子RcsB在克雷白氏肺炎桿菌CG43中所扮演的角色。未出版碩士論文，分子醫學及生物工程所，國立交通大學，新竹市。
7. 鄭威芸(2011)。克雷白氏肺炎桿菌CG43中MrkH、MrkI、MrkJ和CsgD在調控第一型與第三型線毛表現所扮演的角色。未出版碩士論文，生物科技所，國立交通大學，新竹市。
8. 曾品瑄(2011)。HdeB、HdeB1、HdeD蛋白質參與克雷白氏肺炎桿菌CG43抗酸反應的探討。未出版碩士論文，生物醫學所，國立交通大學，新竹市。
9. 吳宛怡(2012)。克雷白氏肺炎桿菌CG43抗氧化逆境反應的研究-超氧化歧化酶SodA的表現調控。未出版碩士論文，生物科技所，國立交通大學，新竹市。
10. 吳健誠(2010)。克雷白氏肺炎桿菌線毛的分布與表現。未出版博士論文，生物科技學系，國立交通大學，新竹市。

11. 萬舉豪(2012)。克雷白氏肺炎桿菌CG43中磷酸甘露糖異構酶磷酸化的特性探討。未出版碩士論文，生物科技所，國立交通大學，新竹市。
12. Arold, S. T., Leonard, P. G., Parkinson, G. N., & Ladbury, J. E. (2010). H-NS forms a superhelical protein scaffold for DNA condensation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(36), 15728-15732. doi: 10.1073/pnas.1006966107
13. Bakal, C. J., & Davies, J. E. (2000). No longer an exclusive club: eukaryotic signalling domains in bacteria. *Trends Cell Biol*, *10*(1), 32-38.
14. Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., Michaelis, K., Emody, L., Polen, T., Rachel, R., Wendisch, V. F., Uden, G. (2005). Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology*, *151*(Pt 10), 3287-3298. doi: 10.1099/mic.0.28098-0
15. Boddicker, J. D., Anderson, R. A., Jagnow, J., & Clegg, S. (2006). Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material. *Infect Immun*, *74*(8), 4590-4597. doi: 10.1128/IAI.00129-06
16. Boot, I. R., Cash, P., & O'Byrne, C. (2002). Sensing and adapting to acid stress. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *81*(1-4), 33-42.
17. Burmolle, M., Bahl, M. I., Jensen, L. B., Sorensen, S. J., & Hansen, L. H. (2008). Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in Enterobacteriaceae strains. *Microbiology*, *154*(Pt 1), 187-195. doi: 10.1099/mic.0.2007/010454-0
18. Canova, M. J., & Molle, V. (2014). Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. *J Biol Chem*, *289*(14), 9473-9479. doi: 10.1074/jbc.R113.529917
19. Chang, H. Y., Lee, J. H., Deng, W. L., Fu, T. F., & Peng, H. L. (1996). Virulence

and outer membrane properties of a galU mutant of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microb Pathog*, 20(5), 255-261. doi: S0882-4010(96)90024-8 [pii]10.1006/mpat.1996.0024

20. Clegg, S., Purcell, B. K., & Pruckler, J. (1987). Characterization of genes encoding type 1 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, and *Serratia marcescens*. *Infect Immun*, 55(2), 281-287.
21. Colodner, R., Raz, R., Chazan, B., & Sakran, W. (2004). Susceptibility pattern of extended-spectrum beta-lactamase producing bacteria isolated from inpatients to five antimicrobial drugs in a community hospital in Northern Israel. *Int J Antimicrob Agents*, 24(4), 409-410. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2004.06.001
22. Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S., & Svanborg, C. (1996). Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(18), 9827-9832.
23. Cozzone, A. J. (2009). Bacterial tyrosine kinases: novel targets for antibacterial therapy? *Trends Microbiol*, 17(12), 536-543. doi: 10.1016/j.tim.2009.09.005
24. Cruz-Ramos, H., Crack, J., Wu, G., Hughes, M. N., Scott, C., Thomson, A. J., Green, J., Poole, R. K. (2002). NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J*, 21(13), 3235-3244. doi: 10.1093/emboj/cdf339
25. Da Re, S., & Ghigo, J. M. (2006). A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188(8), 3073-3087. doi: 10.1128/JB.188.8.3073-3087.2006
26. Di Martino, P., Bertin, Y., Girardeau, J. P., Livrelli, V., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1995). Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun*, 63(11), 4336-4344.

27. Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (2003). *Klebsiella pneumoniae* type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. *Res Microbiol*, 154(1), 9-16.
28. Di Martino, P., Livrelli, V., Sirot, D., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1996). A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/SHV-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun*, 64(6), 2266-2273.
29. Domenico, P., Schwartz, S., & Cunha, B. A. (1989). Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun*, 57(12), 3778-3782.
30. Donato, G. M., & Kawula, T. H. (1999). Phenotypic analysis of random *hns* mutations differentiate DNA-binding activity from properties of *fimA* promoter inversion modulation and bacterial motility. *J Bacteriol*, 181(3), 941-8
31. Dong, T., & Schellhorn, H. E. (2010). Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun*, 78(3), 887-897. doi: 10.1128/IAI.00882-09
32. Edwards-Jones, B., Langford, P. R., Kroll, J. S., & Yu, J. (2004). The role of the *Shigella flexneri yihE* gene in LPS synthesis and virulence. *Microbiology*, 150(Pt 4), 1079-1084.
33. Fang, C. T., Chuang, Y. P., Shun, C. T., Chang, S. C., & Wang, J. T. (2004). A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. *J Exp Med*, 199(5), 697-705. doi: 10.1084/jem.20030857 [pii]
34. Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol*, 2(11), 898-907. doi: 10.1038/nrmicro1021
35. French, G. L., Shannon, K. P., & Simmons, N. (1996). Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and

- beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. *J Clin Microbiol*, 34(2), 358-363.
36. Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J*, 27(17), 2271-2280. doi: 10.1038/emboj.2008.155
37. Fung, C. P., Chang, F. Y., Lee, S. C., Hu, B. S., Kuo, B. I., Liu, C. Y., Ho, M., Siu, L. K. (2002). A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis? *Gut*, 50(3), 420-424.
38. Garnak, M., & Reeves, H. C. (1979). Phosphorylation of Isocitrate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Science*, 203(4385), 1111-1112.
39. Gerlach, G. F., Clegg, S., & Allen, B. L. (1989). Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*, 171(3), 1262-1270.
40. Goldberg, J. B., Hatano, K., & Pier, G. B. (1993). Synthesis of lipopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase. *J Bacteriol*, 175(6), 1605-1611.
41. Grangeasse, C., Cozzone, A. J., Deutscher, J., & Mijakovic, I. (2007). Tyrosine phosphorylation: an emerging regulatory device of bacterial physiology. *Trends Biochem Sci*, 32(2), 86-94. doi: 10.1016/j.tibs.2006.12.004
42. Grangeasse, C., Terreux, R., & Nessler, S. (2010). Bacterial tyrosine-kinases: structure-function analysis and therapeutic potential. *Biochim Biophys Acta*, 1804(3), 628-634. doi: 10.1016/j.bbapap.2009.08.018
43. Hanks, S. K., & Hunter, T. (1995). Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*, 9(8), 576-596.

44. Hirsch, E. B., & Tam, V. H. (2010). Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*, 65(6), 1119-1125. doi: 10.1093/jac/dkq108
45. Ho, J. Y., Lin, T. L., Li, C. Y., Lee, A., Cheng, A. N., Chen, M. C., Wu, S. H., Wang, J. T., Li, T. L., Tsai, M. D. Functions of some capsular polysaccharide biosynthetic genes in *Klebsiella pneumoniae* NTUH K-2044. *PLoS One*, 6(7), e21664. doi: 10.1371/journal.pone.0021664PONE-D-11-01119 [pii]
46. Huang, Y. J., Liao, H. W., Wu, C. C., & Peng, H. L. (2009). MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Res Microbiol*, 160(1), 71-79. doi: 10.1016/j.resmic.2008.10.009
47. Huang, Y. J., Wu, C. C., Chen, M. C., Fung, C. P., & Peng, H. L. (2006). Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: possible role of the MrkD containing an RGD motif. *Biochem Biophys Res Commun*, 350(3), 537-542. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.070
48. Humphreys, S., Rowley, G., Stevenson, A., Anjum, M. F., Woodward, M. J., Gilbert, S., Kormanec, J., Roberts, M. (2004). Role of the two-component regulator CpxAR in the virulence of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infect Immun*, 72(8), 4654-4661. doi: 10.1128/IAI.72.8.4654-4661.2004
49. Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57, 395-418. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
50. Inouye, S., & Nariya, H. (2008). Dual regulation with Ser/Thr kinase cascade and a His/Asp TCS in *Myxococcus xanthus*. *Adv Exp Med Biol*, 631, 111-121. doi: 10.1007/978-0-387-78885-2_7
51. Janet T. Lin. (2010) Mutagenic studies of RdoA, a eukaryotic-like ser/thr protein kinase in *Salmonella Enterica* Serovar Typhimurium. MSc. Queen's University.

52. Kashiwagi, K., Miyamoto, S., Suzuki, F., Kobayashi, H., & Igarashi, K. (1992). Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the *potE* gene of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(10), 4529-4533.
53. Kern, R., Malki, A., Abdallah, J., Tagourti, J., & Richarme, G. (2007). *Escherichia coli* HdeB is an acid stress chaperone. *J Bacteriol*, 189(2), 603-610. doi: 10.1128/JB.01522-06
54. Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., *et al.* (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis*, 10(9), 597-602. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2
55. Langstraat, J., Bohse, M., & Clegg, S. (2001). Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect Immun*, 69(9), 5805-5812.
56. LaPorte, D. C., & Chung, T. (1985). A single gene codes for the kinase and phosphatase which regulate isocitrate dehydrogenase. *J Biol Chem*, 260(28), 15291-15297.
57. Lin, C. T., Wu, C. C., Chen, Y. S., Lai, Y. C., Chi, C., Lin, J. C., Chen, Y., Peng, H. L. (2011). Fur regulation of the capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology*, 157(Pt 2), 419-429. doi: 10.1099/mic.0.044065-0
58. Li, M. S., J. S. Kroll, and J. Yu. (2001) Influence of the *yihE* gene of *Shigella flexneri* on global gene expression: on analysis using DNA arrays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288:91-100.
59. Maki, D. G., & Tambyah, P. A. (2001). Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg Infect Dis*, 7(2), 342-347. doi: 10.3201/eid0702.700342

60. Malki, A., Le, H. T., Milles, S., Kern, R., Caldas, T., Abdallah, J., & Richarme, G. (2008). Solubilization of protein aggregates by the acid stress chaperones HdeA and HdeB. *J Biol Chem*, 283(20), 13679-13687. doi: 10.1074/jbc.M800869200
61. Maroncle, N., Rich, C., & Forestier, C. (2006). The role of *Klebsiella pneumoniae* urease in intestinal colonization and resistance to gastrointestinal stress. *Res Microbiol*, 157(2), 184-193. doi: 10.1016/j.resmic.2005.06.006
62. Matatov, R., Goldhar, J., Skutelsky, E., Sechter, I., Perry, R., Podschun, R., Sahly, H., Thankavel, K., Abraham, S. N., Ofek, I. (1999). Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. *FEMS Microbiol Lett*, 179(1), 123-130. doi: S0378-1097(99)00402-4 [pii]
63. McClain, M. S., Blomfield, I. C., & Eisenstein, B. I. (1991). Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 173(17), 5308-5314.
64. Merrell, D. S., Bailey, C., Kaper, J. B., & Camilli, A. (2001). The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU. *J Bacteriol*, 183(9), 2746-2754. doi: 10.1128/JB.183.9.2746-2754.2001
65. Miller, J. H. (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
66. Mizuta, K., Ohta, M., Mori, M., Hasegawa, T., Nakashima, I., & Kato, N. (1983). Virulence for mice of *Klebsiella* strains belonging to the O1 group: relationship to their capsular (K) types. *Infect Immun*, 40(1), 56-61.
67. Munoz-Dorado, J., Inouye, S., & Inouye, M. (1991). A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*, 67(5), 995-1006.
68. Nakayama, S., and H. Watanabe. (1995) Involvement of CpxA, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression

