



## 分枝杆菌丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknK 的功能研究

周怡璇<sup>1,2#</sup>, 周心童<sup>1#</sup>, 杨健<sup>1</sup>, 胡新玲<sup>1</sup>, 米凯霞<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>中国科学院微生物研究所, 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

<sup>2</sup>中国科学院大学存济医学院, 北京 101408

**摘要:**【目的】丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 K(Serine/Threonine protein kinases K)是分枝杆菌类似真核样的蛋白激酶, 预测在分枝杆菌的生长和新陈代谢等生理过程中起着重要的作用, 解析 PknK 的生物功能及作用机制, 将为结核病的防治提供一定的理论基础。【方法】通过基因敲除等遗传方法获得结核分枝杆菌疫苗株 BCG 的 *pknK* 敲除菌株  $\Delta pknK$ 、回补菌株 pMV361-*pknK*/ $\Delta pknK$  和过表达菌株 pMV261-*pknK*/BCG; 对获得的菌株进行生长曲线测定和抗药性分析; 通过 pulldown-MS 方法及生物信息学方法鉴定了 PknK 相互作用蛋白。【结果】监测各种分枝杆菌  $\Delta pknK$ 、pMV361-*pknK*/ $\Delta pknK$  和 pMV261-*pknK*/BCG 生长, 确定 PknK 负调控 BCG 生长; 抗药性分析显示 PknK 降低 BCG 的耐药性; pulldown-MS 方法显示 PknK 与丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknA 和双组分系统中的反应调节因子 MtrA、TrcR、MoxR 等蛋白相互作用。【结论】研究发现 PknK 调控分枝杆菌的生长和耐药性, 我们的研究为深入研究 PknK 在结核分枝杆菌中的功能奠定了基础。

**关键词:** 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, PknK, 生长, 耐药性

结核病(Tuberculosis, TB)是一种由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, *M. tb*)引起的慢性传染病, 可感染全身多个器官, 但是以肺部感染最为常见。根据世界卫生组织(World Health Organization, WHO)全球结核病疫病情况的调查, 截止至 2017 年, 全球约有 558000 例结核病患者,

其中 82% 的患者感染的是耐多药结核病(Multidrug-resistant tuberculosis, MDR-TB)<sup>[1]</sup>。报告表明, 结核病在今天仍然是严重威胁全球公共卫生安全的重大隐患, 防痨工作依然任重而道远。

1882 年, 德国细菌学家科赫首次证实了结核病的病原菌是结核分枝杆菌。1921 年, 针对结核

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFC1603900, 2017YFA0505901); 国家自然科学基金(31600114, 31700128)

\*通信作者。Tel: +86-10-64806082; Fax: +86-10-64807468; E-mail: mik@im.ac.cn

#并列第一作者。

收稿日期: 2019-01-30; 修回日期: 2019-03-25; 网络出版日期: 2019-07-11

病的疫苗——卡介苗(*Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin, BCG)开始在全球广泛使用, 对幼儿的播散性结核病和肺结核病具有良好的保护作用<sup>[2]</sup>。自 1944 年起, 链霉素、异烟肼、吡嗪酰胺、乙胺丁醇以及利福平的先后发现, 开启了抗生素药物的“黄金时代”<sup>[3]</sup>。然而, 随着越来越多药物的广泛应用, 结核分枝杆菌对这些药物的耐受也在不断增加, 并随之出现了能够耐受多种药物的耐多药结核病以及一些具有广泛耐药能力的广泛耐药结核病 (Extensively drug-resistant tuberculosis, XDR-TB)<sup>[4]</sup>。传统的药物在耐多药结核的治疗中疗效不佳, 药物研发受限于结核相关基础研究的匮乏。因此加深结核基础研究, 将为结核病治疗提供新的思路及理论基础。

在原核生物中磷酸化的信号级联反应广泛存在。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (Serine/Threonine Protein Kinases, STPKs) 是原核生物体一类重要的激酶<sup>[5]</sup>。STPKs 通过磷酸化细胞内的底物蛋白, 调节大多数信号转导通路, 对细胞的增殖和分化起着重要的控制作用<sup>[6-7]</sup>。在结核分枝杆菌中, STPKs 共有 11 种, 根据序列相似程度分为 5 个类型, 分别是 Clade I (PknA, PknB, PknL)、Clade II (PknD, PknE, PknH)、Clade III (PknF, PknI, PknJ)、Clade IV (PknG) 和 Clade V (PknK)<sup>[8]</sup>。PknK 是结核分枝杆菌中最大的 STPK, 其生物功能还有待发掘。目前对于 PknK 的研究主要集中在蛋白组数据的分析, 组学的分析结果显示 PknK 不是分泌蛋白<sup>[9]</sup>, 而是存在于结核分枝杆菌的细胞壁、细胞质及细胞膜上<sup>[10]</sup>。其存在的位置预示 PknK 在细菌内部的信号转导中起着重要的作用<sup>[11-12]</sup>。一项研究显示 PknK 在调控分枝杆菌的生长中起着重要的作用<sup>[13]</sup>。但是, 目前还缺乏系统性理解 PknK

在分枝杆菌生长等功能中发挥的作用。

分枝杆菌疫苗株 BCG 中 PknK 与结核分枝杆菌 H37Rv 中的 PknK 序列相同, 因此本研究以分枝杆菌疫苗株 BCG 为研究材料, 利用噬菌体介导的同源重组技术敲除 *pknK* 基因, 敲除菌株  $\Delta pknK$  的生长优于野生型 BCG, 敲除菌株  $\Delta pknK$  对检测的抗生素利福平、异烟肼、环丙沙星、红霉素的耐受程度明显下降。由于 PknK 的功能都是通过与其相互作用的蛋白发挥作用, 利用 pulldown-MS 方法, 我们获得了 PknK 相互作用候选蛋白, 包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknA、双组分系统中的反应调节因子、膜相关蛋白等, PknK 通过与这些蛋白的相互作用, 从而调控细菌生长和耐药性。本研究为深入探讨 PknK 在结核分枝杆菌中的功能奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株、细胞株、质粒和培养基:** 牛型结核分枝杆菌和大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  感受态细胞、BL21(DE3)感受态细胞, 人单核巨噬细胞系 THP-1 细胞株, 质粒 p0004s、phAE159、pMV261、pMV361、pET23b、pGEX-5x。BCG 培养所用培养基为 7H9 (液体, 含 10% ADS 与 0.05% Tween 80) 和 7H11 (固体, 含 10% ADS)。LB 培养基用于大肠杆菌培养。

