

이질아메바에 의해 유도되는
Jurkat T 세포 사멸에 있어
calpain과 ROS의 역할

연세대학교 대학원
의과학과
김 경 아

이질아메바에 의해 유도되는
Jurkat T 세포 사멸에 있어
calpain과 ROS의 역할

지도 신 명 현 교수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학과

김 경 아

김경아의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

돌이켜 보면 늘 아쉽고 안타까운 것이 지나온 시간들입니다. 지난 2년 동안 최선을 다해 실험에 몰두하였다고 생각했었는데, 막상 논문을 준비하면서는 자꾸만 부끄러움이 앞섰습니다. 조금만 더, 조금만 더 시간이 주어진다면 하는 후회와 아쉬움을 뒤로 하고, 더 나은 미래를 향해 성큼 발을 내딛어 봅니다.

지난 2년간의 대학원 생활은 제 인생에 있어 다시 오지 않을 행복하고도 소중한 순간들이었습니다. 훌륭한 교수님들께 많은 것을 배웠고, 무엇보다도 인간적으로 그리고 학문적으로 평생을 두고 갚아도 다 갚지 못할 사랑과 가르침을 베풀어주신 신명현 지도교수님께 짧은 글로는 다 표현하지 못할 깊은 감사와 존경을 드리고 싶습니다. 또한 바쁘신 와중에도 귀중한 시간을 내주시어 논문에 대한 충고를 해주신 용태순 교수님과 서주영 교수님께도 감사드립니다. 또한 학위 과정동안 하찮은 고민도 진지하게 들어주고 따뜻한 격려를 아끼지 않았던 이영아 선생님과 심서보 선생님에게 감사의 마음을 전합니다. 또한 미처 고마움을 표시하지 못한 제 모든 주위 분들께도 진심으로 감사드리고 싶습니다.

마지막으로, 27년의 삶 동안 제게 많은 힘과 용기를 주시고, 애정과 인내로 지켜봐주신 어머니께 가슴에서 우러나오는 깊은 사랑과 존경을 드리며, 늘 어머니께 부끄럽지 않은 모습으로 정진하겠다고 약속드립니다. 제게 힘을 주셨던 모든 분들께 다시 한번 감사드리며, 앞으로의 삶에 있어서도 사랑과 겸손, 그리고 최선의 노력을 잊지 않고 정진할 것임을 약속드립니다. 감사합니다.

2005년 12월

김 경 아 드림

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 시약 및 항체	7
2. 이질아메바 영양형의 무균배양	7
3. Jurkat T 세포의 무균배양	8
4. 세포 생존율 측정	8
5. Jurkat T 세포에 다양한 억제제 전처리	9
6. 세포내 Ca^{2+} 수준 측정	9
7. 유세포 분석 (Flow cytometry)	10
8. Western blot	10
9. DNA 단편형성 (fragmentation)	11
10. 통계처리	11
III. 결과	12
1. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포 사멸	12
2. 이질아메바에 의해 유도된 Jurkat T 세포 사멸과 DNA 단편형 성에 있어서 아메바 Gal/GalNAc lectin의 역할	15
3. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포내 칼슘 (Ca^{2+})농도 증가와 칼 슘의존성 시스테인 단백질분해효소인 calpain의 활성화	17
4. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포내 caspase의 활성화	19
5. Calpain 활성을 통한 caspase의 활성화	21

6. 이질아메바에 의해 유도된 Jurkat T 세포에서의 PS 외향화 (externalization)와 DNA 단편형성에 pan-caspase 억제제와 calpain 억제제가 미치는 영향	24
7. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포내의 타이로신 탈인산화 (tyrosine dephosphorylation)와 SHP-2 단백질 타이로신 인산가수분해효소 (protein tyrosine phosphatase)의 단백질분해 (proteolysis)	27
8. 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포내 calpastatin의 절단에 있어서 calpain과 caspase의 역할	30
9. 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포의 PS 외향화 (externalization)와 DNA 단편형성에 있어서 ROS 억제제의 효과	32
 IV. 고찰	 38
 V. 결론	 43
 참고문헌	 44
 영문요약	 53

그림 차례

Fig. 1A. Viability of Jurkat T cells incubated with or without <i>E. histolytica</i>	13
Fig. 1B. Phosphatidylserine exposure in Jurkat T cells incubated with or without <i>E. histolytica</i>	13
Fig. 1C. Cleavage of PARP in Jurkat T cells stimulated with <i>E. histolytica</i>	14
Fig. 1D. DNA fragmentation in Jurkat T cells induced by <i>E. histolytica</i>	14
Fig. 2A. Effect of TDG (amebic lectin inhibitor) on the <i>E. histolytica</i> -induced cell death in Jurkat T cells	16
Fig. 2B. Effect of D-galactose on the <i>E. histolytica</i> -induced DNA fragmentation in Jurkat T cells	16
Fig. 3A. Increased cytosolic Ca ²⁺ level in Jurkat T cells incubated with <i>E. histolytica</i>	18
Fig. 3B. Cleavage of calpain small regulatory subunit (28 kDa) in Jurkat T cells stimulated with <i>E. histolytica</i>	18
Fig. 4A. Cleavage of caspases in Jurkat T cells stimulated with <i>E. histolytica</i>	20
Fig. 4B. Effects of bongkreikic acid and z-LEHD-fmk on <i>E. histolytica</i> -induced cleavage of caspase-3 in Jurkat T cells	20
Fig. 5A. Effect of calpain inhibitor on the <i>E. histolytica</i> -induced cleavage of calpain small regulatory subunit (28 kDa) and caspase-3 in Jurkat T cells	22

Fig. 5B. Effect of calpain inhibitor on the <i>E. histolytica</i> -induced cleavage of caspase-6 and caspase-7 in Jurkat T cells	22
Fig. 5C. Effect of pan-caspase inhibitor on the <i>E. histolytica</i> -induced cleavage of calpain small regulatory subunit (28 kDa) in Jurkat T cells	23
Fig. 6A. Effect of various concentrations of calpeptin on the <i>E. histolytica</i> -induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells	25
Fig. 6B. Effect of various concentrations of z-VAD-fmk on the <i>E. histolytica</i> -induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells	25
Fig. 6C. Effects of calpeptin and z-VAD-fmk on the <i>E. histolytica</i> -induced DNA fragmentation in Jurkat T cells	26
Fig. 7A. Time course analysis of <i>E. histolytica</i> -induced protein dephosphorylation in Jurkat T cells	28
Fig. 7B. Proteolysis of SHP-2 tyrosine phosphatase in Jurkat T cells stimulated with <i>E. histolytica</i>	28
Fig. 7C. Effect of calpain inhibitor on the <i>E. histolytica</i> -induced proteolysis of SHP-2 phosphatase in Jurkat T cells	29
Fig. 8A. Cleavage of calpastatin in Jurkat T cells stimulated with <i>E. histolytica</i>	31
Fig. 8B. Effects of calpeptin and z-VAD-fmk on the <i>E. histolytica</i> -induced cleavage of calpastatin in Jurkat T cells	31
Fig. 9A. Inhibitory effect of various concentrations of DPI on the <i>E. histolytica</i> -induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells	33

Fig. 9B. Inhibitory effect of various concentrations of DPI on the *E. histolytica*-induced DNA fragmentation in Jurkat T cells 33

Fig. 10. Effect of various concentrations of rotenone on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells 34

Fig. 11. Effect of various concentrations of ETYA on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells 34

Fig. 12. Effect of various concentrations of L-NMMA on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells 35

Fig. 13A. Effect of various concentrations of NAC on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells 36

Fig. 13B. Effect of various concentrations of GSH on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells 36

Fig. 14. Proposed model of signaling pathways of Jurkat T cell death triggered by *Entamoeba histolytica* 37