- of *Shigella sonnei virF* gene. *J. Bacteriol.* 177:5062-5069.
69. Nevesinjac, A. Z., & Raivio, T. L. (2005). The Cpx envelope stress response affects expression of the type IV bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 187(2), 672-686. doi: 10.1128/JB.187.2.672-686.2005
70. Nordmann, P., Cuzon, G., & Naas, T. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, 9(4), 228-236. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70054-4
71. Olsen, P. B., & Klemm, P. (1994). Localization of promoters in the *fim* gene cluster and the effect of H-NS on the transcription of *fimB* and *fimE*. *FEMS Microbiol Lett*, 116(1), 95-100.
72. Olsen, P. B., Schembri, M. A., Gally, D. L., & Klemm, P. (1998). Differential temperature modulation by H-NS of the *fimB* and *fimE* recombinase genes which control the orientation of the type 1 fimbrial phase switch. *FEMS Microbiol Lett*, 162(1), 17-23.
73. Oshima, T., Ito, K., Kabayama, H., & Nakamura, Y. (1995). Regulation of *lrp* gene expression by H-NS and Lrp proteins in *Escherichia coli*: dominant negative mutations in *lrp*. *Mol Gen Genet*, 247(5), 521-528.
74. Pan, Y. J., Fang, H. C., Yang, H. C., Lin, T. L., Hsieh, P. F., Tsai, F. C., Keynen, Y., Wang, J. T. (2008). Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. *J Clin Microbiol*, 46(7), 2231-2240. doi: JCM.01716-07 [pii]10.1128/JCM.01716-07
75. Peng, H. L., Fu, T. F., Liu, S. F., & Chang, H. Y. (1992). Cloning and expression of the *Klebsiella pneumoniae* galactose operon. *J Biochem*, 112(5), 604-608.
76. Pereira, S. F., Goss, L., & Dworkin, J. (2011). Eukaryote-like serine/threonine kinases and phosphatases in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(1), 192-212. doi:

10.1128/MMBR.00042-10

77. Podschun, R., Teske, E., & Ullmann, U. (1991). Serum resistance properties of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. *Zentralbl Hyg Umweltmed*, 192(3), 279-285.
78. Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*, 11(4), 589-603.
79. Price, N. L., & Raivio, T. L. (2009). Characterization of the Cpx regulon in *Escherichia coli* strain MC4100. *J Bacteriol*, 191(6), 1798-1815. doi: 10.1128/JB.00798-08
80. Raivio, T. L., Popkin, D. L., & Silhavy, T. J. (1999). The Cpx envelope stress response is controlled by amplification and feedback inhibition. *J Bacteriol*, 181(17), 5263-5272.
81. Regni, C., Schramm, A. M., & Beamer, L. J. (2006). The reaction of phosphohexamutase from *Pseudomonas aeruginosa*: structural insights into a simple processive enzyme. *J Biol Chem*, 281(22), 15564-15571. doi: 10.1074/jbc.M600590200
82. Richards, M. S. (2006) The effect of *rdoA* and the Cpx pathway on flagellar phase variation in *S. typhimurium*. MSc. Queen's University.
83. Robert A. B., (2011). [New Delhi-metallo-beta-lactamase 1 (NDM-1)-producing, multiple drug resistant Enterobacteriaceae]. *Jpn J Antibiot*, 63(5), 365-367.
84. Roque, O. L. (2009) The RdoA-dependent phosphoproteome profile of *Salmonella enterica*. MSc. Queen's University.
85. Ryan, K. J., Ray, C. G., & Sherris, J. C. (2004). *Sherris medical microbiology : an introduction to infectious diseases* (4th ed.). New York: McGraw-Hill.
86. Ryan, K. J., & Sherris, J. C. (1994). *Sherris medical microbiology* (3rd ed.).

Norwalk, Conn.: Appleton & Lange.

87. Sahly, H., Podschun, R., Oelschlaeger, T. A., Greiwe, M., Parolis, H., Hasty, D., Kekow, J., Ullmann, U., Ofek, I., Sela, S. (2000). Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 68(12), 6744-6749.
88. Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., & Klemm, P. (2005). Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*, 73(8), 4626-4633. doi: 73/8/4626 [pii]10.1128/IAI.73.8.4626-4633.2005
89. Schembri, M. A., Olsen, P. B., & Klemm, P. (1998). Orientation-dependent enhancement by H-NS of the activity of the type 1 fimbrial phase switch promoter in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 259(3), 336-344.
90. Schwan, W. R., Lee, J. L., Lenard, F. A., Matthews, B. T., & Beck, M. T. (2002). Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 70(3), 1391-1402.
91. Snyder, W. B., Davis, L. J., Danese, P. N., Cosma, C. L., & Silhavy, T. J. (1995). Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein, suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. *J Bacteriol*, 177(15), 4216-4223.
92. Solano, C., Garcia, B., Valle, J., Berasain, C., Ghigo, J. M., Gamazo, C., & Lasa, I. (2002). Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol*, 43(3), 793-808.
93. Srinivasan, V. B., Vaidyanathan, V., Mondal, A., Venkataramaiah, M., & Rajamohan, G. (2012). Functional characterization of a novel Mn²⁺ dependent protein serine/threonine kinase KpnK, produced by *Klebsiella pneumoniae* strain MGH78578. *FEBS Lett*, 586(21), 3778-3786. doi: 10.1016/j.febslet.2012.09.007

94. Stefanie L. Vogt, Tracy L. Raivio (2011) Just scratching the surface: an expanding view of the Cpx envelope stress response. *FEMS Microbiol Lett* 326 (2012) 2-11.
95. Stentebjerg-Olesen, B., Chakraborty, T., & Klemm, P. (2000). FimE-catalyzed off-to-on inversion of the type 1 fimbrial phase switch and insertion sequence recruitment in an *Escherichia coli* K-12 *fimB* strain. *FEMS Microbiol Lett*, 182(2), 319-325.
96. Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 69, 183-215. doi: 10.1146/annurev.biochem.69.1.183
97. Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun*, 76(9), 4055-4065. doi: IAI.00494-08 [pii]10.1128/IAI.00494-08
98. Suntharalingam, P., Spencer, H., Gallant, C. V., & Martin, N. L. (2003). *Salmonella enterica* serovar typhimurium *rdoA* is growth phase regulated and involved in relaying Cpx-induced signals. *J Bacteriol*, 185(2), 432-443.
99. Turcot, I., Ponnampalam, T. V., Bouwman, C. W., & Martin, N. L. (2001). Isolation and characterization of a chromosomally encoded disulphide oxidoreductase from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Can J Microbiol*, 47(8), 711-721.
100. Ubersax, J. A., & Ferrell, J. E., Jr. (2007). Mechanisms of specificity in protein phosphorylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(7), 530-541. doi: 10.1038/nrm2203
101. Valderas, M. W., Alcantara, R. B., Baumgartner, J. E., Bellaire, B. H., Robertson, G. T., Ng, W. L., Richardson, J. M., Winkler, M. E., Roop, R. M., 2nd. (2005). Role of HdeA in acid resistance and virulence in *Brucella abortus* 2308. *Vet Microbiol*, 107(3-4), 307-312. doi: 10.1016/j.vetmic.2005.01.018

102. Van Tilbeurgh H, Declerck N (2001) Structural insights into the regulation of bacterial signalling proteins containing PRDs. *Curr Opin Struct Biol* 11:685–693
103. Wacharotayankun, R., Arakawa, Y., Ohta, M., Hasegawa, T., Mori, M., Horii, T., & Kato, N. (1992). Involvement of *rscB* in *Klebsiella* K2 capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 174(3), 1063-1067.
104. Wang, Z. C., Huang, C. J., Huang, Y. J., Wu, C. C., & Peng, H. L. (2013). FimK regulation on the expression of type 1 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43S3. *Microbiology*, 159(Pt 7), 1402-1415. doi: 10.1099/mic.0.067793-0
105. Warren, J. W. (2001). Catheter-associated urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*, 17(4), 299-303.
106. Weiner, L., & Model, P. (1994). Role of an *Escherichia coli* stress-response operon in stationary-phase survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(6), 2191-2195.
107. William R. S. (2011). Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World Journal of Clinical W J C I D Infectious Diseases*, 1(1): 17-25. doi:10.5495/wjcid.v1.i1.17.
108. Wu, C. C., Lin, C. T., Cheng, W. Y., Huang, C. J., Wang, Z. C., & Peng, H. L. (2012). Fur-dependent MrkHI regulation of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology*, 158(Pt 4), 1045-1056. doi: 10.1099/mic.0.053801-0
109. Yang, Y., McCue, L. A., Parsons, A. B., Feng, S., & Zhou, J. (2010). The tricarboxylic acid cycle in *Shewanella oneidensis* is independent of Fur and RyhB control. *BMC Microbiol*, 10, 264. doi: 10.1186/1471-2180-10-264
110. Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob*

Agents Chemother, 53(12), 5046-5054. doi: 10.1128/AAC.00774-09

111. Zhang, M., Lin, S., Song, X., Liu, J., Fu, Y., Ge, X., Fu, X., Chang, Z., Chen, P. R. (2011). A genetically incorporated crosslinker reveals chaperone cooperation in acid resistance. *Nat Chem Biol*, 7(10), 671-677. doi: 10.1038/nchembio.644
112. Zhao, B., & Houry, W. A. (2010). Acid stress response in enteropathogenic gammaproteobacteria: an aptitude for survival. *Biochem Cell Biol*, 88(2), 301-314. doi: 10.1139/o09-182
113. Zheng, J., He, C., Singh, V. K., Martin, N. L., & Jia, Z. (2007). Crystal structure of a novel prokaryotic Ser/Thr kinase and its implication in the Cpx stress response pathway. *Mol Microbiol*, 63(5), 1360-1371. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05611.x
114. Zogaj, X., Nitz, M., Rohde, M., Bokranz, W., & Romling, U. (2001). The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol Microbiol*, 39(6), 1452-1463.