**1.1.2 主要仪器和试剂:** PCR 仪 (北京东胜创新生物科技有限公司), EPS-300 电泳仪、HE-120 多功能水平电泳槽、VE 180 微型垂直电泳槽、Tanon-5200 全自动化学发光处理系统 (上海天能科技有限公司), 凝胶图像分析系统 (DNR Bio-imaging System 公司), ECM399 电转仪 (BTX

公司), 752 紫外可见分光光度计(上海菁华科技有限公司), EASY-nLCII™-nano-HPLC 系统(PROXEON), LTQ-Orbitrap 质谱仪(Thermo), HCl、NaCl、NaOH、葡萄糖、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、KCl、EDTA、DTT、IAM、TFA(国药集团化学试剂有限公司), 冰醋酸、异丙醇、无水乙醇、甲醇、甘油(北京化工厂), 胰蛋白胨、酵母提取物(OXOID), 琼脂粉、Tween-80、Tween-20、DMSO、利福平(Sigma), 卡那霉素、潮霉素、异烟肼、环丙沙星(BIO BASIC INC), 红霉素、PMSF、HEPES、IPTG、SDS(AMRESCO), 琼脂糖(Biowest), 7H9、7H11(Becton Dickinson), GoodView DNA 染料(上海赛百盛基因), T4 DNA 连接酶、Q5 DNA 聚合酶(NEB), Blue Plus Protein Marker、Trans2K Plus DNA Marker(全式金生物技术有限公司), 2×Power Taq PCR MasterMix(北京百泰克生物技术有限公司), Tris、甘氨酸(NOVON), 限制性内切酶: *Van91* I、*Pac* I、*Bam*H I、*Hind* III、*Eco*R I、*Hpa* I、*Not* I、*Xba* I(Thermo), GST、Ni-NAT Agarose(Qiagen), 抗体 His-Tag Mouse mAb、HRP 标羊抗小鼠 IgG 二抗、鼠抗 GST 标签单克隆抗体(普利莱生物技术有限公司)。

## 1.2 敲除菌株的构建

**1.2.1 敲除载体的构建和噬菌体的扩增:** 提取 BCG 的基因组, 并以该基因组为模板, 通过 PCR 扩增 *pknK* 的左右臂, 左臂引物是 *pknK*-LL 和 *pknK*-LR; 右臂引物是 *pknK*-RL 和 *pknK*-RR(表 1)。使用限制性内切酶 *Van91* I 对扩增产物 *pknK*-L(左臂)和 *pknK*-R(右臂)进行酶切, 回收酶切产物, 定向克隆至中间载体 p0004S 上, 并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 培养基(潮霉素 100 mg/L)培养, 挑选单菌落提质粒测序, 进而获得测序正确的载体

p0004-*pknK*。使用 *Pac* I 分别对 p0004-*pknK* 和 phAE159 进行酶切, 回收酶切产物并连接, 将体外包装获得的完整质粒转化至 HB101 感受态中, LB 培养基(潮霉素 100 mg/L)培养, 最终获得正确的多元件穿梭载体 phAE159-0004-*pknK*-L/R。将 phAE159-0004-*pknK*-L/R 电击转化耻垢分枝杆菌标准菌株(mc<sup>2</sup> 155), 7H11 平板上(潮霉素 75 mg/L) 30 °C 恒温培养获得噬菌斑, 扩增噬菌体, 提高滴度至 10<sup>10</sup>/mL。

**1.2.2 基因敲除:** 接种 BCG 至 7H9 培养基中, 37 °C 摇床培养至对数期( $OD_{600}$  为 0.6–0.8), 用 MP Buffer 清洗菌体 2 次, 再用 7H9 培养基重悬, 并与之前得到的噬菌体混匀, 37 °C 恒温箱中培养 24 h, 全部均匀涂布在 7H11 平板上(潮霉素 75 mg/L), 7H9 培养基(潮霉素 75 mg/L) 37 °C 恒温培养 2–3 周。挑选单克隆鉴定。

**1.2.3 敲除菌株的验证:** 分别设计 3 对鉴定引物(表 1), 即目的基因内部引物、目的基因左右臂远端引物和载体内部引物, 并通过 PCR 验证目的基因是否被敲除(图 1)。若目的基因被正确敲除, 则内部引物 *pknK*-InL 和 *pknK*-InR 不能成功扩增, 同时远端引物和载体内部引物能进一步确认载体片段是否插入正确部位。

**1.2.4 回补菌株的构建:** 以 BCG 基因组为模板, PCR 实验扩增目的基因 *pknK*, 引物(表 1)为 *pknK*-F 和 *pknK*-R。使用限制性内切酶 *Hpa* I 和 *Hind* III 对扩增产物和载体 pMV361 进行酶切, 并连接酶切产物, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 培养基(卡那霉素 50 mg/L)培养。挑选单菌落进行基因测序, 将测序正确的 pMV361-*pknK* 电击转入  $\Delta$ *pknK* 感受态细胞中, 得到回补菌株 pMV361-*pknK*/ $\Delta$ *pknK*。

表 1. 实验用引物汇总表  
Table 1. Oligonucleotide primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Purposes
<i>pknK</i> -LL	TTTTTTTTCACAAAGTGTGACACACACTCCATCGCTC	Clone the left arm of <i>pknK</i>
<i>pknK</i> -LR	TTTTTTTTCACCTTCGTGATCCAGCCTCAAG CAGTTCC	
<i>pknK</i> -RL	TTTTTTTTCACAGAGTGTCTTTCAGCCACAAGACGAT	Clone the right arm of <i>pknK</i>
<i>pknK</i> -RR	TTTTTTTTCACCTTGTGGGCCTGAAGCTTGTCCAGAT	
<i>pknK</i> -InL	CTGCTTTGCGCTTCGATAACC	To confirm <i>pknK</i> knocked out
<i>pknK</i> -InR	TCTGCACGATTGCCAGAAGT	
<i>pknK</i> -LLL	CGGCAGTATCGAGCCTATGG	To confirm <i>pknK</i> knocked out
<i>pknK</i> -RRR	CCTGTGGAAACTGGTGCCTA	
I-R(F)	GACACACCAACAGCATGGT	To confirm <i>pknK</i> knocked out
I-L(R)	TCGACGACCCTAGAGTCC	
<i>pknK</i> -F	CCCAAGCTTTGACCGACGTTGATCCGCACGCG	To clone <i>pknK</i> fragment
<i>pknK</i> -R	GCTCAATTGCAAGATCTGCACGACGATAACG	
pET23b- <i>pknK</i> -F	CCCAAGCTTACCGACGTTGATCCGCACGCG	To clone <i>pknK</i> fragment
pET23b- <i>pknK</i> -R	ATTTGCGGCCGCGGCCAGTCCCGCATCGACCAG	
<i>pknA</i> -F	CCGGAATTCAGCCCCGAGTTGGCGTGAC	To clone <i>pknA</i> fragment
<i>pknA</i> -R	CGCGGATCCTCATTGCGCTATCTCGTATCGGG	