표 차례

표 1. TYI-S-33 배지의 조성 8

국문요약

이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포 사멸에 있어 calpain과 ROS의 역할

인체에 아메바성 대장염과 간농양 등을 일으키는 기생원충인 이질아메바 (*Entamoeba histolytica*)는 방어면역에 관여하는 T 림프구와 중성구와 같은 면역세포를 직접 사멸시킴으로써 숙주의 면역반응을 회피할 수 있다. 그러나 이질아메바에 의한 숙주세포의 사멸에 관여하는 세포내 신호전달 기전은 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 살아있는 이질아메바의 접촉에 의해 유도되는 숙주세포의 사멸에 있어 세포내 calpain과 reactive oxygen species (ROS)의 신호역할을 알아보았다. Jurkat T 세포를 이질아메바와 배양 시 배지에 배양한 것과 비교해서 세포의 생존율이 급격히 감소하였으며, 또한 phosphatidylserine (PS)의 바깥 세포막으로의 노출, Poly[ADP-ribose] polymerase (PARP)의 절단 및 DNA의 단편형성이 매우 증가되었다. 이질아메바에 의해 유도되는 세포사멸효과는 아메바의 Gal/GalNAc lectin과 숙주세포 표면에 있는 galactose 잔기와의 결합을 방해하는 thiodigalactoside (TDG) 또는 D-galactose를 첨가하였을 때 효과적으로 차단되었다. 또한 이질아메바에 노출시킨 Jurkat T 세포내에서는 칼슘 (Ca^{2+})의 농도가 증가되었으며, 이때 칼슘의존성 시스테인 단백질분해효소인 calpain의 활성화도 유도되었다. 이질아메바는 Jurkat T 세포내 caspases-3, -6, 및 -7의 활성을 유도하였고, 이것은 calpain 억제제인 calpeptin을 T 세포에 전처리 시 억제되었다. 반면에 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk는 이질아메바에 의한 T 세포내 calpain의 활성을 억제시키지 못하였다. z-VAD-fmk와 calpeptin은 둘

다 이질아메바에 의해 유도된 PS의 노출을 억제시키지 못하였지만, z-VAD-fmk는 이질아메바에 의한 DNA 단편형성을 의미 있게 억제하였다. 그러나 calpeptin은 이질아메바에 의해 유도되는 DNA 단편형성을 억제시키지 못하였다. 이질아메바는 Jurkat T 세포의 탈인산화 (dephosphorylation) 와 SHP-2 타이로신 인산가수분해효소 (tyrosine phosphatase)의 활성을 강력하게 유도하였고, Jurkat T 세포에 calpeptin을 전처리 시 이질아메바에 의해 유도된 SHP-2 타이로신 인산가수분해효소의 활성이 억제되었다. 이질아메바는 Jurkat T 세포내에 존재하는 calpain의 내재성 억제인자인 calpastatin의 절단을 유도하였고, 이것은 calpeptin에 의해서는 억제되었으나 z-VAD-fmk에 의해서는 전혀 억제되지 않았다. 이질아메바에 의해 유도되는 세포사멸은 NADPH 산화효소 (oxidase) 억제제인 diphenyleneiodonium chloride (DPI)를 전처리 함으로써 의미있게 차단되었다. 반면 사립체 (mitochondria) 억제제인 rotenone 및 5-lipoxygenase (LO) 억제제인 eicosatetraenoic acid (ETYA)는 아메바에 의한 Jurkat T 세포사멸을 막지 못했다. 이런 결과들을 종합하여 보면 이질아메바에 의한 세포사멸에는 calpain을 통한 caspase 및 인산가수분해효소의 활성경로와 NADPH 산화효소 활성을 통해 유리되는 ROS를 매개로한 신호경로가 매우 중요함을 알 수 있다.

핵심되는 말 : 이질아메바, Jurkat T cell, 세포사멸, calpain, reactive oxygen species, caspases, calpastatin, tyrosine phosphatase

이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포 사멸에 있어
calpain과 ROS의 역할

<지도교수 신 명 현>

연세대학교 대학원 의과학과

김 경 아

I. 서론

조직침범 (tissue-invasive) 기생원충인 이질아메바는 전 세계적으로 약 5천만 명의 사람이 감염되어 있으며, 해마다 약 4만 명 이상으로 인해 사망하고 있다.¹⁻³ 이질아메바는 감염 시 인체의 대장조직을 괴사시켜 심한 설사와 복통을 동반하는 대장염과 치사율이 높은 간농양 등을 일으킬 수 있어 매우 중요한 수인성 전염병원체로 인식되어지고 있다.² 이질아메바는 생활주기 (life cycle)에 있어 포낭 (cyst)과 영양형 (trophozoite)이 관찰되며, 포낭으로 오염된 물과 음식물의 섭취로 인해 감염이 성립된다. 장내로 도입된 포낭형의 아메바는 회장하부에서 탈낭한 후 영양형으로 변화되어 대장에 이행한 후 장점막에 침입하여 이분열법으로 분열 증식한다.⁴ 이질아메바는 숙주의 면역기전을 피하기 위해 방어면역에 관여하는 T 림프구와 중성구와 같은 면역세포들을 직접 사멸시킬 수 있다. 또한 이질아메바가 분비하는 시스테인 단백분해효소는 숙주의 보체계를 구성하는 단백질들과 항체들의 기능을 손상시켜 면역기능을 약화시킬 수 있다.⁵ 이 외에 이질아메바는 숙주와 접촉하였을 때 pore-forming 단백질인

amoebapore를 분비한 후 숙주의 막을 손상시켜 세포의 죽음을 유도할 수 있다.⁶

이질아메바에 의한 세포 사멸은 일반적인 세포사멸기전과는 달리 일어나는 것으로 이해하고 있는데, 그 증거로 세포사멸억제 단백질인 Bcl-2를 과발현시켰을 때 자외선조사에 의한 세포사멸은 억제되었지만 이질아메바에 의한 세포사멸은 전혀 억제되지 않았다.⁷ 또한 이질아메바는 caspase-9 억제제로 처리된 caspase-8 결손 세포도 쉽게 죽일 수 있었다. 더욱이 이질아메바는 Fas/Fas 리간드 (ligand) 나 종양괴사인자 (tumor necrosis factor [TNF]) 수용체를 통한 세포사멸 신호전달경로가 결여되어 있는 마우스의 간세포도 죽일 수 있었다.⁸ 이러한 결과를 종합해보면 이질아메바에 의한 숙주세포의 사멸은 현재까지 알려진 고전적인 세포 사멸기전과는 다른 경로로 세포의 죽음이 일어나는 것으로 추측된다.