Table 1. Bacterial strains used in this study

Strain	Description	Reference or Source
<i>E. coli</i>:		
JM109	<i>endA1 glnV44 thi-1 relA1 gyrA96 recA1 mcrB⁺ Δ(lac-proAB) e14- [F' traD36 proAB⁺lacI^q lacZ ΔM15] hsdR17(r_K⁻m_K⁺)</i>	Laboratory stock
S17-1 <i>λpir</i>	<i>hsdR recA pro</i> RP4-2 (Tc::Mu; Km::Tn7)(<i>λpir</i>)	Laboratory stock
BL21(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm trxB15::kan</i> (DE3)	Novagen
Novablue(DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3), Tc ^r	Novagen
<i>K. pneumoniae</i>		
CG43	Clinical isolate of K2 serotype	Laboratory stock
CG43S3	CG43, Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔmrkA</i>	CG43S3 <i>ΔmrkA</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔfimA</i>	CG43S3 <i>ΔfimA</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔrcsB</i>	CG43S3 <i>ΔrcsB</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>Δfur</i>	CG43S3 <i>Δfur</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔsodA</i>	CG43S3 <i>ΔsodA</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔkatG</i>	CG43S3 <i>ΔkatG</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔlacZ</i>	CG43S3 <i>ΔlacZ</i> , Sm ^r	Laboratory stock
<i>ΔlacZ ΔcpxRA</i>	CG43S3 <i>ΔlacZ ΔcpxRA</i> , Sm ^r	Zhe-Chong Wang
<i>ΔkpnK_1</i>	CG43S3 <i>ΔkpnK</i> (deletion in 825 bp), Sm ^r	Chu-Hao Wan
<i>ΔkpnK</i>	CG43S3 <i>ΔkpnK</i> (deletion in 711 bp), Sm ^r	This study

Table 1. (continued)

Strain	Description	Reference or Source
<i>ΔdsbA</i>	CG43S3 <i>ΔdsbA</i> , Sm ^r	This study
<i>ΔkpnKΔdsbA</i>	CG43S3 <i>ΔkpnKΔdsbA</i> , Sm ^r	This study

Table 2. Plasmids used in this study

Number	plasmid	Description	Reference or Source
	yT&A	Ap ^r , T/A-type PCR cloning vector	Yeastern
BS_14	yT&A-HY5	Ap ^r , A 988-bp without promoter of <i>kpnK</i> cloned into yT&A	This study
BS_120	pKAS46	Km ^r , Ap ^r , Suicide vector, <i>rspL</i> ,	Skorupski et al., 1996
BS_126	pKAS46-com- <i>kpnK</i>	Km ^r , Ap ^r , A 2453-bp complementary fragment containing the flanking sequence of <i>kpnK</i> cloned into pKAS46	This study
BS_135	pKAS46- <i>kpnK</i>	Km ^r , Ap ^r , A 1339-bp A+B fragment containing the flanking sequence of <i>kpnK</i> cloned into pKAS46	This study
BS_134	pKAS46- <i>dsbA</i>	Km ^r , Ap ^r , A 2099-bp A+B fragment containing the flanking sequence of <i>dsbA</i> cloned into pKAS46	This study
	pETQ33	Km ^r , protein overexpressing vector contain T5 and <i>lacZ</i> promoter	Laboratory stock
BS_41	pETQ33- <i>manB</i>	Km ^r , Kp <i>manB</i> coding sequence with promoter region cloned in <i>KpnI/BamHI</i> sites	Laboratory stock
BS_42	pETQ33- <i>manBS98A</i>	Km ^r , pETQ33- <i>manB</i> with single residue change of <i>manB</i> S98A	Laboratory stock
BS_28	<i>placZ15</i>	Cm ^r , promoter selection vector, <i>lacZ</i> ⁺	Laboratory stock
BS_139	p <i>P1-lacZ15</i> of <i>kpnK</i>	Cm ^r , A 216-bp fragment containing the putative <i>cpxR</i> binding box of <i>kpnK</i> promoter region cloned into <i>placZ15</i>	This study
BS_96	p <i>P2-lacZ15</i> of <i>kpnK</i>	Cm ^r , A 102-bp fragment and not containing the putative <i>cpxR</i> binding box of <i>kpnK</i> promoter region cloned into <i>placZ15</i>	This study

Table 2. (continued)

Number	plasmid	Description	Reference or Source
BS_29	pRK415	Tc ^r , shuttle vector, <i>mob</i> ⁺	Laboratory stock
BS_7	pRK415- <i>stk</i>	Tc ^r , shuttle vector, <i>mob</i> ⁺ , ~1200-bp fragment containing a <i>kpnK</i> allele with its promoter region cloned into pRK415	This study
BS_18	pRK415- <i>kpnK</i>	Tc ^r , shuttle vector, <i>mob</i> ⁺ , ~987-bp fragment containing a <i>kpnK</i> allele without its promoter region cloned into pRK415	This study
BS_13	pETQ31	Km ^r , His-tagged protein expression vector	Laboratory stock
BS_82	pETQ31- <i>kpnK</i>	Km ^r , A 988 bp fragment encoding full-length <i>kpnK</i> cloned into pETQ31	This study
BS_60	pETQ31- <i>kpnK</i> S36A	Km ^r , pETQ31- <i>kpnK</i> with single residue change of <i>kpnK</i> S36A	This study
BS_91	pETQ31- <i>kpnK</i> D201A	Km ^r , pETQ31- <i>kpnK</i> with single residue change of <i>kpnK</i> D201A	This study
BS_61	pETQ31- <i>kpnK</i> D217A	Km ^r , pETQ31- <i>kpnK</i> with single residue change of <i>kpnK</i> D217A	This study
BS_131	pETQ31- <i>kpnK</i> T325A	Km ^r , pETQ31- <i>kpnK</i> with single residue change of <i>kpnK</i> T325A	This study
BS_110	pETQ31-C- <i>kpnK</i>	Km ^r , A 766 bp fragment encoding C-terminal of <i>kpnK</i> cloned into pETQ31	This study
BS_149	pETQ31-N- <i>kpnK</i>	Km ^r , A 241 bp fragment encoding N-terminal of <i>kpnK</i> cloned into pETQ31	This study

Table 3. Oligonucleotide primers used in this study

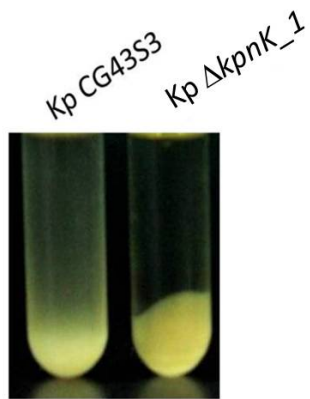
Primer	Sequence (5'→3')	Corresponding plasmid
HY2-F	<u>GAGCTC</u> CAAACCATGGGCTCGC	pKAS46-complementary- <i>kpnK</i>
HY2-R2	TCTAGAGGCTGAATGGCCTATGGGA	pKAS46- complementary - <i>kpnK</i>
HY3-F	<u>AAGCTT</u> AAGGTTGTAAGCGCTACCGC	pRK415- <i>stk</i>
HY3-R	GGATCCTTAATACATTGGCGTAACTGAAG	pRK415- <i>stk</i>
HY5-F	<u>GGGATCC</u> GATGCACGATAAGGCTT	pRK415- <i>kpnK</i> 、 pETQ31- <i>kpnK</i>
HY5-R	<u>GGAGCTC</u> TTAATACATTGGCGTAACTGAA	pRK415- <i>kpnK</i> 、 pETQ31- <i>kpnK</i>
HY6-F	CCCCGCTAAAC <u>GCCT</u> ATGAGAACCGC	pETQ31- <i>kpnK</i> S36A
HY6-R	GCGGTTCTCATAG <u>GC</u> GTTTAGCGGGG	pETQ31- <i>kpnK</i> S36A
HY8-F	CCTGCACGGT <u>GCCT</u> GCCATGCCG	pETQ31- <i>kpnK</i> D201A
HY8-R	CGGCATGGCAG <u>G</u> CACCGTGCAGG	pETQ31- <i>kpnK</i> D201A
HY10-F	CCACTGTTTGT <u>CGCCT</u> TAGACGATGC	pETQ31- <i>kpnK</i> D217A
HY10-R	GCATCGTCTAAG <u>GCG</u> ACAAACAGTGG	pETQ31- <i>kpnK</i> D217A
HY22-F	CCGCTTCAGTTAG <u>CGC</u> CAATGTATTAA	pETQ31- <i>kpnK</i> T325A
HY22-R	TTAATACATTGG <u>CGC</u> TAACTGAAGCGG	pETQ31- <i>kpnK</i> T325A
HY15-P1F	<u>GGATCC</u> GGCGACCATTTAGCGC	p <i>P1- lacZ15</i> of <i>kpnK</i>
HY15-P2F	<u>GGATCC</u> GCTACCGCGTAAAGTGCAA	p <i>P2- lacZ15</i> of <i>kpnK</i>
HY15-R	<u>AGATCT</u> CGGGCGAAGCGTCTGAA	p <i>P1- lacZ15</i> of <i>kpnK</i> 、 <i>P2- lacZ15</i> of <i>kpnK</i>
HY16-F	<u>GGATCC</u> GATGCACGATAAGGCTT	pETQ31-N- <i>kpnK</i>
HY16-R	<u>GAGCTC</u> GAATTCCTCATAGGCCTCG	pETQ31-N- <i>kpnK</i>

Table 3. (continued)

Primer	Sequence (5'→3')	Corresponding plasmid
HY17-F	<u>GGATCCC</u> GAGGCCTATGAGGAA	pETQ31-C- <i>kpnK</i> (with HY5-R)
HY18-F	<u>TCTAGAGA</u> AATATCGCCTCTTTCATTGTGG	A segment of deletion <i>kpnK</i> (pKAS46- <i>kpnK</i>)
HY18-R	<u>GGATCC</u> ACCGGAGTCCACCC	A segment of deletion <i>kpnK</i> (pKAS46- <i>kpnK</i>)
HY19-F	<u>GGATCCTT</u> TACGCGCTATGCGA	B segment of deletion <i>kpnK</i> (pKAS46- <i>kpnK</i>)
HY19-R	<u>GAGCTC</u> GTCAGTGACCGGCG	B segment of deletion <i>kpnK</i> (pKAS46- <i>kpnK</i>)
HY20-F	<u>TCTAGAG</u> GTTGTAAGCGCTACCGCG	A segment of deletion <i>dsbA</i> (pKAS46- <i>dsbA</i>)
HY20-R	<u>GGATCC</u> ATAACCAGCCAGCGCC	A segment of deletion <i>dsbA</i> (pKAS46- <i>dsbA</i>)
HY21-F	<u>GGATCCC</u> CGTGAAGCAACTGG	B segment of deletion <i>dsbA</i> (pKAS46- <i>dsbA</i>)
HY21-R	<u>GAGCTC</u> CTAACTATGTCGAGATTACTCGC	B segment of deletion <i>dsbA</i> (pKAS46- <i>dsbA</i>)

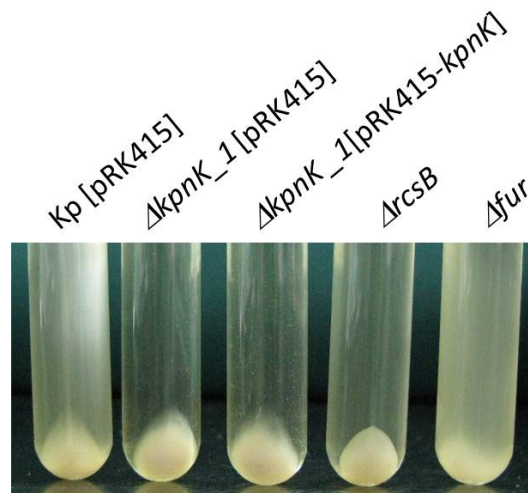
Note : The underlines in Table 3 either represent different site-directed mutagenesis position, namely HY6-F, HY6-R, HY8-F, HY8-R, HY10-F, HY10-R, HY22-F and HY22-R, or indicate different enzyme cleavage sites.