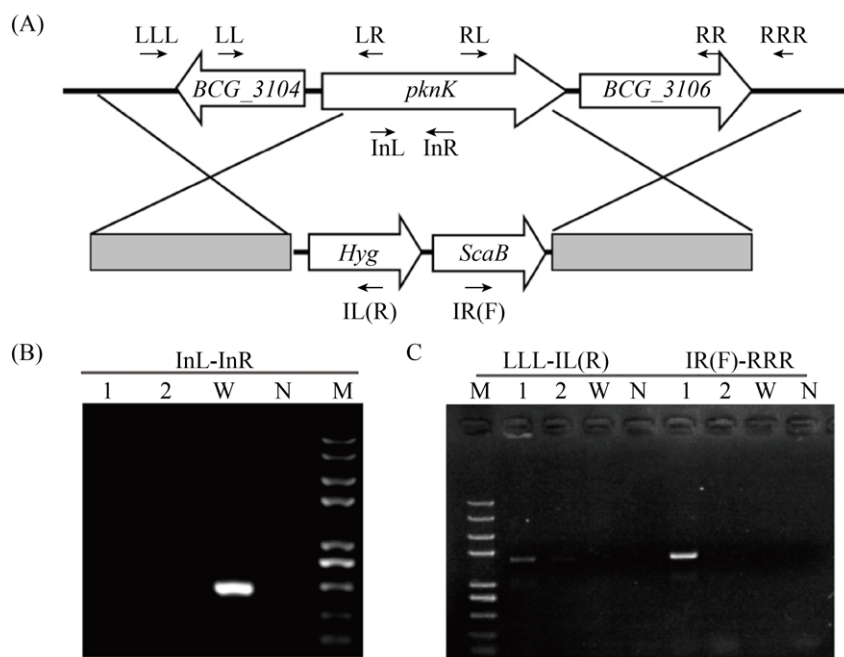


图 1. 敲除菌株的构建模型及鉴定图谱

Figure 1. Generation of the  $\Delta pknK$  strain. A: Genomic organization of the *pknK* gene locus. Genes are shown as large arrows in their orientation. The small arrows show the primer pairs for PCR. B: The location of hygromycin cassette is indicated (bottom panel). No PCR product was obtained using primers InL and InR to amplify the coding sequences of *pknK*. C: The PCR products of the upstream and downstream regions of *pknK* were amplified using the primer pairs LLL/IL(R) and IR(F)/RRR, respectively.

### 1.3 药物胁迫实验

培养野生型菌株 BCG、敲除菌株 $\Delta pknK$  至  $OD_{600}$  为 0.8–1.0, 将上述菌液转接于新鲜培养基中, 调节  $OD_{600}$  至 0.1, 加入抗结核一、二线药物利福平(Rifampicin)、异烟肼(Isoniazid)、环丙沙星(Ciprofloxacin)、红霉素(Erythromycin), 进行药物处理, 同时设立无药物处理对照组。37 °C 培养 72 h, 取药物处理组和对照组菌液测  $OD_{600}$ 。将药物处理组结果与对照组结果进行对比, 二者比值越大, 则菌株对该药物的耐药性越大, 反之则耐药性越小。

### 1.4 过表达菌株的构建

以 BCG 基因组为模板, PCR 实验扩增目的基因  $pknK$ , 引物(表 1)为  $pknK$ -F 和  $pknK$ -R。使用限制性内切酶  $Hpa$  I 和  $Hind$  III 对扩增产物和载体 pMV261 进行酶切, 并连接酶切产物, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 培养基(卡那霉素 50 mg/L)培养。挑选单菌落测序, 将测序正确 pMV261- $pknK$  与 pMV261 分别电击转入 BCG 感受态细胞中。挑选单菌落, 并进行 PCR 验证, 得到过表达菌株 pMV261- $pknK$ /BCG 及对照菌株 pMV261/BCG。

### 1.5 生长曲线测定

接种野生型 BCG、敲除菌株 $\Delta pknK$ 、回补菌株 pMV361- $pknK$ / $\Delta pknK$ 、过表达菌株 pMV261- $pknK$ /BCG 及对照菌株 pMV261/BCG 至 7H9 培养基中, 每个菌株至少 3 组平行, 37 °C 摇床培养至对数期( $OD_{600}$  为 0.6–0.8)。分别调  $OD_{600}$  达到 0.1, 37 °C 摇床培养, 每隔 12 h 取样测 1 次  $OD_{600}$  值, 记录实验数据, 绘制生长曲线。

### 1.6 pulldown-MS 实验

**1.6.1 构建 PknK 表达菌株:** 以 BCG 基因组为模板, 利用 PCR 扩增目的基因  $pknK$ , 引物(表 1)为 pET23b- $pknK$ -F 和 pET23b- $pknK$ -R。使用限制性内

切酶  $Not$  I 和  $Hind$  III 对扩增产物和载体 pET23b 进行酶切, 并连接酶切产物, 转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 培养基(氨苄青霉素 100 mg/L)培养。挑选单菌落测序, 将测序正确 pET23b- $pknK$  电击转入 BL21(DE3)感受态细胞中, 得到 PknK 的表达菌株。