이질아메바가 숙주세포에 접촉 시 세포내 칼슘의 농도가 급격히 비가역적으로 증가되는 것으로 잘 알려져 있다.⁹ 이러한 세포내 칼슘이온 농도의 급격한 변화는 세포죽음과 직접적으로 연관되어 있다. 예를 들면 이질아메바에 의한 중국 햄스터 난소 (Chinese hamster ovary [CHO]) 세포의 세포용해 (cytolysis)가 칼슘 킬레이터 (chelators)인 EDTA와 EGTA를 사용하였을 때 억제되었다고 한다.¹⁰ 더욱이 CHO 세포를 지연성칼슘차단제인 verapamil로 처리하였을 때 아메바에 의한 세포사멸이 잘 억제되었다.¹¹ 따라서 이질아메바에 의한 세포사멸과정에 있어 칼슘의존성 시스테인 단백질분해효소인 calpain의 활성이¹² 매우 중요한 역할을 할 수 있음을 추측할 수 있다. 이질아메바를 Jurkat T 세포에 접촉 시 세포내 단백질들의 타이로신 탈인산화 (tyrosine dephosphorylation)가 일어나며, 이때 단백질 타이로신인산가수분해효소 1B (protein tyrosine phosphatase 1B [PTP1B])의 활성은 calpain의 활성과 직접적인 관련이 있다.¹³ Calpain은 거의 모든 포유류 세포내에 존재하고 있는 매우 중요한 단백질분해효소이며¹⁴

세포주기 조절, 전사인자활성, 분화 및 사멸 등에 관여하고 있다. Calpain은 μ -calpain과 m-calpain 2개의 이형체 (isoforms)로 존재하며 각각 촉매작용 (catalytic) subunit (80 kDa)와 조절작용 (regulatory) subunit (28 kDa)가 결합된 이질이량체 (heterodimer)의 형태로 있다.¹⁵ 비활성형의 전효소(pro-enzymes)가 활성화되기 위해서는 단백질해라는 자가공정 (autoprocessing)을 필요로 한다.¹⁶ 이러한 calpain의 활성화는 생체 및 실험실내 세포사멸 모델에서 잘 관찰된다.^{17,18} 최근 세포사멸과정에 있어 calpain의 활성화와 caspase의 활성화간에는 상호신호조절이 있는 것으로 보고되고 있다.¹⁹⁻²¹ 예를 들면 calpain은 caspase-3, -7, -8, -9, 및 -12의 절단을 유도하였다.²²⁻²⁴ 반대로 caspase는 calpain의 세포내 억제인자인 calpastatin을 절단함으로써 calpain의 활성을 촉진하기도 한다.^{25,26} 그러나 이질아메바에 의한 세포사멸 시 calpain과 caspase의 활성화간의 신호조절체계에 대해서는 전혀 알려진 것이 없다.

Reactive oxygen species (ROS)는 과산화물 음이온 (superoxide anion [O_2^-]), 과산화수소 (hydrogen peroxide [H_2O_2])들을 지칭하며 이러한 물질들은 세포사멸을 유도하는 중요한 신호조절물질이다. 최근 보고에 따르면 이질아메바에 의한 세포사멸에 있어 세포내 ROS의 축적이 매우 중요함을 알 수 있다. 즉 ROS 억제제인 diphenyleneiodonium chloride (DPI) 로 세포를 전처리하였을 때 이질아메바에 의한 중성구 사멸과 세포내 ROS의 양이 매우 크게 억제되었다.²⁷ 그러나 아직까지 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포사멸에 세포내 ROS가 어떤 역할을 할 수 있는지에 대해서는 전혀 알려진 것이 없다.

본 연구에서는 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포사멸에 있어 calpain과 ROS의 신호역할을 정밀히 조사하고자 하였다. 이러한 연구는 이질아메바와 숙주간의 상호신호관계성과 병원체의 숙주면역 회피기전을 보다 더 깊이 이해할 수 있을 것으로 생각된다. 이러한

연구결과는 이질아메바증의 병인을 규명할 수 있어 질병의 새로운 치료법을 개발하는데 크게 기여할 것으로 기대된다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Pan-caspase 억제제 z-VAD-fmk, calpain 억제제 calpeptin, diphenyleneiodonium chloride (DPI), NO synthase 억제제 L-NMMA, 5-LO 억제제 ETYA, bongkreikic acid, caspase-9 억제제 z-LEHD-fmk, rotenone, 항산화제인 N-Acetyl-L-cysteine (NAC), Glutathione (GSH)은 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다. Thiodigalactoside (TDG)는 Sigma chemical company (St. Louis, MO, USA)으로부터 구입하였다. Fluorescein isothiocyanate (FITC) - labeled annexin V는 BD Pharmingen (San Diego, CA, USA)으로부터 구입하였다. Fluo3/AM은 Molecular probes로부터 구입하였다. Caspase-3, -6, -7, PARP와 SHP-2 타이로신 인산가수분해효소 (tyrosine phosphatase)에 대한 rabbit 다클론 항체와, phospho-tyrosine 에 대한 mouse 단클론 항체는 Cell signaling technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. Calpain 조절작용 subunit (regulatory subunit)과 calpastatin에 대한 mouse 단클론 항체는 Calbiochem (La Jolla, CA, USA)으로부터 구입하였다.

2. 이질아메바 영양형의 무균배양

TYI-S-33 배지 (표 1)에서 이질아메바 (*Entamoeba histolytica*) HM1:IMSS 주를 37°C에서 무균 배양하였다.²⁸ 48-72시간 동안 배양한 log phase 시기의 이질아메바를 모았으며 10분 동안 얼음에 넣어두었다가 5분 동안 4°C에서 1,000 rpm으로 원심 분리하여 수확하였다. 이질아메바를 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, gentamicin sulfate (50 mg/L)가 함유된 RPMI 1640 배지로 실험에 사용할 이질아메바를 세척한 후 다시 RPMI 1640 배지에 부유시켰다. 실험에 사용된 아메바의 생존율은 trypan blue 염색상 98% 이상이었다.

표 1. TYI-S-33 배지의 조성

성분	용량
Trypticase (BBL)	20 g/L
Yeast extract (BBL)	10 g/L
Glucose	10 g/L
NaCl	2 g/L
K ₂ HPO ₄	1 g/L
KH ₂ PO ₄	0.6 g/L
L-cysteine HCl	1 g/L
L-ascorbic acid	200 mg/L
Ferric ammonium citrate	22.8 mg/L
Distilled Water	880 mL (pH 6.8)
Fetal calf serum 10%	100 mL
Vitamin 2%	20 mL

3. Jurkat T 세포의 무균배양

인체 leukemia T 세포주 Jurkat-*E6-1* (American Type Culture Collection, USA)를 10% fetal bovine serum, 25 mM HEPES, gentamicin sulfate (50 mg/L)가 포함된 RPMI 1640 배지 (Gibco-BRL)에 부유시킨 후 37°C, CO₂ 배양기 (5% 이산화탄소, 95% 공기)에서 무균 배양하였다. Jurkat T 세포를 5분 동안 4°C에서 1,000 rpm으로 원심시켜 모은 후 RPMI 1640 배지에 풀어주었다. 실험에 사용된 T 세포주의 생존율은 trypan blue 염색 상 99% 이상이었다.

4. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 trypan blue 염색 방법을 이용하여 측정하였다. 48-well tissue culture plate에 이질아메바와 Jurkat의 비율을 1:5로

넣고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 30분과 60분 동안 배양하였다. 배양 후 세포를 모아 PBS로 세척한 후 0.4%의 trypan blue 용액을 세포와 섞어 hemacytometer를 이용하여 200개의 세포를 검정하여 세포생존율을 계산하였다. 이질아메바의 Gal/GalNAc lectin을 통한 접촉이 숙주세포의 사멸에 중요한 역할을 하는지를 조사하기 위해 lectin과 당과의 결합을 방해하는 TDG를 첨가한 후 이질아메바에 의한 T 세포의 생존율을 대조군과 비교하였다.

5. Jurkat T 세포에 다양한 억제제 전처리

Jurkat T 세포를 30분 동안 37°C에서 z-VAD-fmk (50, 100, 200 μM), DPI (5, 10, 20, 50 μM), rotenone (10, 20, 50 μM), L-NMMA (1, 2, 5 mM), ETYA (35, 65, 100 μM), NAC (5, 10, 20 mM), Glutathione (5, 10, 20 mM), bongkreikic acid (50, 100 μM), z-LEHD-fmk (50, 100 μM)로 전처리하였다. Calpain 억제제 calpeptin을 0.5 mM and 1 mM 로 15분 동안 Jurkat T 세포에 전처리하고, 10 μM, 100 μM, 250 μM 로 1시간 동안 전처리하였다. 전처리한 T 세포는 이질아메바와 반응시키기 전에 한번 RPMI 1640 배지로 세척하였다. 모든 실험에서 사용된 매개체 대조 (vehicle control) DMSO는 배지 총량의 1%를 넘지 않았다.