(A)



Sedimentation assay, 4000 rpm, 5min

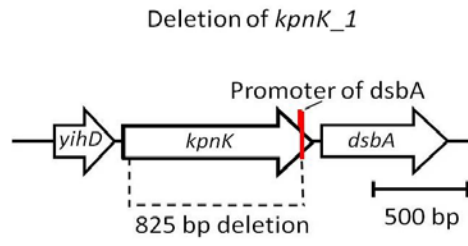
(B)



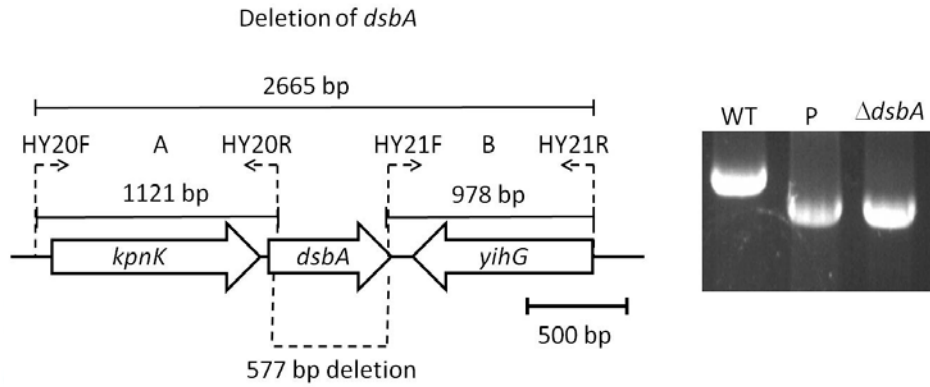
Sedimentation assay, 4000 rpm, 2min

圖一、*kpnK_1* 基因缺損突變株在 *K. pneumoniae* CG43 中的 CPS 生合成
菌株 37°C 培養 16 小時後，將(A)KPCG43S3 及實驗室先前已建構完成的 $\Delta kpnK_1$ ，
以 4000 rpm 離心沉降 5 分鐘及在(B)KP[pRK415]、 $\Delta kpnK$ [pRK415]與質體回補
株 $\Delta kpnK_1$ [pRK415-*kpnK*]中，以 4000 rpm 離心沉降 2 分鐘，比較菌落沉澱狀況。
而 Δfur 及 $\Delta rcsB$ 為本實驗確認各基因缺損對 CPS 生合成影響之控制組。

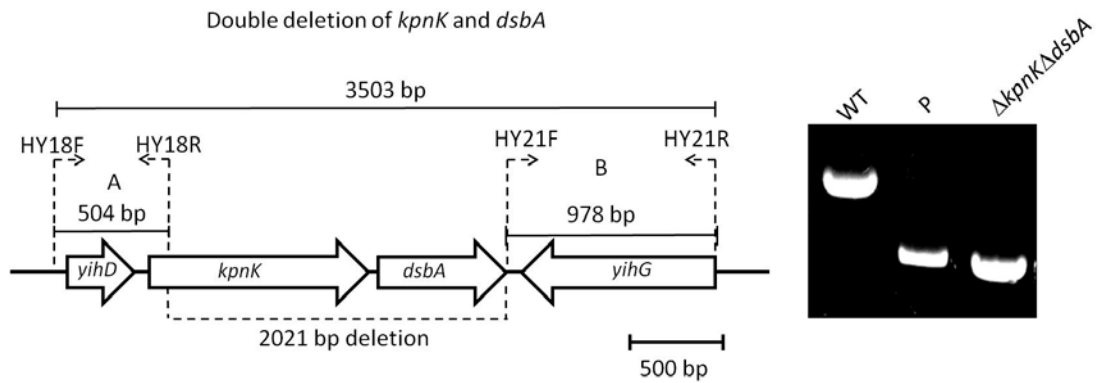
(A)



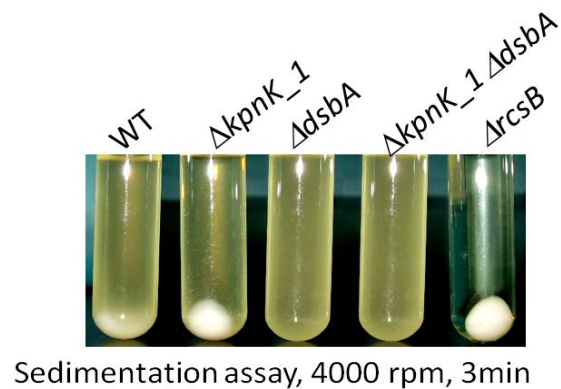
(B)



(C)



(D)

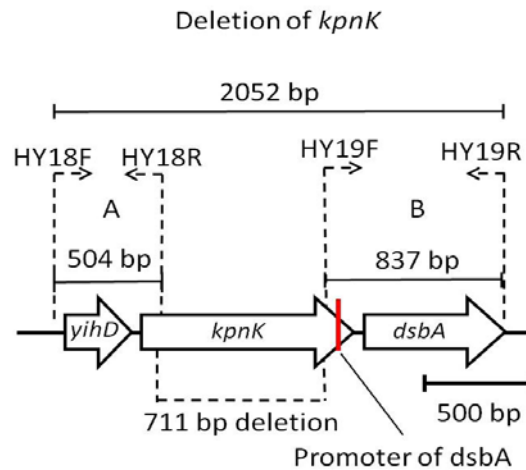


圖二、基因缺損突變株之建構示意圖及低速離心觀察 $\Delta kpnK_1$ 、 $\Delta dsbA$ 及 $\Delta kpnK_1\Delta dsbA$ 在 *K. pneumoniae* CG43 中的 CPS 生合成

(A) 為 *kpnK_1* 基因剔除架構圖，*kpnK* 尾端之標示為 *dsbA* 的啟動子區域。(B) 左圖為 *dsbA* 基因剔除架構圖，右圖為以 PCR 方式並用引子 HY_20F 和 HY_21R，確認基因剔除。WT 為 KPCG43S 野生株，P 為自殺性載體 pKAS46-A+B of *dsbA* 的質體， $\Delta dsbA$ 為剔除 577 bp 的 *dsbA* 基因缺失突變株。(C) 左圖為 *kpnK* 與 *dsbA* 雙基因缺失突變架構圖。右圖為以鏈聚合酶連鎖反應方式並用引子 HY_18F 和 HY_21R，確認基因剔除。WT 為 KPCG43S 野生株，P 為自殺性載體 pKAS46-A+B of *kpnK* and *dsbA* 的質體， $\Delta kpnK\Delta dsbA$ 為剔除 2021 bp 的雙基因缺失突變株。(D) 將菌株 37°C 培養 16 小時後，再以 4000 rpm 離心沉降 2 分鐘後，觀察菌落沉澱狀況。而 $\Delta rcsB$ 為本實驗確認各基因缺損對 CPS 生合成影響之控制組。

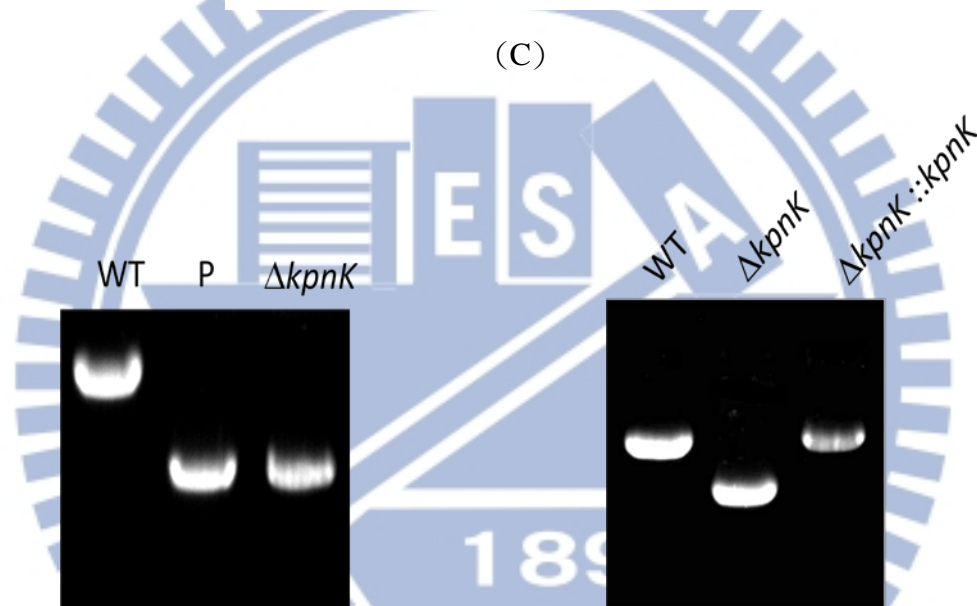


(A)



(B)

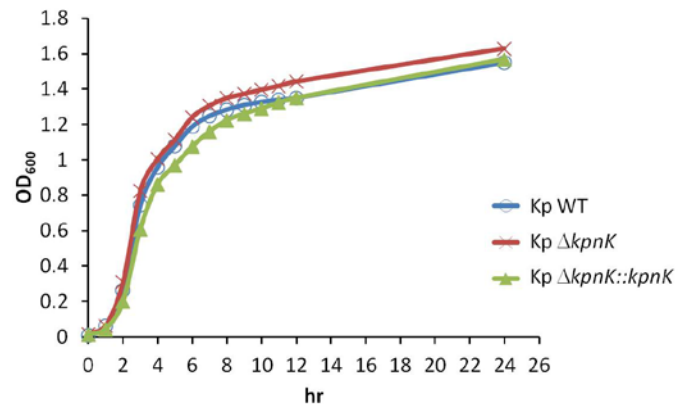
(C)



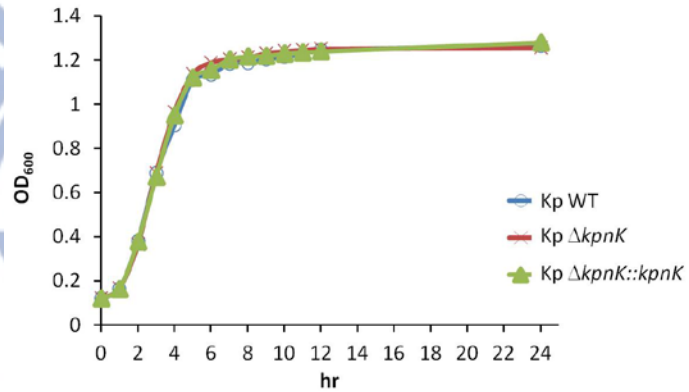
圖三、在 *K. pneumoniae* CG43 中構建 *kpnK* 基因缺失突變株及回補株

(A) 為 $\Delta kpnK$ 基因剔除架構圖，*kpnK* 尾端之標示為 *dsbA* 的啟動子區域。引子 HY_18F/HY_19R 用於增幅回補基因缺損所用之引子；以鏈聚合酶連鎖反應方式 (B) 確認基因剔除。WT 為 KPCG43S 野生株，P 為自殺性載體 pKAS46-A+B 的質體， $\Delta kpnK$ 為 *kpnK* 基因缺失突變株。及 (C) 確認回補 *kpnK* 基因的缺損。WT 為 KPCG43S 野生株， $\Delta kpnK$ 為 *kpnK* 的基因缺失突變株， $\Delta kpnK::kpnK$ 為基因回補株。

(A)



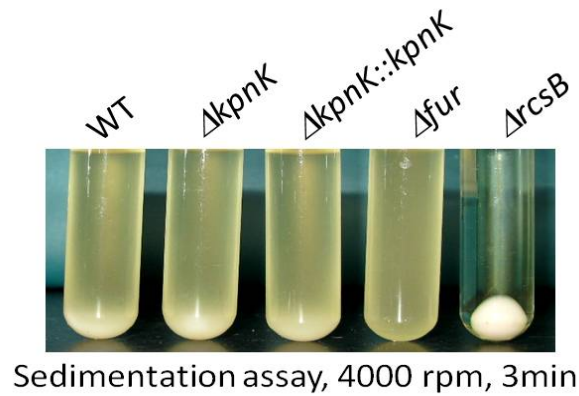
(B)



圖四、*K. pneumoniae* CG43 中的 *kpnK* 基因缺損突變株及回補株在 LB 及 M9 培養液中的生長曲線分析

將菌株 37°C 培養 16 小時後，再以 200 倍稀釋至(A)LB 及(B)M9 培養液中，同時 37°C 搖晃培養，於每小時觀察並記錄 OD₆₀₀ 讀值。

(A)



(B)