**1.6.2 体外 pulldown:** 将 PknK 表达菌株进行转接, 并进行异丙基硫代半乳糖苷(IPTG, 0.5 mmol/L)诱导表达。低温收菌、冰上超声、低温离心, 收取上清与 His-beads 混合孵育, 然后用磷酸盐缓冲液冲洗, 得到 PknK 和 His-beads 的混合物。同时收集生长至对数期的 BCG 菌体, 裂解菌体获得总蛋白样品, 与 PknK-His-beads 的混合物进行孵育、清洗、洗脱, 将洗脱液进行 SDS-PAGE, 进行银染。与对照蛋白对比, 选取特异性条带切胶, 并进行质谱(Mass spectrometry, MS)检测。

**1.6.3 质谱检测:** 将切下的胶体用洗脱剂去除染料颜色, 然后用二硫苏糖醇(DL-Dithiothreitol, DTT, 25 mmol/L)还原蛋白质, 并用碘乙酰胺(55 mmol/L)烷基化蛋白质。之后加入胰酶, 置于 37 °C 温箱中, 在碳酸氢铵(50 mmol/L)中过夜消化。用 1%的三氟乙酸在 50%的乙腈水溶液中提取多肽 2 次, 用真空离心蒸发浓缩器浓缩, 0.1%甲酸的缓冲液中复溶。以 0.25  $\mu$ L/min 的流速流经 EASY-nLCII<sup>TM</sup>-nano-HPLC 系统, 该系统直接与 LTQ-Orbitrap 质谱仪相连。首先使用 Xcalibur 2.0.7 软件对数据进行采集, 然后使用 Proteome Discover 软件对原始数据文件进行处理, 生成峰值列表文件。实验独立重复 3 次, 用于 MS 检索的蛋白数据库从 UniProt 下载。

### 1.7 体外蛋白互作验证

**1.7.1 构建 PknA 表达菌株:** 以 BCG 基因组为模板, 使用 PCR 扩增目的基因  $pknA$ , 引物(表 1)为  $pknA$ -F 和  $pknA$ -R。使用限制性内切酶  $EcoR$  I 和  $Xba$  I 对扩增产物和载体 pGEX-5x 进行酶切, 连

接酶切产物并转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞, LB 培养基 (氨苄青霉素 100 mg/L) 培养。挑取单菌落测序, 将测序正确的 pGEX-5x-*pknA* 热激转化 BL21(DE3) 感受态细胞, 得到 PknA 表达菌株。

**1.7.2 体外 pulldown 实验:** IPTG (0.5 mmol/L) 低温诱导 PknK 表达菌株, 利用 His-beads 纯化得到 PknK 蛋白; IPTG (0.5 mmol/L) 低温诱导 PknA 表达菌株, 利用 GST-beads 纯化得到 PknA 蛋白。将二者按摩尔浓度 1:1 混合, 在 4 °C 共孵育 1 h, 然后将混合液通过 GST-beads。收取洗脱液进行 SDS-PAGE 检测, 并利用抗 His 特异性抗体进行 Western blotting 检测。

## 2 结果和分析

### 2.1 分枝杆菌 *pknK* 敲除菌株的构建

首先, 我们利用分枝杆菌噬菌体特异转导法 (Mycobacteriophages specialized transduction)<sup>[13]</sup> 构建候选基因的敲除菌株 (图 1-A)。随机挑选 2 个克隆 (分别标注 1、2) 培养并提取基因组 DNA, 通过

特异性 PCR 扩增进行验证: 利用引物 InL/InR 检测 *pknK* 基因内部片段, 在野生型 BCG 菌株中可以检测到 PCR 产物, 在 *pknK* 敲除菌株中没有检测到 PCR 产物 (图 1-B)。利用载体上的引物和 *pknK* 左右臂远端引物进行扩增, 样品 1 获得了 PCR 产物, 说明潮霉素基因置换了 *pknK*, 基因敲除成功 (图 1-C), 我们获得了敲除菌株  $\Delta pknK$ 。

### 2.2 PknK 负调控 BCG 生长

获得敲除菌株  $\Delta pknK$  后, 我们首先检测了 PknK 对细菌的生长是否有影响。 $\Delta pknK$  和 BCG 接种于 7H9 培养基中培养, 每 12 h 取样测定  $OD_{600}$  值。在前期 48 h,  $\Delta pknK$  生长比 BCG 稍微有生长优势; 在后期, 与野生型 BCG 比, 敲除菌株  $\Delta pknK$  有明显的生长优势; 回补菌株 pMV361-*pknK*/ $\Delta pknK$  可以部分回补 PknK 介导的快速生长, 其生长速度介于两者之间 (图 2-A)。同时, 过度表达 *pknK* 菌株 pMV261-*pknK*/BCG 的生长速度低于其对照菌株 pMV261/BCG (图 2-B)。生长曲线检测结果说明 PknK 负调控 BCG 生长。

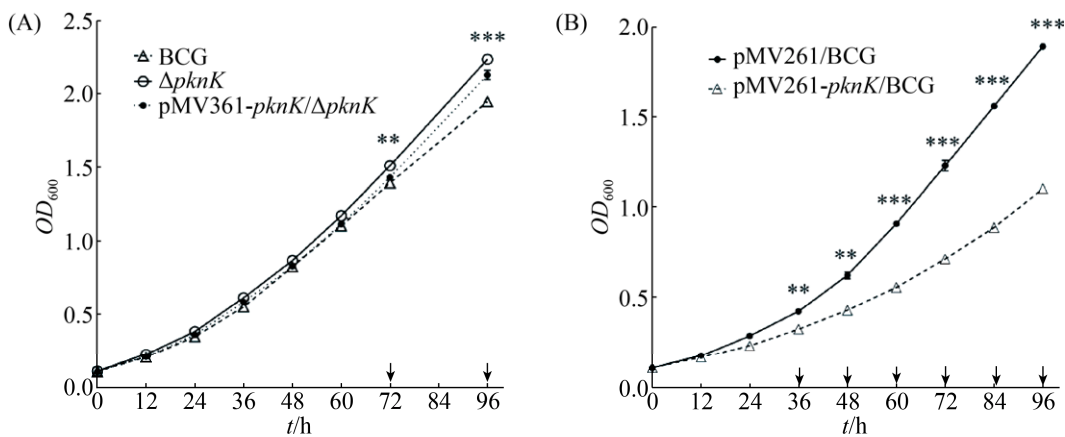


图 2. PknK 负调控 BCG 的生长

Figure 2. PknK negatively regulate BCG growth. A: The mycobacterial strains, BCG,  $\Delta pknK$  and pMV361-*pknK*/ $\Delta pknK$ , were incubated in 7H9 medium and the growth rates were determined. B: The mycobacterial strains, pMV261-*pknK*/BCG and pMV261/BCG were growth in 7H9 medium with kanamycin. Representative growth curves are shown. Data are shown as the mean $\pm$ SD of three replicates. A significant difference in the  $OD_{600}$  was observed between the strain pair  $\Delta pknK$  and BCG or pMV261-*pknK*/BCG and pMV261/BCG as pointed by arrow (two-sided student's *t*-test, \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ ). Data represent the results of three independent experiments.