6. 세포내 Ca²⁺ 수준 측정

Jurkat T 세포 (4×10⁵/well)와 이질아메바 (4×10⁴/well)를 48-well tissue culture plate에서 5분 동안 37°C, CO₂ 배양기에서 배양한 후 모았다. 모든 세포를 혈청이 없는 RPMI 1640 배지 400 μl에 부유시킨 후 칼슘에 민감한 형광색소인 Fluo-3/AM (Molecular Probes, 미국)을 2 μM이 되도록 첨가하여 15분 동안 37°C에서 염색하였다. 유세포 분석기 (flow cytometer)를 이용하여 세포내 칼슘이온의 증가여부를 형광강도의 변화를 통해 분석하였다.

7. 유세포 분석 (Flow cytometry)

고사 (apoptosis)를 통한 세포사멸의 특징인 세포외막으로의 PS의 이동은 annexin V 염색을 통해 측정하였다. Jurkat T 세포 (4×10^5 /well)와 이질아메바 (8×10^4 /well)를 48-well tissue culture plate에서 1시간동안 37°C, CO₂ 배양기에서 배양한 후 모았다. 세척용액 (0.1% sodium azide 와 1% FBS을 포함하는 phosphate-buffered saline [PBS])으로 두 번 세척한 세포에 FITC-labeled annexin-V (2 μ l)가 함유되어 있는 부착용액 (binding buffer [10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂, pH 7.4]) 200 μ l를 첨가하여 15분 동안 상온에서 방치하였다. 유세포 분석기를 이용하여 annexin-V에 염색되어진 세포수와 형광강도를 측정하였다.

8. Western blot

여러 가지 약물학적 억제제로 전처리한 Jurkat T 세포 (1×10^6 /group)에 이질아메바 (1×10^5 /group)를 첨가하고 시간별로 배양하였다. 자극이 끝난 후 원심분리기를 이용하여 세포를 모아 차가운 PBS를 넣어 원침시켰다. 모아진 세포침사에 차가운 용해용액 (20 mM Tris-HCl pH7.5, 60 mM β -glycerophosphate, 10 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 10 mM NaF, 2 mM dithiothreitol, 1 mM Na₂VO₄, 1 mM APMSF, 1% NP-40, 5 μ g/ml leupeptin)을 첨가한 후 얼음에 30분 동안 방치하였다. 30분이 지난 후 시료용액과 혼합하여 100°C에서 5분 동안 열처리하였다. 열처리가 끝난 시료를 얼음에 놓아 5분간 방치한 후 원심 분리하여 상층액만을 따로 모아 새로운 튜브로 옮겨 실험에 사용될 때까지 -20°C에 보관하였다. 이와 같은 방법으로 얻은 시료를 10%, 12% 또는 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 상에서 전기영동 시킨 후 젤을 immobilon P polyvinylidene fluoride 막 (Millipore, 독일)으로 100 V에서 1시간 동안 이적시켰다. 이적시킨 막을 5% 탈지분유 (non-fat

dry milk)를 함유하고 있는 Tris-buffered saline (TBS [0.1% Tween-20])에 넣은 후 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 한번 세척한 후 막을 caspase-3, -6 and -7, 또는 calpain 조절작용 subunit에 대한 일차 항체로 4°C에서 18시간동안 반응시켰다. 반응시킨 막을 TBST로 세 번 세척 한 후 HRP-conjugated anti-rabbit IgG 항체 또는 HRP-conjugated anti-mouse IgG 항체로 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 최종적으로, 항원-항체 반응은 LumiGLO (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 사용하여 확인하였다.

9. DNA 단편형성 (fragmentation)

이질아메바에 의한 Jurkat T 세포 내 DNA의 단편형성을 측정하기 위해 Jurkat T 세포 (5×10^6 /group)와 이질아메바 (5×10^5 /group)를 1시간동안 37°C에서 배양한 후 모았다. 이질아메바의 Gal/GalNAc lectin을 통한 세포사멸효과를 확인하기 위해 경쟁적인 억제제인 D-galactose를 Jurkat 세포에 처리한 후 5분 뒤 이질아메바를 넣었다. 모든 시료를 PBS로 한 번 세척하고 TaKaRa kit (#MK600)을 사용하여 DNA를 추출하였다. DNA를 2% agarose 겔에 전기 영동하여 DNA의 단편형성을 확인하였다.

10. 통계처리

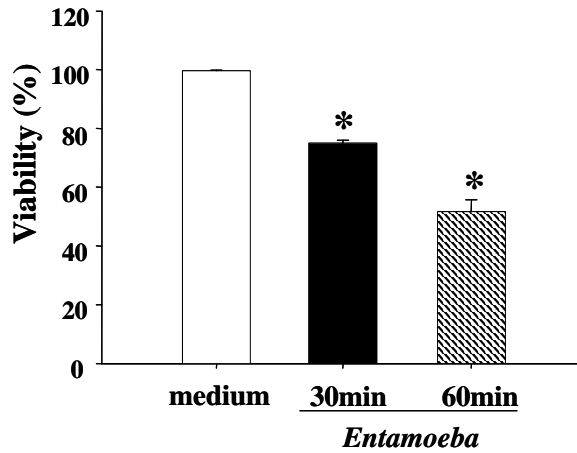
결과는 3 ~ 5번의 실험을 각각 독립적으로 수행하였고, 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 실험군과 대조군의 통계처리는 Student's *t*-test를 이용하여 $p < 0.05$ 이면 두 군 간에 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포 사멸

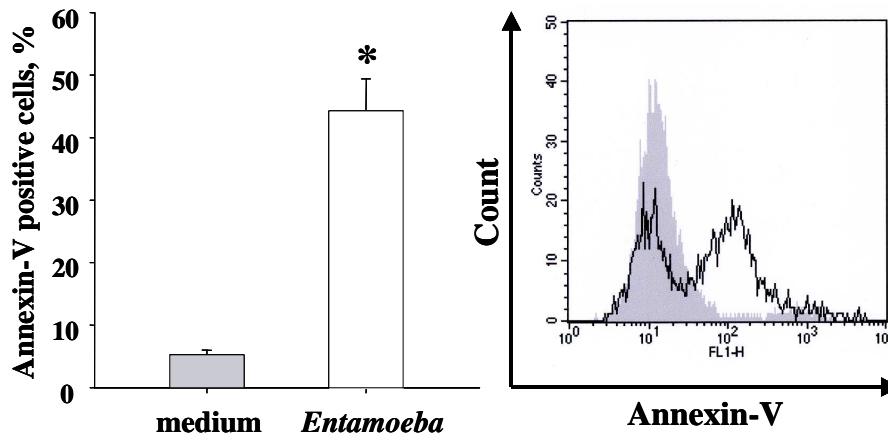
Jurkat T 세포를 이질아메바와 배양하였을 때 유도되는 다양한 세포사멸 현상에 대하여 알아보았다. Jurkat 세포를 이질아메바와 함께 배양한 후 trypan blue로 염색하였을 때 죽은 세포가 반응 1시간 후에 현저히 증가되었다. 이질아메바를 첨가하지 않은 정상군의 세포 생존율이 100%인데 반해, 이질아메바를 첨가한 후 30분과 60분에서 각각 75.0 과 51.6%로 감소되었다 (Fig. 1A). 또한 이질아메바와 Jurkat 세포를 배양한 후, 세포 외막에 phosphatidylserine (PS)의 노출을 annexin-V 염색을 통해 확인하였다. 이질아메바를 첨가한 후 Annexin-V 양성 세포율은 평균 44%로 배지만을 첨가한 대조군과 비교할 때 약 8배정도 증가하였다 (Fig. 1B). DNA 복구 효소인 Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1)는 세포사멸 시 절단되어진다고 알려져 있다.²⁹ 따라서 본 연구에서는 이질아메바에 의해 Jurkat 세포내 PARP의 절단이 유도되는지를 알아보았다. 이질아메바를 첨가 후 Jurkat T 세포내의 PARP의 절단은 반응 시간과 첨가한 아메바 수에 따라 여러 개의 단백질획으로 절단된 것을 잘 볼 수 있다 (Fig. 1C). 더욱이 Jurkat T 세포에 이질아메바를 첨가하였을 때 대조군에 비해 현저한 핵 DNA의 단편형성이 유도되었다 (Fig. 1D).