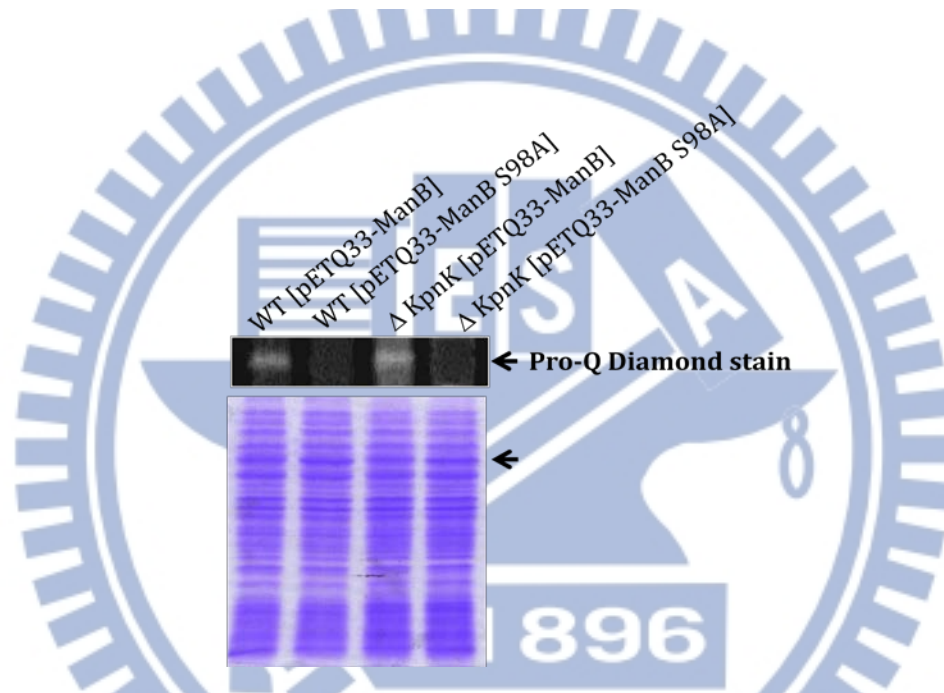
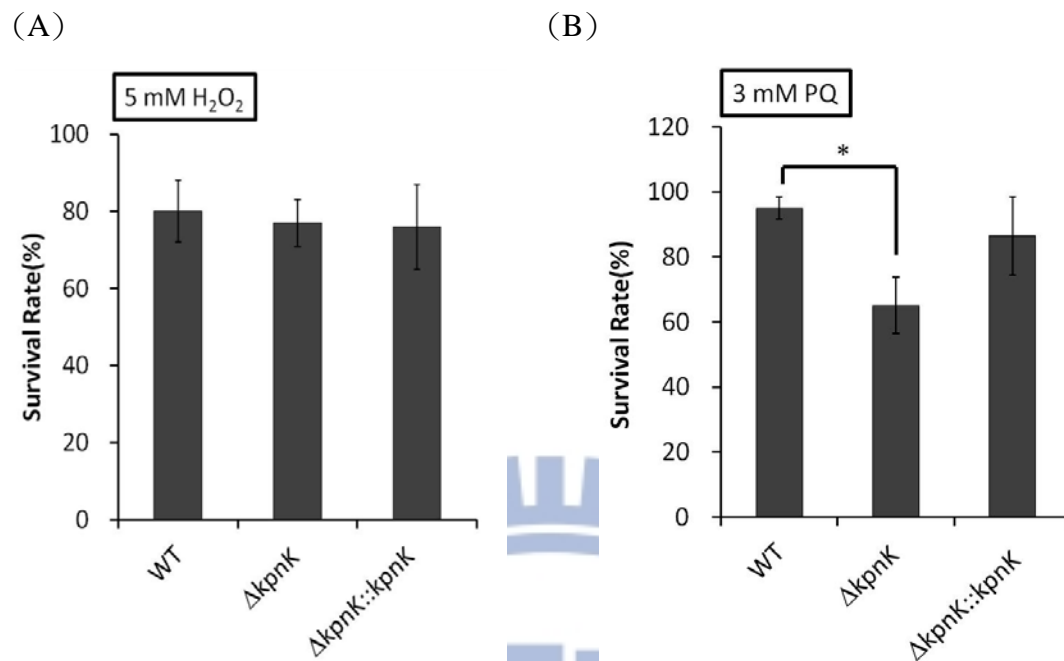


圖 五、在 *K. pneumoniae* CG43 中 *kpnK* 基因缺損突變株的 CPS 生合成及 ManB 的磷酸化

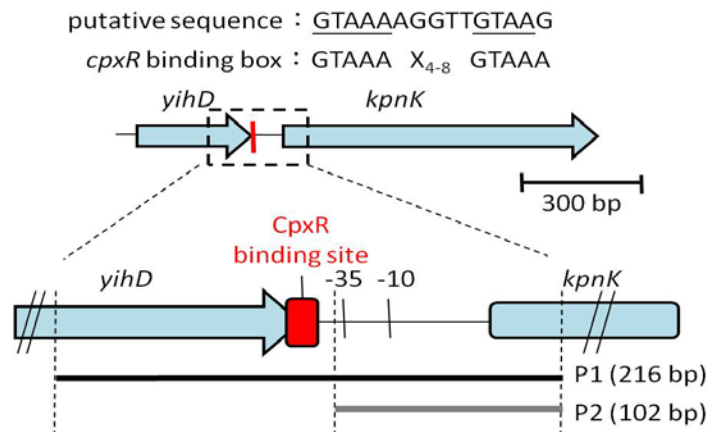
(A)將新建構的 *kpnK* 缺失突變株及回補株，37°C 培養 16 小時後，以 4000 rpm 離心沉降 3 分鐘後，觀察菌落沉澱狀況。 Δfur 、 $\Delta rcsB$ 為本實驗確認各基因缺損對 CPS 生合成影響之控制組。(B)將 0.5 mM IPTG 誘導的高量表現蛋白萃取，定量並取 10 ug/ lane 的蛋白質樣品，上圖為以磷酸根染劑 Pro-Q Diamond 進行分析，下圖以 comassie blue 染劑染膠定量蛋白質用，箭頭為蛋白質高量表現的位置。



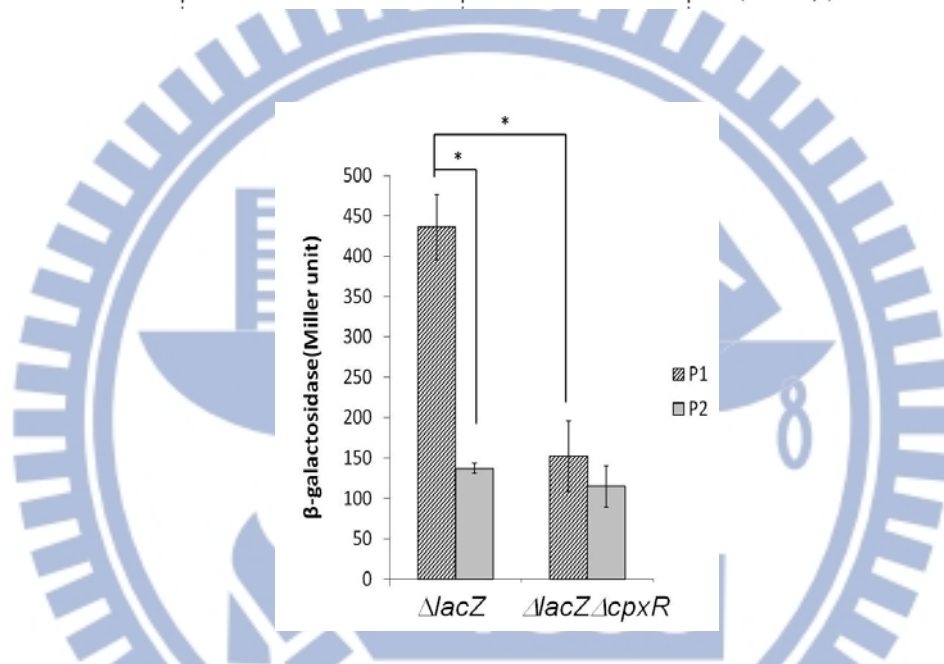
圖六、在 *K. pneumoniae* CG43 中 *kpnK* 基因缺損突變株對抗 H₂O₂ 及 paraquat 抗氧化能力分析

將菌株 37°C 培養 16 小時後，再以 40 倍稀釋至 LB 中，培養至 OD₆₀₀ 於 0.5~0.6 間，將 1 ml 菌量分別處理(A)5 mM H₂O₂ 及(B) 3 mM paraquat 各 35 分鐘，結果以每毫升存活的菌數和初始菌數的比值表示。*代表 *P* value < 0.05。

(A)



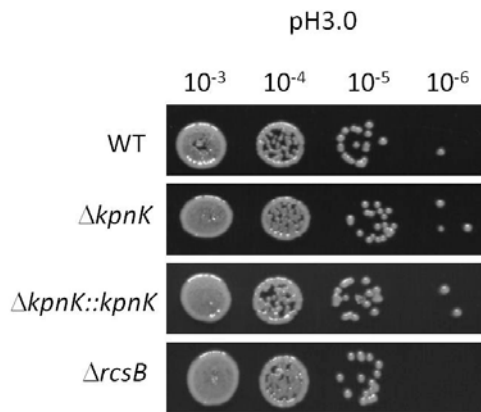
(B)



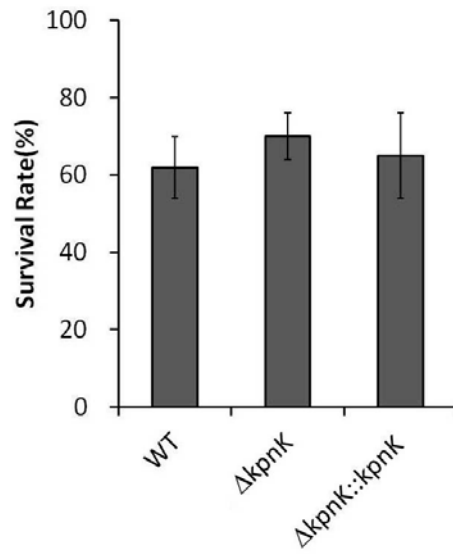
圖七、在 *K. pneumoniae* CG43 中 CpxR 對 *kpnK* 基因的轉錄調控

(A)標示為序列 GTAAAAGGTTGTAAG 的位置，發現此序列和 CpxR 的鍵結序列 GTAAAX₄₋₈GTAAA 有高度相似性，分別建構包含及不包含 CpxR binding box 的 P1 和 P2，並以 *placZ* 載體承接片段，以測定啟動子活性。(B)將 P1-lacZ 及 P2-lacZ 送入 $\Delta lacZ$ 及 $\Delta lacZ \Delta cpxR$ 菌株中，將 37°C 培養 16 小時後的菌液，以 40 倍稀釋至 LB 中，培養至 OD₆₀₀ 於 0.8~0.9 間，藉 β -半乳糖苷酶分析啟動子的活性高低，並以 Miller unit 呈現。*代表 P value < 0.05。

(A)

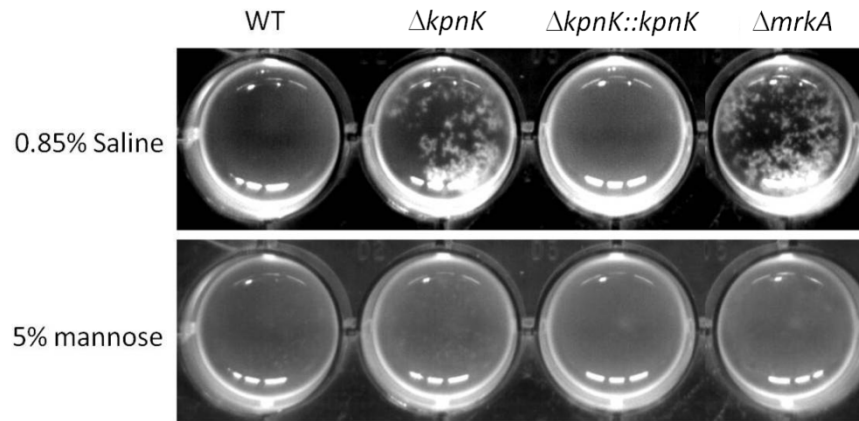


(B)