### 2.3 PknK 降低 BCG 耐药性

细菌的生长状态与药物的作用密切相关。由于 PknK 负调控 BCG 生长, PknK 可能会影响 BCG 的药物耐受性, 因此我们检测了野生型菌株 BCG 和敲除菌株  $\Delta pknK$  对抗结核药物的耐药性。检测的药物包括一线药物利福平和异烟肼, 治疗多耐药结核药物红霉素和环丙沙星。因为 PknK 本身影响细菌的生长, 为了分析 PknK 对 BCG 药物敏感性的影响, 我们采用药物处理  $OD_{600}$  值与非药物处理组  $OD_{600}$  值的比例作为评估指标。调节菌液的  $OD_{600}$  到 0.1 时, 把培养物分为 2 份, 一份添加药物, 继续培养 72 h, 检测  $OD_{600}$  值(处理组, treatment group); 同时, 另一份培养物, 在没有药物处理的条件下培养, 72 h 后检测  $OD_{600}$  值(对照组, control group), 处理组的  $OD_{600}$  值与对照组的  $OD_{600}$  值比值显示药物处理对菌株生长的影响。图 3 结果显示, 敲除菌株  $\Delta pknK$  对利福平、异烟肼、环丙沙星、红霉素的耐受程度明显下降。该结果显示, PknK 减低 BCG 耐药性。

### 2.4 系统分析 PknK 相互作用的蛋白

为了进一步了解 PknK 的生物功能, 我们利用 pulldown-MS 的方法筛选与 PknK 蛋白相互作用的候选蛋白(图 4-A)。为了获得直接与 PknK 相互作用的蛋白, 我们在大肠杆菌中表达了 PknK 蛋白, 与 Ni-NTA Beads 孵育, 用磷酸盐缓冲液冲洗获得 Ni-NTA beads-PknK 后, 与 BCG 裂解物孵育, 清洗后 SDS-PAGE 分离复合物。因为银染的敏感度比较高, 可能会显示出部分非特异性条带, 因此用于 PknK 功能不相关的蛋白进行对照以排除非特异性蛋白条带。MSMEG\_2415 是一种蚯蚓血红蛋白, MSMEG\_1641 是一种五肽重复序列蛋白,

都不是 PknK 的底物<sup>[5,11]</sup>, 因此作为负对照。表达、纯化 MSMEG\_2415、MSMEG\_1641 和 PknK 蛋白。银染的 SDS-PAGE 中, 红色箭头分别标记靶蛋白: MSMEG\_2415、PknK 和 MSMEG\_1641; 黑色箭头所示为 PknK 经过体外 pulldown 后的特异条带, 切割特异条带胶体进行质谱分析(图 4-B)。经过 3 次独立实验, 我们筛选了部分 score 值大于 10、Unique Peptides 大于 2 的蛋白数据, 按 score 大小进行排序(表 2), 得到了多个在体外可能与 PknK 结合的蛋白质。获得的 PknK 相互作用的候选蛋白与细菌生长、转录调控等功能相关, 包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 PknA、双组分系统中的反应调节因子、膜相关蛋白等(表 2)。

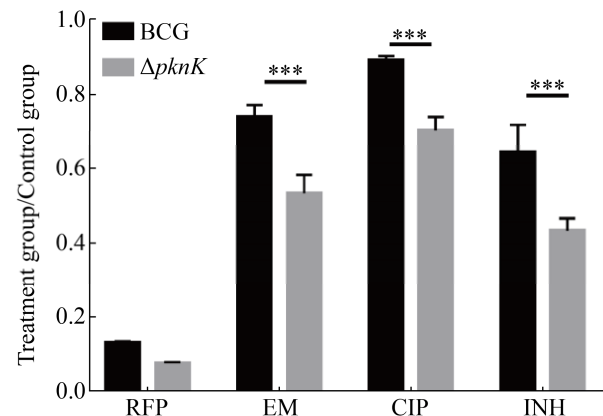


图 3. PknK 降低 BCG 的耐药性

Figure 3. PknK decreases antibiotic susceptibility in mycobacteria. The ratio of the  $OD_{600}$  of the treatment group to the  $OD_{600}$  of the control group indicates the antibiotic susceptibility in mycobacteria. The results are presented as the mean $\pm$ SD of three replicates. A significant difference in ratio was observed between  $\Delta pknK$  and BCG (two-sided Student's *t*-test, \*\*\*:  $P < 0.001$ ). Data represent the results of three independent experiments. RFP: rifampicin; EM: erythromycin; CIP: ciprofloxacin; INH: isoniazid.