Fig 1A. Viability of Jurkat T cells incubated with or without *E. histolytica*.



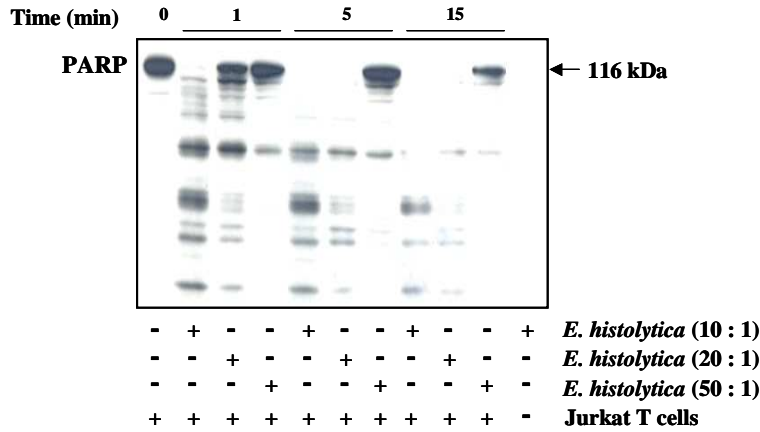
Jurkat T cells (4×10^5 /well) were incubated for 30 or 60 min at 37°C with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well). After incubation, cells were stained with trypan blue for quantification of viability of Jurkat T cells. Data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments. Significant differences from the value obtained with cells incubated with medium alone are shown. *, $p < 0.05$

Fig 1B. Phosphatidylserine exposure in Jurkat T cells incubated with *E. histolytica*.



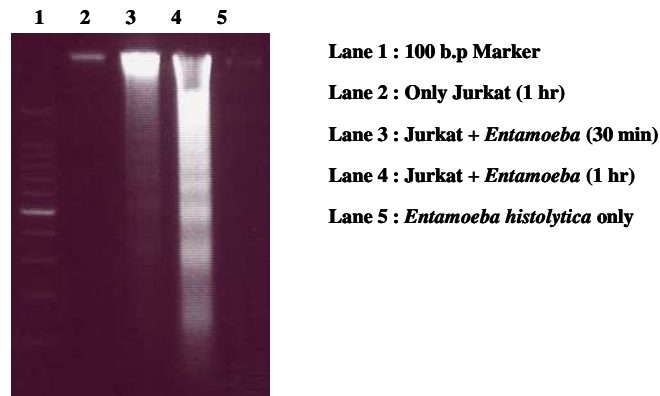
Jurkat T cells (4×10^5 /well) were incubated for 60 min at 37°C with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well). After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments. Significant differences from the value obtained with cells incubated with medium alone are shown. *, $p < 0.05$

Fig 1C. Cleavage of PARP in Jurkat T cells stimulated with *E. histolytica*.



Jurkat T cells (1×10^6 /sample) were incubated for 1-15 min at 37°C with or without *E. histolytica* at a ratio of 10:1, 20:1, or 50:1 (Jurkat T cells to *E. histolytica*). After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-PARP Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

Fig 1D. DNA fragmentation in Jurkat T cells induced by *E. histolytica*.

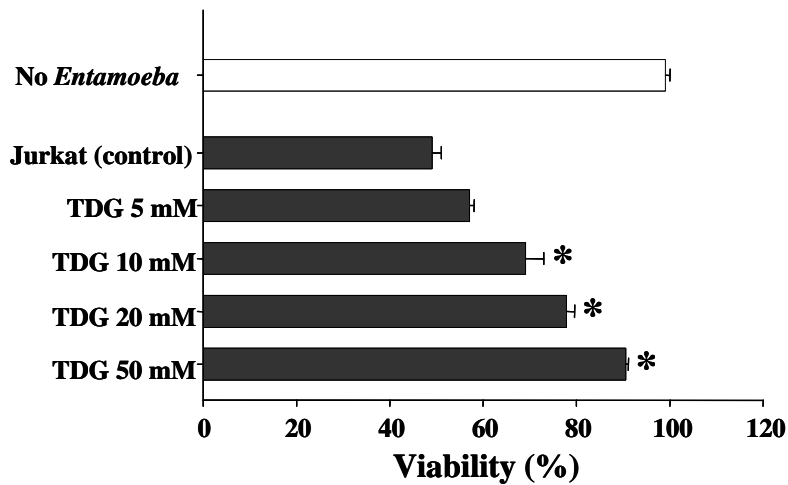


Jurkat T cells (4×10^6 /sample) were incubated for 60 min at 37°C with or without *E. histolytica* (4×10^5 /sample). DNA fragmentation was analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. An equal number of amebae and Jurkat T cells were incubated in medium alone as negative controls.

2. 이질아메바에 의해 유도된 Jurkat T 세포 사멸과 DNA 단편형성에 있어서 아메바 Gal/GalNAc lectin의 역할

이질아메바가 숙주세포를 사멸시키는데 있어서 아메바와 세포간의 단단한 접촉이 필요하다는 것은 잘 알려져 있다.³⁰ 이에 따라, 아메바의 Gal/GalNAc lectin과 Jurkat 세포 표면에 있는 당 잔기 (sugar residue) 사이의 결합을 방해할 수 있는 thiodigalactoside (TDG)의 효과를 관찰하였다. 이질아메바에 의해 유도된 세포의 죽음은 TDG 첨가에 의해 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다 (Fig. 2A). 특히 TDG 50 mM에서는 이질아메바에 의한 세포사멸이 크게 억제되어 배지만을 첨가한 대조군의 결과와 비슷한 수치를 보였다. 또한 D-galactose를 첨가하였을 때에도 이질아메바에 의한 세포의 DNA 단편형성이 효과적으로 억제된 것을 확인하였다 (Fig. 2B).

Fig 2A. Effect of TDG (amebic lectin inhibitor) on the *E. histolytica*-induced cell death in Jurkat T cells.



Jurkat T cells (4×10^5 /well) were incubated for 60 min at 37°C with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) in the absence or presence of TDG (5-50 mM). After incubation, cells were stained with trypan blue for quantification of viability of Jurkat T cells. Data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments. Significant differences from the value obtained with cells incubated with *E. histolytica* in the absence of sugars. *, $p < 0.05$

Fig 2B. Effect of D-galactose on the *E. histolytica*-induced DNA fragmentation in Jurkat T cells.