圖八、*kpnK* 基因缺損突變株在 *K. pneumoniae* CG43 中的抗酸能力

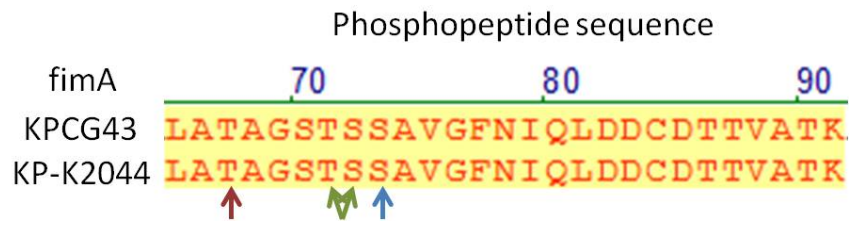
菌株 37°C 培養 16 小時後，再以 40 倍稀釋至 LB 中，培養到 OD_{600} 於 0.7~0.8 間，將 1 ml 菌量先以 pH4.4 LB 酸適應 60 分鐘，移至 pH3.0 M9 培養液中 45 分鐘，分別(A)序列稀釋後，以 5 μ l 滴於 LB 固態培養基上，並培養 16 小時後的菌落數圖及以(B)每毫升存活的菌數和初始菌數的比值表示生存率。



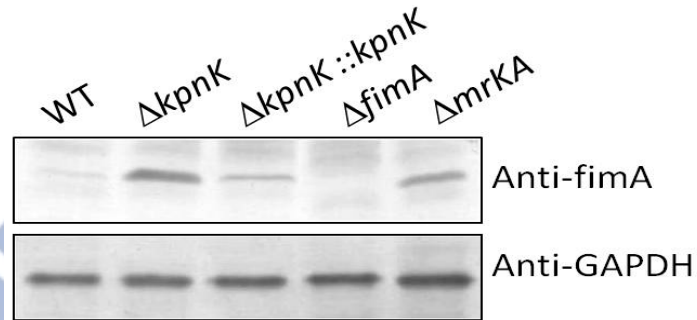
圖九、*kpnK* 基因缺損突變株在 *K. pneumoniae* CG43 中凝集酵母菌的活性分析
 細菌在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，將 200 μ l 的菌液混著等量體積的 1% 之
 酵母菌反應 5 分鐘，並在室溫下於 100 rpm 的震動儀(shaker)上晃動，並觀察其
 結果。 $\Delta mrkA$ 為本實驗確認酵母菌凝集能力之控制組。



(A)



(B)



(C)

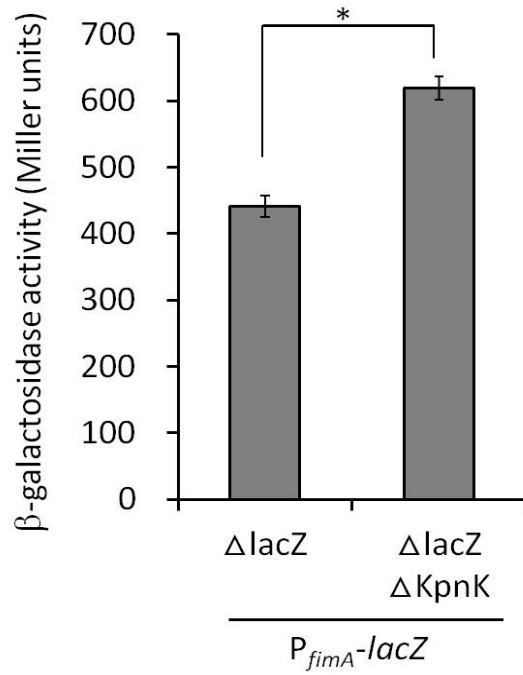


圖 十、在 *K. pneumoniae* CG43 中 *kpnK* 基因缺失對第一型線毛表現的影響及轉錄調控

(A)以 Vector NTI 軟體比對 KPCG43 及 KP NTUH-K2044 之 FimA，箭頭代表在 KP NTUH-K2044 中 FimA 受磷酸化的位置，且發現與 KPCG43 有高度相似性。

(B)取 500 μ l 隔夜培養後的菌液，以高熱破菌法破菌，取定量蛋白執行 SDS-聚丙烯醯胺膠電泳後，將膠上之蛋白質以電泳 100 分鐘 (140V、400 mA) 轉漬於聚偏二氟乙烯膜，最後利用呈色劑呈色。GAPDH 用以當作定量控制組， $\Delta fimA$ 、 $\Delta mrkA$ 為本實驗確認 FimA 抗體辨識位置之控制組。(C)細菌在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時後，40 倍稀釋於 LB 中培養至 OD₆₀₀ 於 0.8~0.9 間，藉 β -半乳糖苷酶分析啟動子的活性高低，並以 Miller unit 呈現。*代表 P value < 0.05。



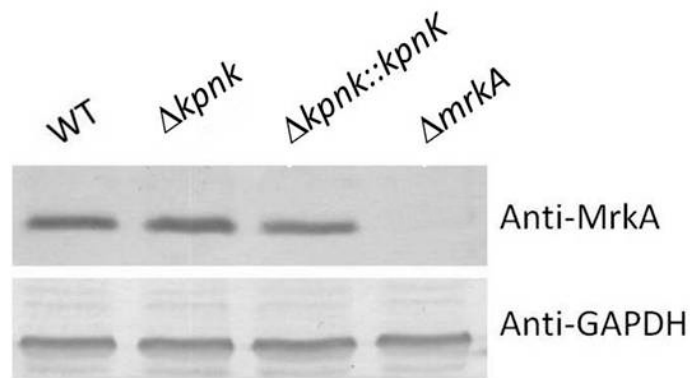
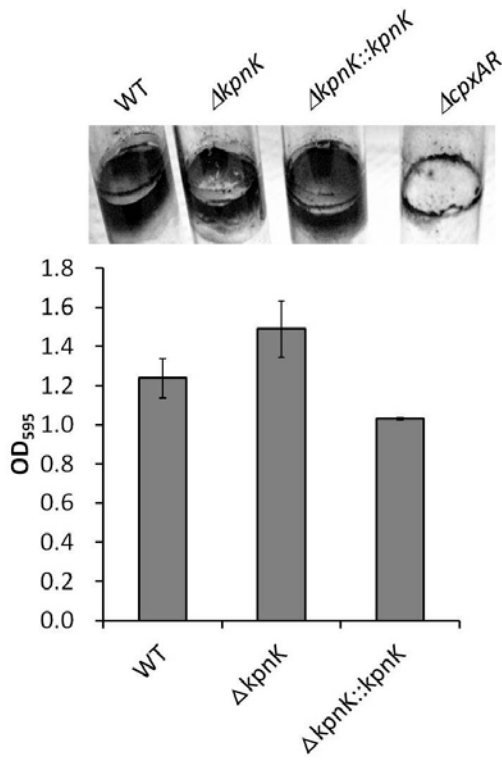


圖 十一、在 *K. pneumoniae* CG43 中 *kpnK* 基因缺失對第三型線毛表現的影響
 取 500 μ l 隔夜培養後的菌液，以高熱破菌法破菌，取定量蛋白經 SDS-聚丙烯醯
 胺膠電泳分離後，將膠上之蛋白質以電泳 100 分鐘（140V、400 mA）轉漬於聚
 偏二氟乙烯膜，最後利用呈色劑呈色。GAPDH 用以當作定量控制組， $\Delta mrkA$ 為
 本實驗確認 MrkA 抗體辨識位置之控制組。

(A)



(B)

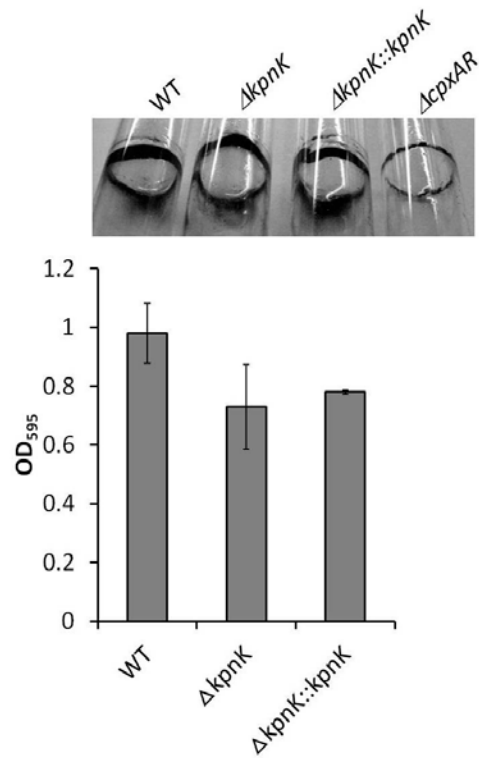
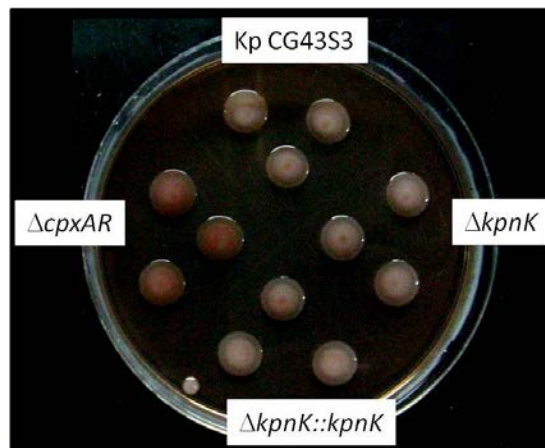


圖 十二、在 *K. pneumoniae* CG43 中 *kpnK* 基因的缺失對生物膜形成能力的影響。細菌在 LB 培養液、37°C 培養 16 小時後，200 倍稀釋至 LB，再分別以 (A) 靜置及 (B) 50 rpm 動態培養 24 小時，在(上圖)玻璃管中或在(下圖)96 孔盤內以 1% 結晶紫分別染色(上圖)15 分鐘或(下圖)60 分鐘，再以 95% 乙醇溶解，以 OD_{595} 定量生物膜。 $\Delta cpxRA$ 為本實驗確認對生物膜形成影響之控制組。

(A)



(B)

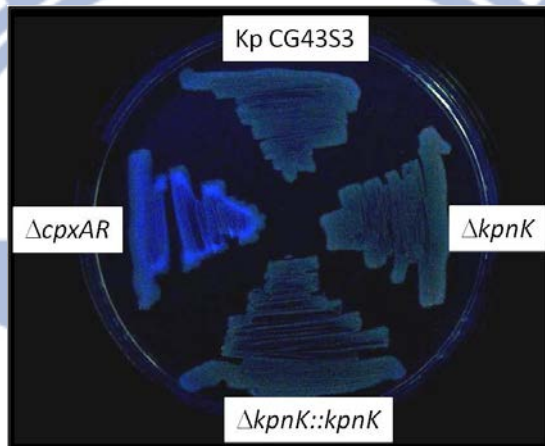


圖 十三、在 *K. pneumoniae* CG43 中 *kpnK* 缺損突變株的纖維素表現

分別將在 LB 培養液 37°C 培養 16 小時的細菌，(A) 以 10 μ l 一次三重復滴在 40 μ g/L 剛果紅(Congo red)或 (B) 塗在 20 μ g /L 鈣螢光(calcofluor)固態培養基觀察 EPS 或纖維素的分泌情形。當 (A) 剛果紅變成紅色代表有 EPS 或 (B) calcofluor 出現螢光代表有纖維素的產生。 Δ *cpxRA* 為本實驗確認對胞外基質影響之控制組。