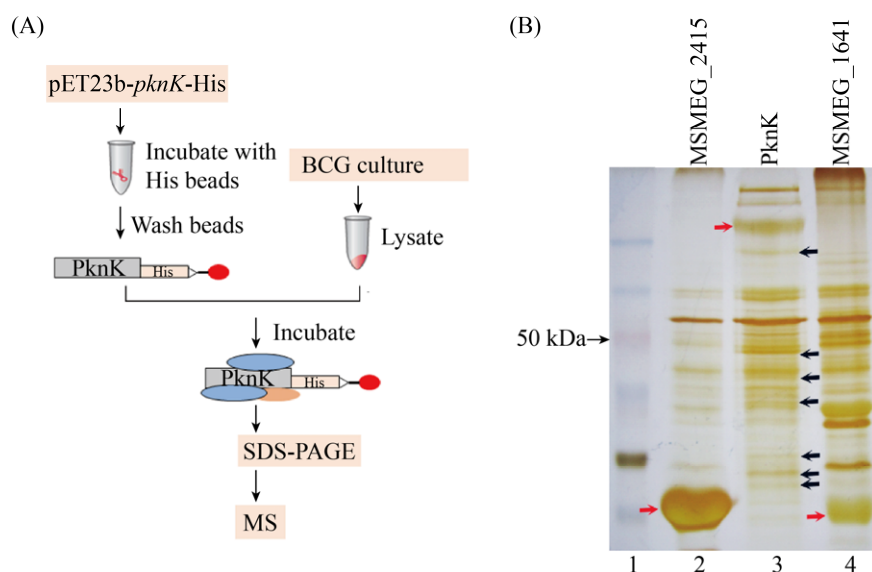


图 4. Pulldown-MS 方法鉴定 PknK 互作蛋白

Figure 4. Identification of PknK interacting proteins using the pulldown-MS assay. A: The workflow for the PknK pulldown-MS assay. B: Capture and enrichment of specific binding proteins by bait proteins. Lane 1, molecular weight marker proteins. MSMEG\_2415 (lane 2), PknK (lane 3), MSMEG\_1641 (lane 4) are corresponding bait proteins, respectively. The corresponding pulldown proteins were separated by SDS-PAGE gel and visualized by silver staining. The red arrows indicate the bait proteins. The black arrows indicate the PknK interacting proteins pulldown by PknK.

表 2. PknK pulldown-MS 方法鉴定的 PknK 相互作用候选蛋白

Table 2. PknK interacting proteins identified by PknK pulldown-MS

Accession	Gene name	Description	Score	Coverage	Unique peptides	Function
A0A0H3M1M2	BCG_0505c	Probable transcriptional regulatory protein	902.78	67.09	29	Transcription
A1KKE3	pafA	Proteasome accessory factor A	492.99	61.07	25	Proteasome system
A0A0H3M2C1	coaX	Type III pantothenate kinase	283.76	48.53	10	Kinase
A0A0H3MBY6	BCG_3824c	Putative two component transcriptional regulatory protein	98.21	47.86	6	Transcription
A0A0H3MAR7	mtrA	Two component sensory transduction transcriptional regulatory protein mtrA	95.04	50.88	8	Transcription
A0A0H3M2D6	BCG_0074c	Probable transcriptional regulatory protein	78.43	43.03	8	Transcription
A0A0H3M3T1	trcR	Two-component system regulator trcR	42.43	28.40	5	Transcription
A0A0H3M8I4	pfkA	ATP-dependent 6-phosphofructokinase	39.25	24.49	6	Kinase
A0A0Y1BRF1	BCG_1541	Transcriptional regulator MoxR1	30.04	29.30	6	Transcription
A0A0H3M2C1	pknA	Transmembrane serine/threonine-protein kinase A	17.67	22.05	7	Kinase
A0A0H3M0V2	BCG_0215	Probable conserved MCE associated membrane protein	14.06	15.57	2	Membrane



在质谱分析筛选出的靶标蛋白中,我们挑选了 PknA 与 PknK 进行了体外 pulldown 实验验证。首先,我们构建了 PknA 的表达质粒 pGEX-5x-*pknA*, 并转化得到表达菌株。纯化的 GST-PknA 与 PknK-His 混合孵育,用 GST-tag 进行 pulldown, 收集洗脱液并进行 Western blotting 检测。结果显示, GST-PknA 与 PknK-His 共孵育时,最终的洗脱液能够被 His 抗体检测到,即带有 GST-tag 的 PknA 能够与 PknK 结合,并使一同被洗脱下来的携带有

His-tag 的 PknK 被 His 抗体检测到;而 GST 与 PknK-His 共孵育时,最终的洗脱液不能被 His 抗体检测到,即单独表达的 GST 无法与 PknK 结合(图 5-A)。同时,洗脱液中的 GST-PknA 及 GST 被 GST 抗体检测到,而 PknK-His 不能被检测到,说明实验系统是有效的(图 5-B)。该实验证明,在体外条件下, PknK 可以与 PknA 蛋白进行相互作用,所以 PknK 可能是通过与 PknA 等蛋白相互作用从而影响细菌的生长(图 6)。

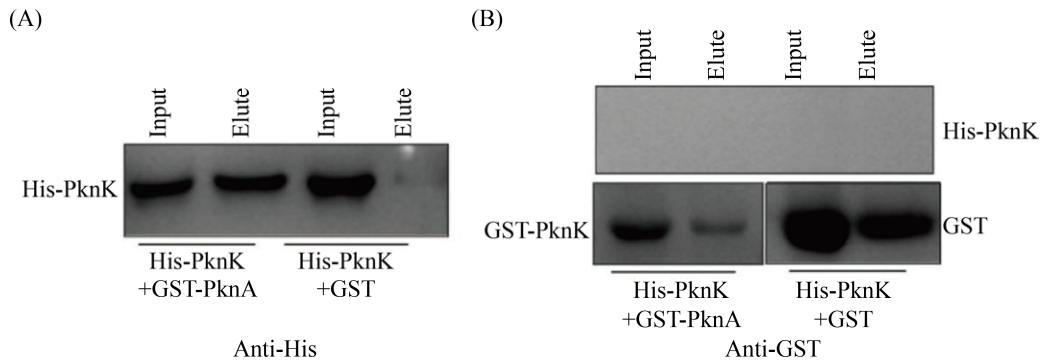


图 5. PknA 与 PknK 相互作用的体外验证

Figure 5. PknK interacts with PknA. Examination of the interaction between PknK (A) and PknA (B) using affinity tagged pulldown assays. The purified proteins were obtained from BL21(DE3) cells expressing GST-PknA or PknK-His. The corresponding purified proteins were diluted 100-fold and 2  $\mu$ L of the diluted sample were loaded as the input. The interactions were examined by Western blotting using an antibody against GST (for PknA) or His (for PknK). Data represent the results of three independent experiments.

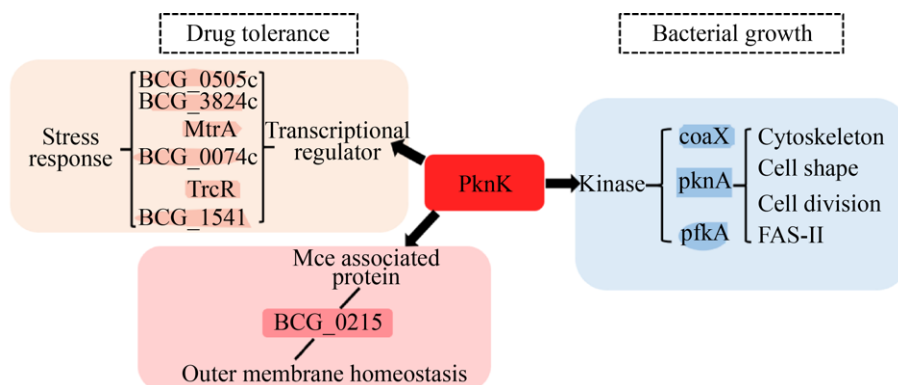


图 6. PknK 参与通路的模式图

Figure 6. Model of the effect of PknK on the growth and antibiotic susceptibility in mycobacteria.