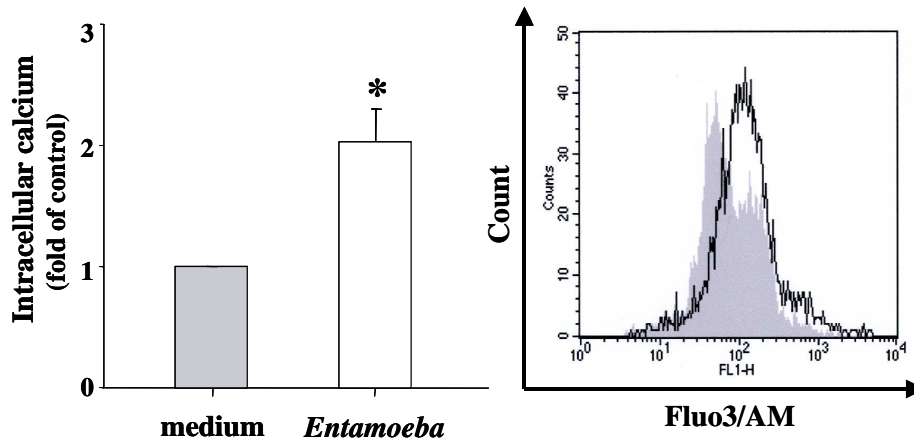
Jurkat T cells (4×10^6 /sample) were incubated for 60 min at 37°C with or without *E. histolytica* (4×10^5 /sample) in the absence or presence of 100 mM D-galactose. DNA fragmentation was analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. An equal number of amebae and Jurkat T cells were incubated in medium alone as negative controls.

3. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포내 칼슘 (Ca^{2+})농도 증가와 칼슘 의존성 시스테인 단백질분해효소인 calpain의 활성화

세포내 칼슘이온 농도 증가가 calpain의 활성화에 반드시 필요하다.¹² 또한, 이질아메바가 세포사멸을 유도할 때 세포 내 칼슘이온의 농도를 증가시킨다.^{10,11} 본 연구에서는 Jurkat T 세포내 칼슘이온의 농도 변화를 세포투과 칼슘지시약 (cell-permeable calcium indicator)인 Fluo-3/AM을 사용하였다. 이질아메바를 첨가하였을 때 Jurkat T 세포내의 칼슘농도가 대조군에 비해 약 2배 정도 증가한 것을 볼 수 있다 (Fig. 3A).

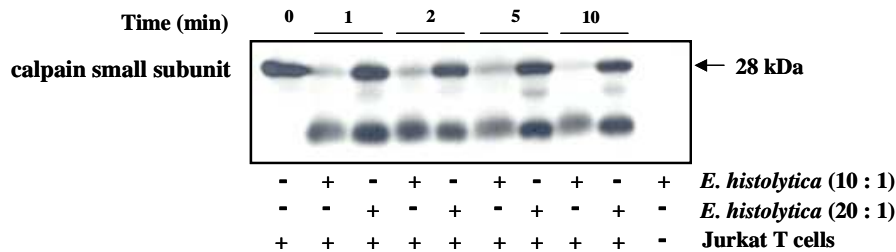
Calpain의 활성화는 caspase와 유사하게 자가절단 (autocleavage)를 통해 유도된다.³¹ 다음으로 이질아메바를 Jurkat T 세포에 첨가한 후 칼슘의존성 단백질분해효소인 calpain 활성을 알아보았다. 이질아메바를 첨가한 후 1분에서부터 calpain의 28 kDa 크기의 조절작용 subunit가 자가분해 (autolysis)된 것을 확인하였다 (Fig. 3B).

Fig 3A. Increased cytosolic Ca²⁺ in Jurkat T cells incubated with *E. histolytica*.



Jurkat T cells (4×10^5 /well) were incubated for 5 min at 37°C with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well). After incubation, cells were stained with fluo3/AM fluorescent dye for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from three independent experiments. Significant differences from the value obtained with cells incubated with medium alone are shown. *, $p < 0.05$

Fig 3B. Cleavage of calpain small regulatory subunit (28 kDa) in Jurkat T cells stimulated with *E. histolytica*.



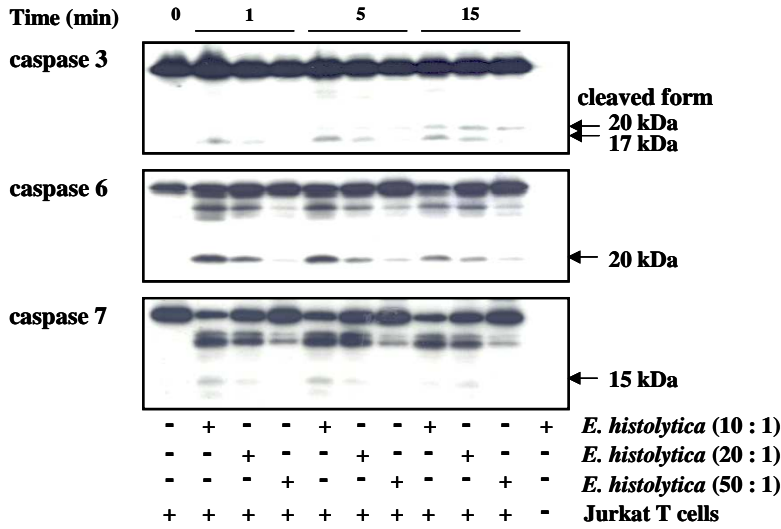
Jurkat T cells (1×10^6 /sample) were incubated for 1-10 min at 37°C with or without *E. histolytica* at a ratio of 10:1, or 20:1 (Jurkat T cells to *E. histolytica*). After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-calpain small subunit Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

4. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포내 caspase의 활성화

Western blot을 이용하여 caspase-3, -6, -7의 활성을 분석하였다. Fig. 4A에서 보면 이질아메바를 첨가 후 Jurkat T 세포내의 caspase-3, -6, -7 모두 배양 시간 및 첨가한 아메바의 수에 비례하여 잘라진 것을 볼 수 있으며 이러한 결과들은 반응 초기인 1분내에서도 관찰할 수 있었다. 특히 이질아메바의 첨가에 의해 Jurkat 세포내 caspase-3이 절단되어 활성화형의 절편인 20 kDa과 17 kDa이 잘 관찰되었다.

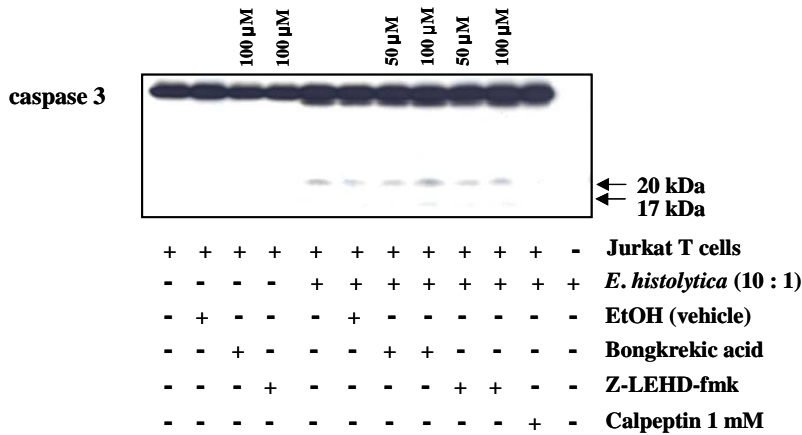
이질아메바에 의해 유도된 caspase-3 활성화에 사립체 (mitochondria)가 관여하는지를 알아보기 위해 사립체 (mitochondria) 막 안정제 (membrane stabilizer)인 bongkreik acid와 caspase-9 억제제인 z-LEHD-fmk를 Jurkat T 세포에 전처리한 후 이질아메바에 의해 유도되는 caspase-3의 활성화에 미치는 영향을 알아보았다. Bongkreik acid와 z-LEHD-fmk 둘 다 caspase 3의 활성을 억제시키지 못하였다 (Fig. 4B).

Fig 4A. Cleavage of caspases in Jurkat T cells stimulated with *E. histolytica*.



Jurkat T cells (1×10^6 /sample) were incubated for 1-15 min at 37 °C with or without *E. histolytica* at a ratio of 10:1, 20:1, or 50:1 (Jurkat T cells to *E. histolytica*). After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-caspase 3, 6, 7 Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

Fig 4B. Effects of bongkreikic acid and z-LEHD-fmk on the *E. histolytica*-induced cleavage of caspase 3 in Jurkat T cells.