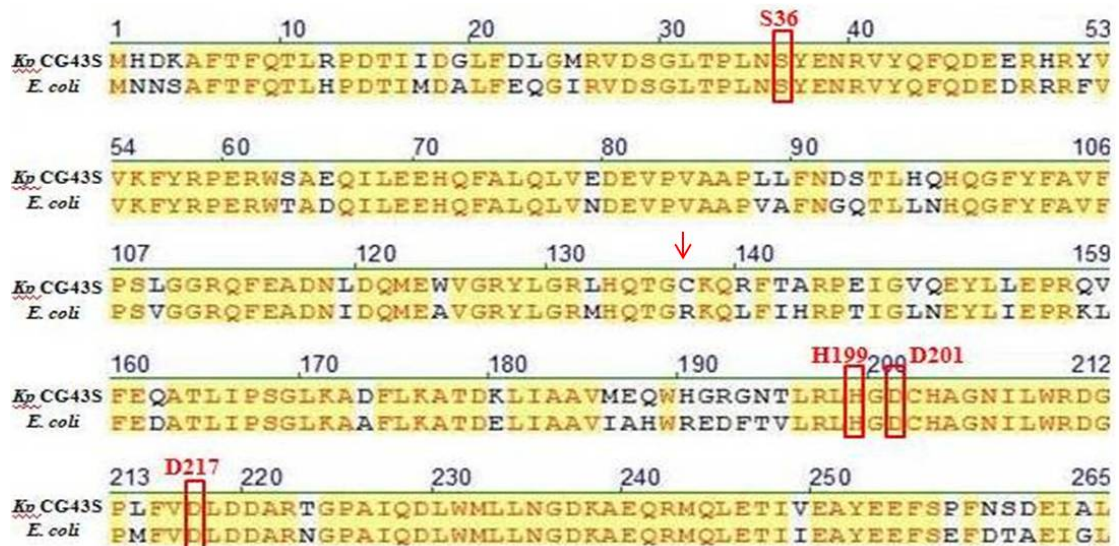


圖 十四、*kpnK* 在 *K. pneumoniae* CG43 及 *E. coli* 中胺基酸序列比對分析

以 Vector NTI 軟體比對 KPCG43 中的 KpnK 和 *E. coli* 中的 YihE。箭頭指出 KpnK 在 CG43 和 MGH78578 中唯一的差異，分別為由 Cys 和 Arg 組成（此圖無呈現 KPCG43 及 KP MGH78578 的 KpnK 序列比對，僅以箭頭表示有差異的位置），而此位置的差異同時也是 CG43 KpnK 和 *E. coli* YihE 的差異。

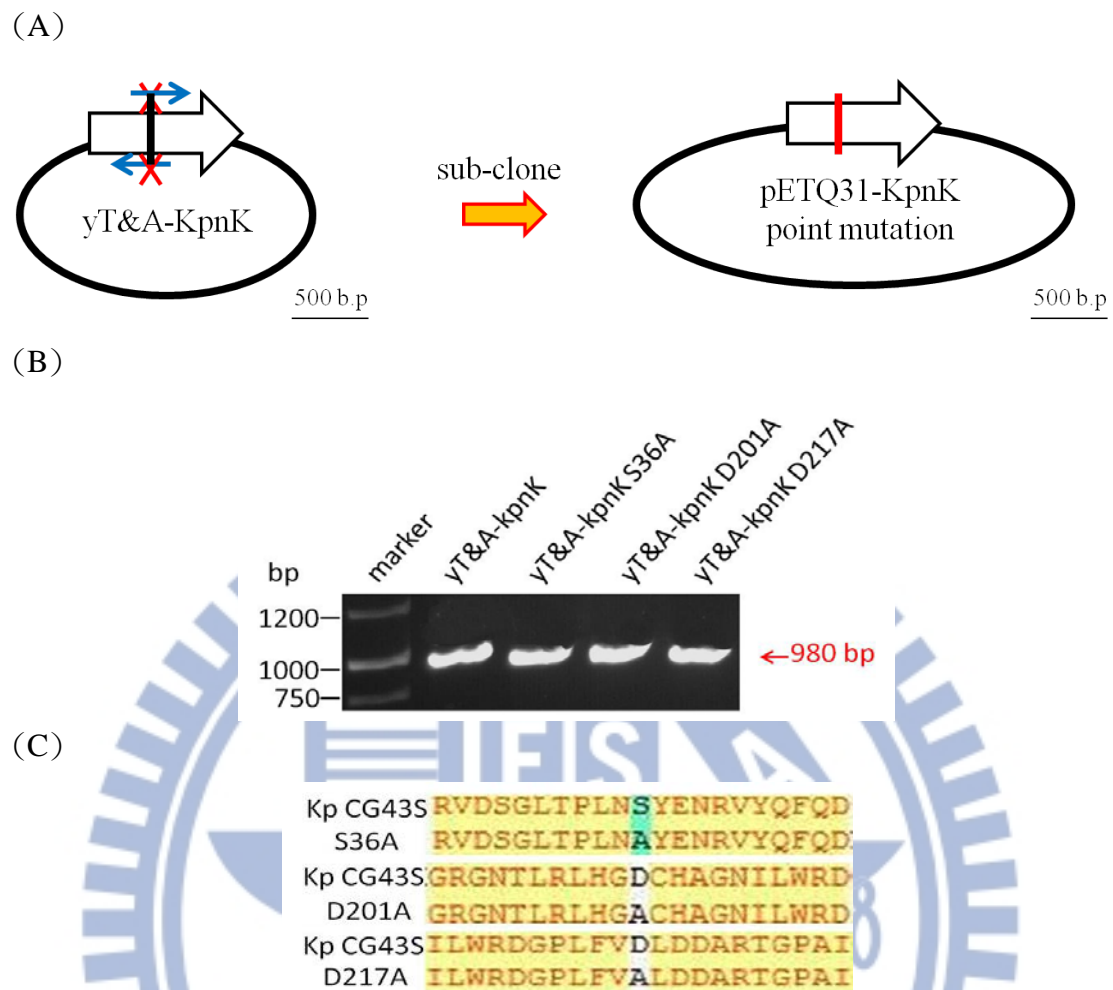


圖 十五、在 *K. pneumoniae* CG43 中 S36A、D201A、D217A 的定點突變質體建構及定序確認圖

(A) 建構以 pETQ31 為表現載體的 S36A、D201A、D217A 之模擬非磷酸化突變株示意圖。(B) 以鏈聚合酶連鎖反應顯示 980 bp 之 *kpnK* 各定點突變的結果，及(C)定序確認之結果。

(A)

(B)

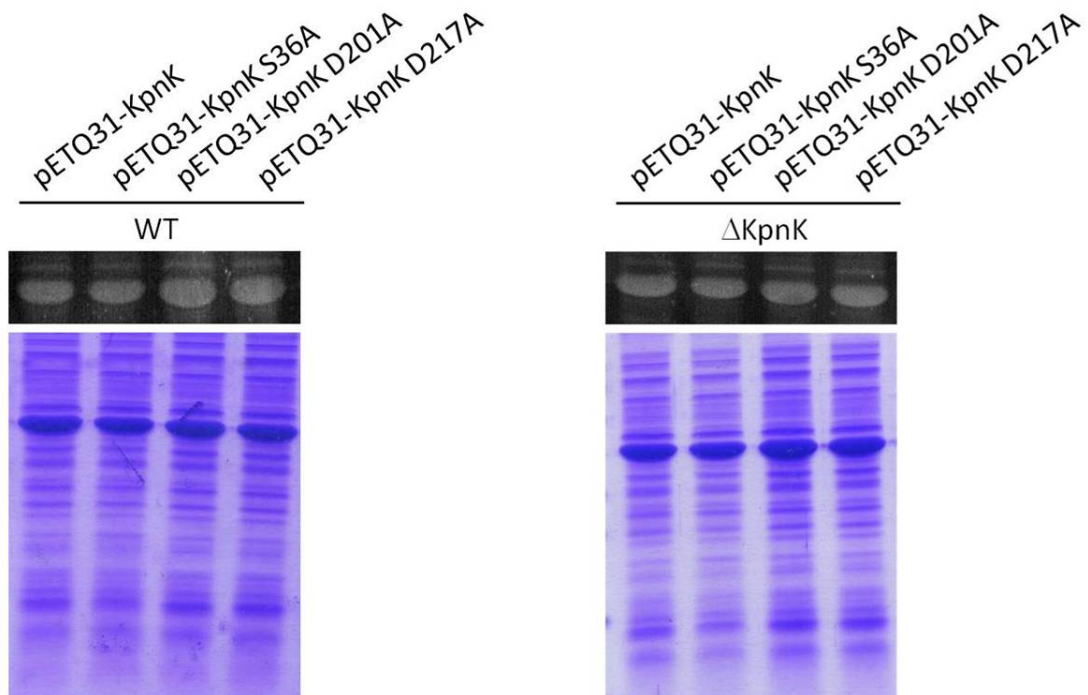
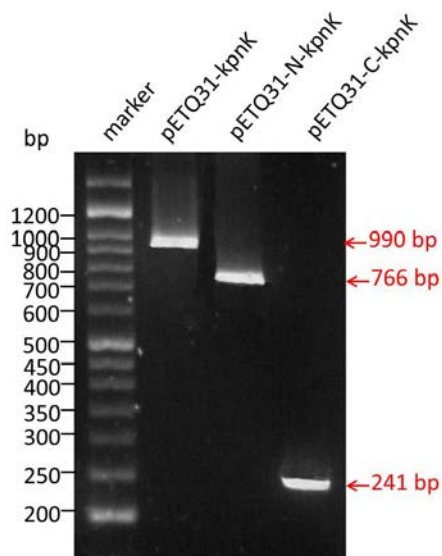


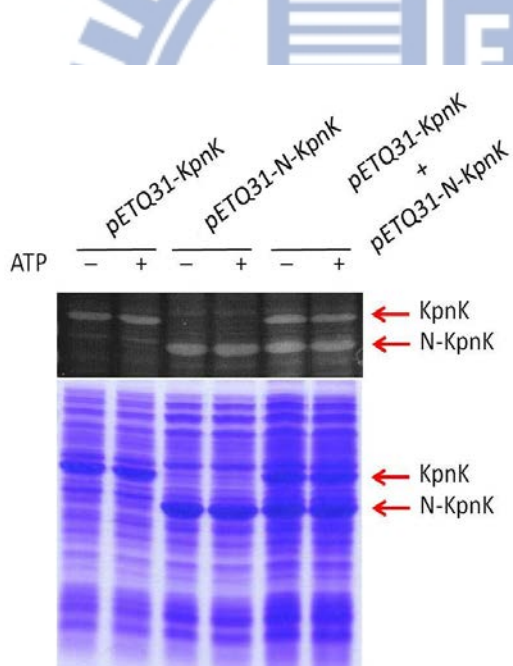
圖 十六、以 Pro-Q Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑分析 *K. pneumoniae* CG43 中 KpnK-S36A, -D201A, -D217A 定點突變對其酵素活性之影響

以 0.5 mM IPTG 分別將在 (A) CG43S3 及 (B) $\Delta kpnK$ 菌株中的定點突變蛋白誘導並以超音波震盪萃取後，利用 13.5% SDS-聚丙烯醯胺膠電泳分離後，上圖藉 Pro-Q Diamond 染劑進行分析，下圖以 Coomassie Blue 染劑定量蛋白質。