### 3 讨论

丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 K (Serine/Threonine protein kinases K, PknK) 是分枝杆菌类似真核样的蛋白激酶, 在分枝杆菌的生长和新陈代谢等生理过程中起着重要的作用<sup>[5,14-18]</sup>。由于 STPKs 在分枝杆菌的生长及在细菌感染的宿主中存活起着重要的作用, 它们是潜在的药物靶点<sup>[6,19]</sup>。PknK 是分枝杆菌丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族中重要的成员之一, 目前关于其功能的研究尚不全面。本研究显示, PknK 对 BCG 的生长具有负调控作用; 同时, 敲除 *pknK* 基因会导致多重抗生素耐药性, 说明 PknK 在分枝杆菌对多种抗生素耐药中起着重要作用。利用 pulldown-MS 方法, 获得与 PknK 相互作用的候选蛋白, 这些候选蛋白与细菌生长、转录调控等功能相关。我们的工作为深入研究 PknK 在分枝杆菌的分子调控机制奠定了基础。

我们的研究与之前的报道一致<sup>[20]</sup>, PknK 调控分枝杆菌的生长。研究显示敲除 *pknK* 基因的 BCG 菌株 ( $\Delta pknK$ ) 在生长速度方面明显快于野生型 BCG, 回补菌株可以部分回补减低生长速度 (图 2-A)。过表达菌株 pMV261-*pknK*/BCG 的生长速度要明显慢于对照组菌株 (图 2-B)。分枝杆菌的抗生素敏感性与细菌生长状态相关<sup>[21-22]</sup>, 敲除菌株  $\Delta pknK$  对利福平、红霉素、环丙沙星及异烟肼的耐受性明显下降 (图 3)。我们的结果显示, 敲除 *pknK* 基因的 BCG 菌株 ( $\Delta pknK$ ) 生长速度比野生型 BCG 生长速度快, 导致多重抗生素易感性增加。进一步的研究需要解决介导 PknK 功能在抗生素耐药中的具体分子机制。

磷酸化在细菌的信号转导中起着重要的作用。在分枝杆菌中, 存在双组分系统和真核样的

蛋白激酶通过磷酸化进行细菌信号的传递。为了更加系统地了解 PknK 在分枝杆菌生长和耐药中发挥的作用, 我们利用 pulldown-MS 方法, 筛选获得与 PknK 相互作用的候选蛋白 (表 2)。生物信息学分析表明, 双组分系统中的反应调节因子及 PknA 与 PknK 相互作用。PknA 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族<sup>[17]</sup>, 其通过磷酸化参与了多种信号通路, 包括 II 型脂肪酸合成系统<sup>[23]</sup>、细胞形态塑造<sup>[15]</sup>、细胞伸长<sup>[16]</sup>及细胞分裂<sup>[18]</sup>等多种通路, 影响分枝杆菌的生长速度。最近的研究显示, 磷酸化调节 MtrA 与 DNA 的结合, 调控 MtrA 操纵子的基因转录, 调控分枝杆菌的耐药性<sup>[24-25]</sup>。我们的结果提示双组分系统中的反应调节因子 MtrA、TrcR、MoxR 及 PknA 可被 PknK 通过相互作用和磷酸化进行反馈调节, 从而调控分枝杆菌的生长和耐药性 (图 6)。我们的结果也揭示 PknK 是一个潜在的药物靶点。今后, 对 PknK 如何对相互作用蛋白进行磷酸化、信号传导的深入研究, 将会加深分枝杆菌的生长和耐药的分子调控机制的理解, 为结核病的治疗提供新的思路及理论基础。

### 参考文献

- [1] WHO. Global tuberculosis report 2018. Geneva: World Health Organization, 2018.
- [2] Mangtani P, Abubakar I, Ariti C, Beynon R, Pimpin L, Fine PEM, Rodrigues LC, Smith PG, Lipman M, Whiting PF, Sterne JA. Protection by BCG vaccine against tuberculosis: a systematic review of randomized controlled trials. *Clinical Infectious Diseases*, 2014, 58(4): 470-480.
- [3] Mikušová K, Ekins S. Learning from the past for TB drug discovery in the future. *Drug Discovery Today*, 2017, 22(3): 534-545.
- [4] Seung KJ, Keshavjee S, Rich ML. Multidrug-resistant Tuberculosis and extensively drug-resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2015, 5(9): a017863.