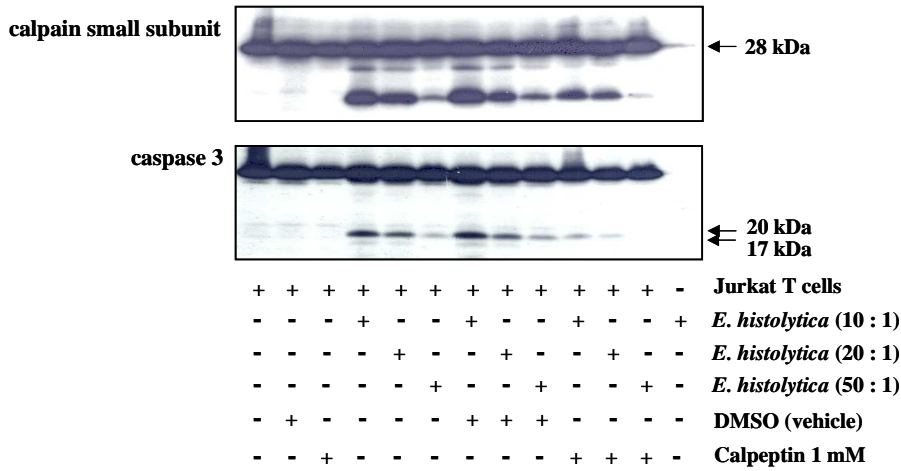


Pretreated Jurkat T cells (1×10^6 /sample) with bongkreikic acid (50-100 μ M), z-LEHD-fmk (50-100 μ M), calpeptin (1 mM), EtOH (1%) were incubated for 5 min at 37 °C in the absence or presence of *E. histolytica* (1×10^5 /sample) in a CO₂ incubator. After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-caspase 3 Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

5. Calpain 활성을 통한 caspase의 활성

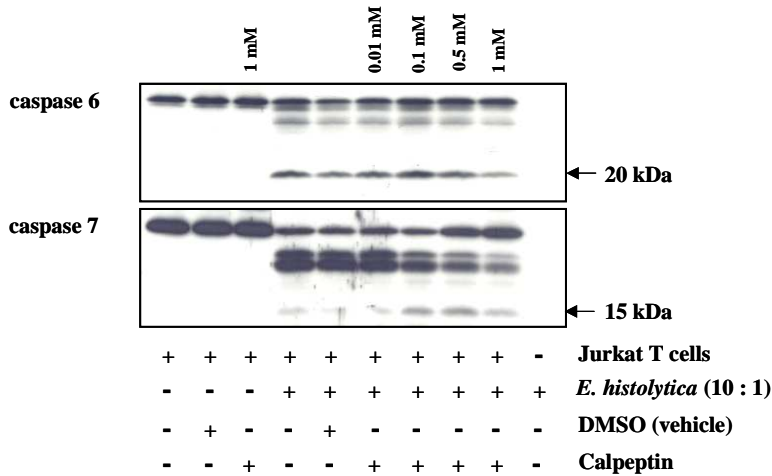
세포사멸과정에 있어 calpain과 caspases가 서로 독립적으로 작용하거나^{19,32,33}, 서로 협력적으로 작용한다는 연구 결과가 있다.³⁴ 따라서 본 연구에서는 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk와 calpain 억제제인 calpeptin을 이용하여 이질아메바에 의해 유도되는 calpain과 caspase 활성간의 신호전달 체계를 알아보았다. Calpeptin을 Jurkat T 세포에 전처리하였을 때 이질아메바에 의해 유도되는 세포내 calpain 및 caspase-3, -6, -7의 활성이 대조군과 비교하였을 때 효과적으로 억제되었다 (Fig. 5A, 5B). 특히 calpeptin 1 mM에서 억제효과가 가장 극적으로 보였다. 이와는 반대로 pan-caspase 억제제인 z-VAD-fmk를 고농도인 100 μ M과 200 μ M로 Jurkat T 세포에 전처리 하였을 때에도 이질아메바에 의해 유도된 calpain의 활성은 전혀 억제되지 않았다 (Fig. 5C).

Fig 5A. Effect of calpain inhibitor on the *E. histolytica*-induced cleavage of calpain small regulatory subunit (28 kDa) and caspase-3 in Jurkat T cells.



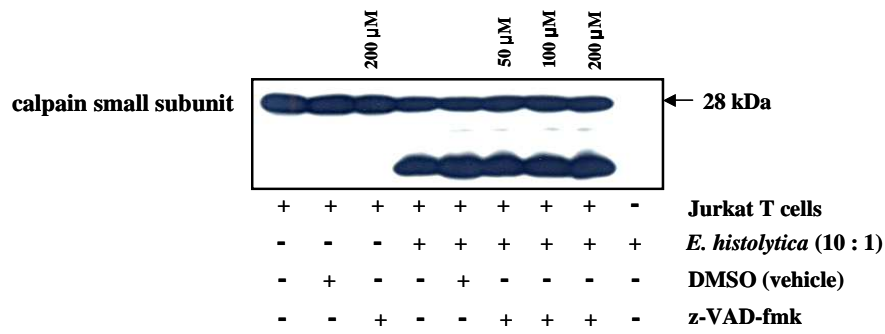
Pretreated Jurkat T cells (1×10^6 /sample) with 1 mM calpeptin or 1% DMSO (v/v) as a control for 15 min at 37°C were incubated with or without *E. histolytica* at a ratio of 10:1, 20:1, or 50:1 (Jurkat T cells to *E. histolytica*) for 1 min at 37°C in a CO₂ incubator. After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-calpain small subunit and anti-caspase 3 Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

Fig 5B. Effect of calpain inhibitor on the *E. histolytica*-induced cleavage of caspase 6 and caspase 7 in Jurkat T cells.



Pretreated Jurkat T cells (1×10^6 /sample) with calpeptin (0.01-1 mM) or 1% DMSO (v/v) as a control for 15 min at 37°C were incubated with or without *E. histolytica* (1×10^5 /sample) for 1 min at 37°C in a CO₂ incubator. After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-caspase 6 and anti-caspase 7 Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

Fig 5C. Effect of pan-caspase inhibitor on the *E. histolytica*-induced cleavage of calpain small regulatory subunit (28 kDa) in Jurkat T cells.

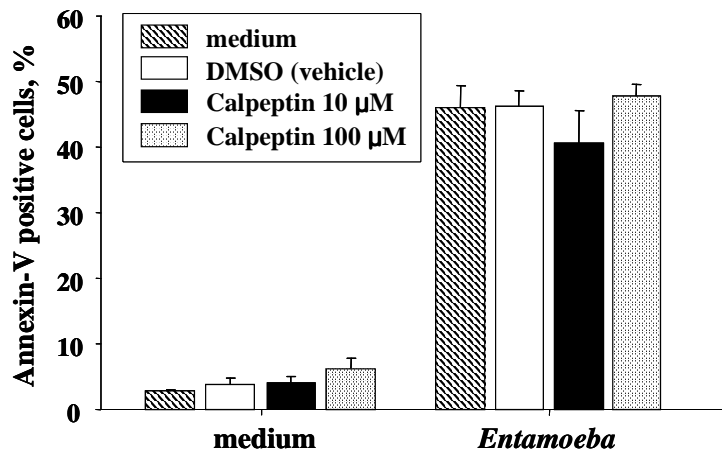


Pretreated Jurkat T cells (1×10^6 /sample) with z-VAD-fmk (5-200 μ M) or 1% DMSO (v/v) as a control for 30 min at 37 $^{\circ}$ C were incubated with or without *E. histolytica* (1×10^5 /sample) for 1 min at 37 $^{\circ}$ C in a CO₂ incubator. After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-calpain small subunit Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