(A)



(B)



(C)

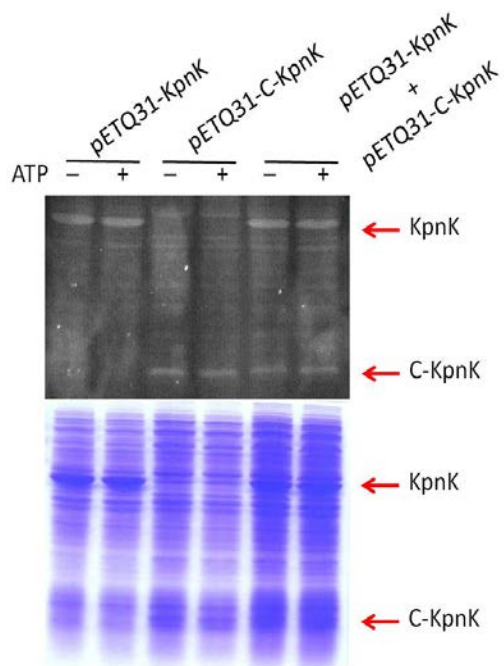


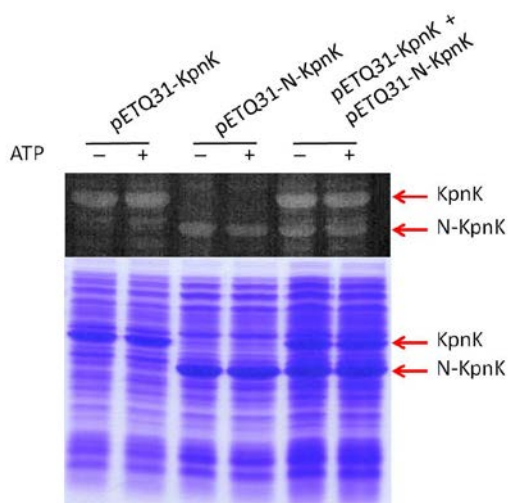
圖 十七、在 *K. pneumoniae* CG43 中分析 N-KpnK 及 C-KpnK 磷酸化之變化

(A) 建構以 pETQ31 為表現載體的 N 及 C 端 KpnK，藉鏈聚合酶連鎖反應並確認結果，箭頭為表示 990 bp 的 *kpnK*、766 bp 的 *N-kpnK* 及 241 bp 的 *C-kpnK*。在 KPWT 中，以 0.5 mM IPTG 分別將 (B) N 端及 (C) C 端蛋白誘導 4 小時並萃取後，在有無加入 ATP 的環境下，於 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘，隨後以 95°C 加熱 10 分鐘終止反應，利用電泳分離後，並藉 Pro-Q Diamond 染劑進行分析。

下圖以 comassie blue 染劑定量蛋白質。



(A)



(B)

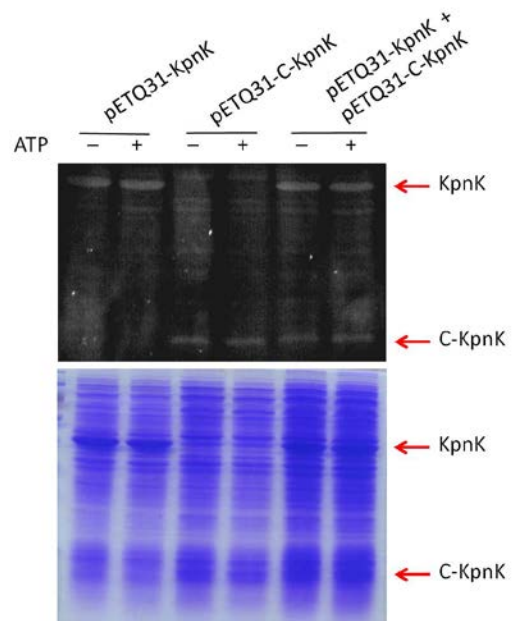
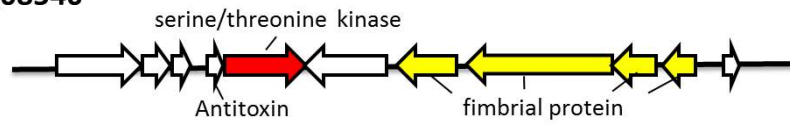


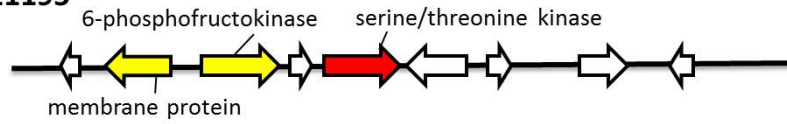
圖 十八、在 *K. pneumoniae* CG43 $\Delta kpnK$ 菌株中分析 N-KpnK 及 C-KpnK 磷酸化之變化

在 KP $\Delta kpnK$ 菌株中，以 0.5 mM IPTG 分別將 (A) N 端及 (B) C 端蛋白誘導並萃取後，在有無加入 ATP 的環境下，於 37°C 水浴槽中反應 30 分鐘，隨後以 95°C 加熱 10 分鐘終止反應，利用 SDS-聚丙烯醯胺膠電泳將蛋白質分離。上圖為藉 Pro-Q Diamond 染劑進行分析。下圖為以 comassie blue 染劑定量蛋白質。

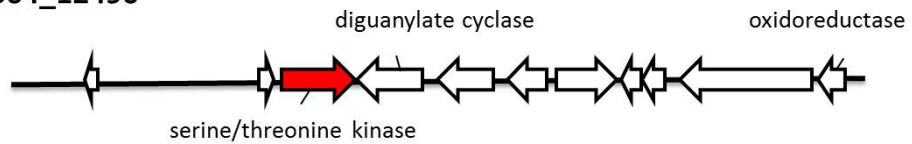
Kp CG43 D364_08540



Kp CG43 D364_11195



Kp CG43 D364_12490



Kp CG43 kpnK

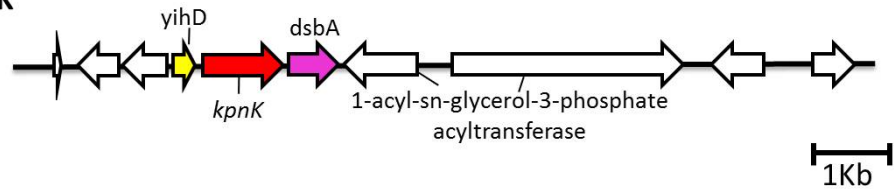
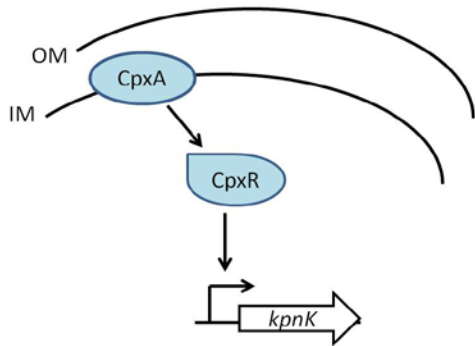


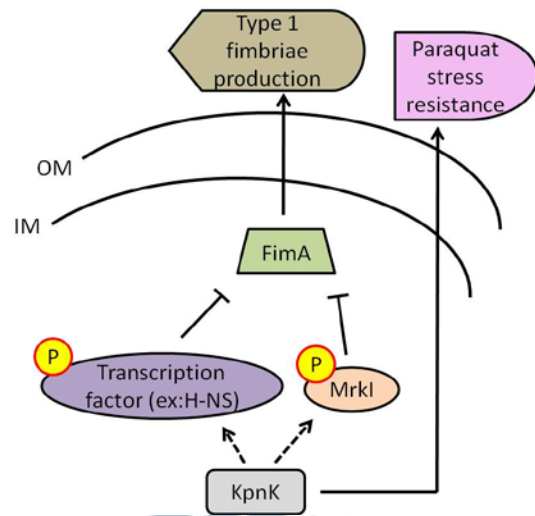
圖 十九、*K. pneumoniae* CG43 中共有 4 套 STK 基因

利用 NCBI 網站發現，除了 KpnK 外尚有其他 3 套 STK，分別為 D364_08540、D364_11195、D364_12490，除了 KpnK 已有少數文獻報導外，其他 3 套目前並無相關研究，有關特性尚待探討。

(A)



(B)



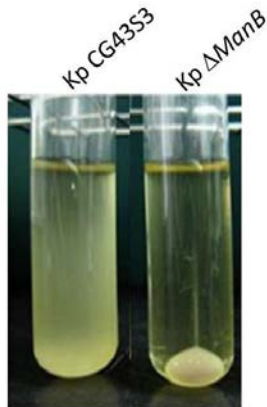
圖二十、*K. pneumoniae* CG43 中 *kpnK* 上下游的可能調控路徑圖

(A)為上游對 *kpnK* 所進行的調控。(B)為 *kpnK* 對下游可能進行的調控路徑。

OM(outer membrane)代表外膜，IM(inner membrane)代表內膜，→代表促進表現，

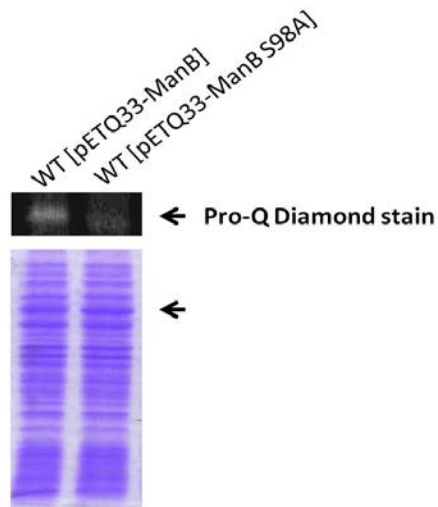
—| 代表抑制表現，--> 代表可能的調控路徑。

(A)



Sedimentation assay, 4000rpm, 5min
(萬舉豪, 2012)

(B)



(萬舉豪, 2012)

附錄 一、在 *K. pneumoniae* CG43 中 *manB* 的缺失突變體的 CPS 生合成及 ManB S98 影響其酵素活性

(A)利用 4000 rpm 離心沉降 5 分鐘後，觀察菌落沉澱狀況，發現 $\Delta manB$ 會降低 CPS 的生成。(B)以 0.5 mM IPTG 分別誘導 pETQ33-ManB 與其定點突變 pETQ33-ManBS98A 於 *K. pneumoniae* CG43 $\Delta manB$ 中，並以高熱破菌法破菌後取定量蛋白質執行 SDS-聚丙烯醯胺膠電泳分離，隨後再分別以(上圖)Pro-Q Diamond 磷酸化蛋白質螢光染劑與(下圖)Comassie Blue 染色並分析 ManB 磷酸化之狀況。

Gene name	Phosphopeptide sequence
<i>fimA</i>	GEVNAACAVpDAGSIDQTVQLGQVR LATAGSTSpSAVGFNIQLDDCDTTVATK LApTAGSTSSAVGFNIQLDDCDTTVATK YpYATGAATAGIANADATFK LATAGSp[TS]SAVGFNIQLDDCDTTVATK LAp[TAGS]TSSAVGFNIQLDDCDTTVATK
<i>fimD</i>	DVpTFQADAQGHGLSPCLTR

(Miao-Hsia Lin, 2009)

附錄二、在 KPNTUH-K2044 之磷酸蛋白質體(phosphoproteome)分析文獻指出，第 1 型線毛可能在 Asp、Ser、Thr、Tyr 可能都會受磷酸化(Miao-Hsia Lin *et al.*, 2009)，且包含了線毛主要的單位結構蛋白 FimA 及基座蛋白 FimD。