- [5] Wu FL, Liu Y, Jiang HW, Luan YZ, Zhang HN, He X, Xu ZW, Hou JL, Ji LY, Xie Z, Czajkowsky DM, Yan W, Deng JY, Bi LJ, Zhang XE, Tao SC. The Ser/Thr protein kinase protein-protein interaction map of *M. tuberculosis*. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017, 16(8): 1491–1506.
- [6] Caballero J, Morales-Bayuelo A, Navarro-Retamal C. Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinases: structural information for the design of their specific ATP-competitive inhibitors. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2018, 32(12): 1315–1336.
- [7] Prisic S, Husson RN. Mycobacterium tuberculosis serine/threonine protein kinases. *Microbiology Spectrum*, 2014, 2(5), doi: 10.1128/microbiolspec.MGM2-0006-2013.
- [8] Narayan A, Sachdeva P, Sharma K, Saini AK, Tyagi AK, Singh Y. Serine threonine protein kinases of mycobacterial genus: phylogeny to function. *Physiological Genomics*, 2007, 29(1): 66–75.
- [9] De Souza GA, Leversen NA, Målen H, Wiker HG. Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway. *Journal of Proteomics*, 2011, 75(2): 502–510.
- [10] Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, Bradbury ARM, Chen X. Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(1): 396–404.
- [11] Kumar P, Kumar D, Parikh A, Rananaware D, Gupta M, Singh Y, Nandicoori VK. The Mycobacterium tuberculosis protein kinase K modulates activation of transcription from the promoter of mycobacterial monooxygenase operon through phosphorylation of the transcriptional regulator VirS. *Journal of Biological Chemistry*, 2009, 284(17): 11090–11099.
- [12] Malhotra V, Okon BP, Clark-Curtiss JE. Mycobacterium tuberculosis protein kinase K enables growth adaptation through translation control. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(16): 4184–4196.
- [13] Bardarov S, Bardarov Jr S, Pavelka Jr MS, Sambandamurthy V, Larsen M, Tufariello J, Chan J, Hatfull G, Jacobs Jr WR. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in Mycobacterium tuberculosis, M. bovis BCG and M. smegmatis. *Microbiology*, 2002, 148(10): 3007–3017.
- [14] Chopra P, Singh B, Singh R, Vohra R, Koul A, Meena LS, Koduri H, Ghildiyal M, Deol P, Das TK, Tyagi AK, Singh Y. Phosphoprotein phosphatase of Mycobacterium tuberculosis dephosphorylates serine-threonine kinases PknA and PknB. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 311(1): 112–120.
- [15] Kang CM, Abbott DW, Park ST, Dascher CC, Cantley LC, Husson RN. The Mycobacterium tuberculosis serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes & Development*, 2005, 19(14): 1692–1704.
- [16] Nagarajan SN, Upadhyay S, Chawla Y, Khan S, Naz S, Subramanian J, Gandotra S, Nandicoori VK. Protein kinase A (PknA) of Mycobacterium tuberculosis is independently activated and is critical for growth in vitro and survival of the pathogen in the host. *Journal of Biological Chemistry*, 2015, 290(15): 9626–9645.
- [17] Sajid A, Arora G, Gupta M, Upadhyay S, Nandicoori VK, Singh Y. Phosphorylation of Mycobacterium tuberculosis Ser/Thr phosphatase by PknA and PknB. *PLoS One*, 2011, 6(3): e17871.
- [18] Thakur M, Chakraborti PK. GTPase activity of mycobacterial FtsZ is impaired due to its transphosphorylation by the eukaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(52): 40107–40113.
- [19] Khan MZ, Kaur P, Nandicoori VK. Targeting the messengers: serine/threonine protein kinases as potential targets for antimycobacterial drug development. *IUBMB Life*, 2018, 70(9): 889–904.
- [20] Malhotra V, Arteaga-Cortés LT, Clay G, Clark-Curtiss JE. Mycobacterium tuberculosis protein kinase K confers survival advantage during early infection in mice and regulates growth in culture and during persistent infection: implications for immune modulation. *Microbiology*, 2010, 156(9): 2829–2841.
- [21] Wayne LG, Hayes LG. An in vitro model for sequential study of shutdown of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence. *Infection and Immunity*, 1996, 64(6): 2062–2069.
- [22] Wallis RS, Patil S, Cheon SH, Edmonds K, Phillips M, Perkins MD, Joloba M, Namale A, Johnson JL, Teixeira L, Dietze R, Siddiqi S, Mugerwa RD, Eisenach K, Ellner JJ. Drug tolerance in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1999, 43(11): 2600–2606.

- [23] Molle V, Brown AK, Besra GS, Cozzone AJ, Kremer L. The condensing activities of the *Mycobacterium tuberculosis* type II fatty acid synthase are differentially regulated by phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(40): 30094–30103.
- [24] Carette X, Platig J, Young DC, Helmel M, Young AT, Wang Z, Potluri LP, Moody CS, Zeng JM, Pristic S, Paulson JN, Muntel J, Madduri AVR, Velarde J, Mayfield JA, Locher C, Wang TS, Quackenbush J, Rhee KY, Moody DB, Steen H, Husson RN. Multisystem analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals kinase-dependent remodeling of the pathogen-environment interface. *mBio*, 2018, 9(2): e02333-17.
- [25] Li XJ, Li JJ, Hu XL, Huang LG, Xiao J, Chan J, Mi KX. Differential roles of the hemerythrin-like proteins of *Mycobacterium smegmatis* in hydrogen peroxide and erythromycin susceptibility. *Scientific Reports*, 2015, 5: 16130.

## Characterization of Serine/Threonine protein kinases K (PknK) in *Mycobacterium*

Yixuan Zhou<sup>1,2#</sup>, Xintong Zhou<sup>1#</sup>, Jian Yang<sup>1</sup>, Xinling Hu<sup>1</sup>, Kaixia Mi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

<sup>2</sup> Savaid Medical School, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

**Abstract:** [Objective] Serine/Threonine Protein Kinases K (PknK) is a eukaryotic-like Ser/Thr protein kinase in *Mycobacterium*, with important roles in cell growth and signaling transduction. However, its underlying mechanism of action is not completed. [Methods] The *pknK* knockout strain  $\Delta pknK$  was obtained by phage specialized transduction meanwhile the complement strain pMV361-*pknK*/ $\Delta pknK$  and the overexpressing strain with pMV261-*pknK*/BCG was construed for further analysis. The growth curve and resistance of the obtained strains were determined. PknK-interacting proteins were identified by pulldown-MS. [Results] PknK affected *Mycobacterium* growth, and  $\Delta pknK$  had growth advantage over BCG and pMV261-*pknK*/BCG. Knockout *pknK* led to increased multiple antibiotic susceptibility. We identified the binding proteins for PknK in BCG using in pulldown combined with Mass Spectrometry. [Conclusion] PknK negatively regulates BCG growth and increases antibiotic susceptibility in mycobacteria. The PknK binding proteins include a Ser/Thr protein kinase PknA, and two component system regulators such as MtrA, MoxR1 and TrcR, which is expected to be a resource for understanding the PknK-mediated signaling pathways in *Mycobacterium*, thus facilitating new therapeutic strategies for antibiotic-resistant infections.

**Keywords:** STPKs, PknK, growth, antibiotic resistance

(本文责编: 李磊)

Supported by the Ministry of Science and Technology of China (2018YFC1603900, 2017YFA0505901) and by the National Natural Science Foundation of China (NSFC) (31600114, 31700128)

\*Corresponding author. Tel: +86-10-64806082; Fax: +86-10-64807468; E-mail: mik@im.ac.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 30 January 2019; Revised: 25 March 2019; Published online: 11 July 2019