6. 이질아메바에 의해 유도된 Jurkat T 세포에서의 PS 외향화 (externalization)와 DNA 단편형성에 pan-caspase 억제제와 calpain 억제제가 미치는 영향

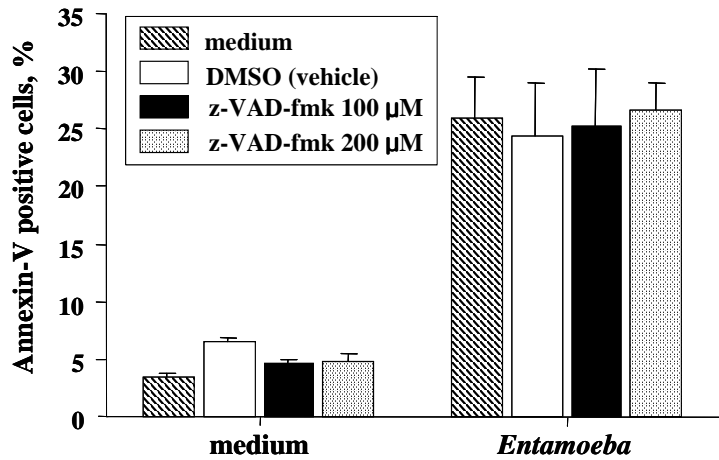
이질아메바에 의해 유도된 Jurkat T 세포의 PS의 노출과 DNA 단편형성에 calpain과 caspase 활성이 필요한지를 확인하기 위해 Jurkat T 세포를 이질아메바 첨가 전 pan-caspase 억제제 또는 calpain 억제제로 전처리 하였다. Z-VAD-fmk와 calpeptin 모두 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포의 PS 외향화를 감소시키지 못했다 (Fig. 6A, 6B). 또한 이질아메바에 의해 유도되는 세포내 DNA 단편형성에 calpain과 caspase의 역할을 알아보았다. Pan-caspase 억제제를 Jurkat T 세포에 전처리 했을 때에는 아메바에 의해 유도된 DNA 단편형성이 현저히 감소된 것을 볼 수 있었지만, calpain 억제제인 calpeptin을 처리하였을 때에는 전혀 억제되지 않았다 (Fig. 6C).

Fig 6A. Effect of various concentrations of calpeptin on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



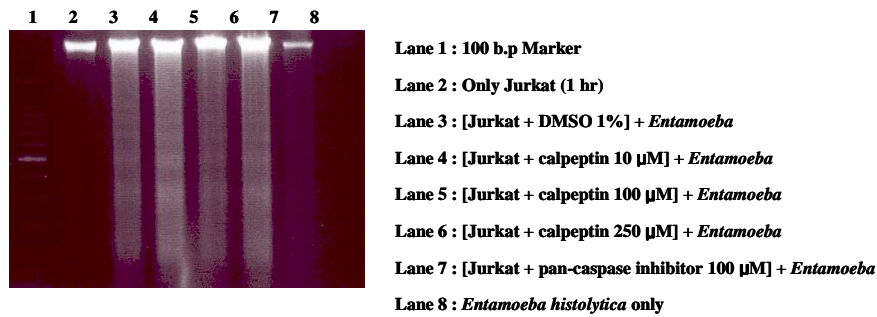
Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with calpeptin (10-100 μ M) or 1% DMSO (v/v) as a control for 60 min at 37 $^{\circ}$ C were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37 $^{\circ}$ C in a CO₂ incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments.

Fig 6B. Effect of various concentrations of z-VAD-fmk on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with z-VAD-fmk (100-200 μ M) or 1% DMSO (v/v) as a control for 30 min at 37 $^{\circ}$ C were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37 $^{\circ}$ C in a CO₂ incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments.

Fig 6C. Effects of calpeptin and z-VAD-fmk on the *E. histolytica*-induced DNA fragmentation in Jurkat T cells.

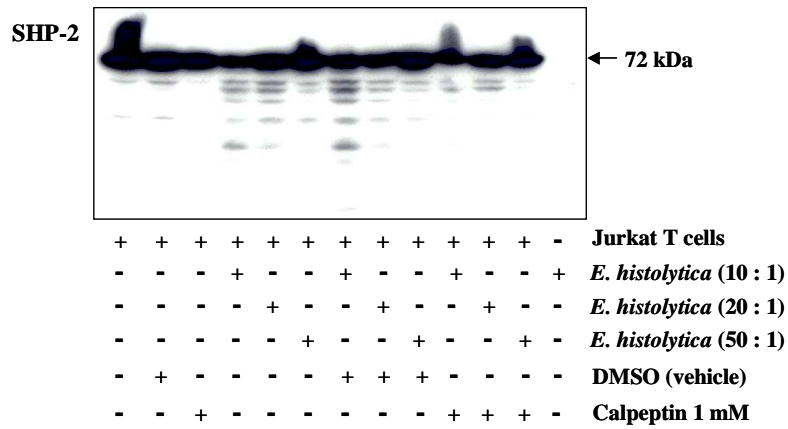


Pretreated Jurkat T cells (4×10^6 /sample) with or without 10-250 μ M calpeptin, 100 μ M z-VAD-fmk for 60 min at 37 $^{\circ}$ C were incubated for 60 min at 37 $^{\circ}$ C in the absence or presence of *E. histolytica* (4×10^5 /sample) in a CO₂ incubator. DNA fragmentation was analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. An equal number of amebae and Jurkat T cells were incubated in medium alone as negative controls.

7. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포내의 타이로신 탈인산화 (tyrosine dephosphorylation)와 SHP-2 단백질 타이로신 인산가수분해효소 (protein tyrosine phosphatase)의 단백질분해 (proteolysis)

숙주세포의 방어기작을 교란시키고 세포생존을 방해하기 위해 이질아메바를 포함한 여러 가지 병원체들은 숙주세포내의 단백질 타이로신 인산가수분해효소 (protein tyrosine phosphatases [PTPases])를 활성화시켜 세포내 신호전달에 중요한 단백질들의 타이로신 인산화 (tyrosine phosphorylation)을 방해할 수 있는 것으로 보고되어 있다.^{35,36} 따라서, 본 연구에서는 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat 세포의 타이로신 탈인산화 현상을 먼저 확인하였다. Jurkat 세포와 이질아메바를 함께 배양한 군에서 이질아메바를 첨가하지 않은 대조군에 비해 단백질들의 현저한 탈인산화가 일어난 것을 보여주고 있다 (Fig. 7A). 다음으로, 타이로신 탈인산화를 유도할 수 능력을 갖고 있는 SHP-2 단백질 타이로신 인산가수분해효소의 활성을 알아보았다. 이질아메바를 Jurkat 세포에 첨가한 후 1분에 SHP-2 인산가수분해효소가 단백질분해된 것을 확인하였다. 그러나 이질아메바의 자극에 의해서는 SHP-2 인산가수분해효소의 인산화는 유도되지 않았다 (Fig. 7B). 이러한 결과는 이질아메바에 의해 유도되는 SHP-2 인산가수분해효소 (phosphatase)의 활성은 인산화가 아닌 단백질분해라는 과정을 통해 이루어짐을 강력히 암시하고 있다. 이질아메바에 의해 유도된 Jurkat T 세포내에 있는 PTPase 중 PTPase 1B는 calpain에 의해 활성화될 수 있다는 기존의 연구 결과에 따라¹² 본 실험에서도 calpain 억제제인 calpeptin을 Jurkat 세포에 전처리한 후 SHP-2 인산가수분해효소의 활성 변화를 알아보았다. Calpeptin을 전처리 하였을 때 이질아메바에 의해 유도되는 SHP-2 인산가수분해효소의 절단양상이 억제된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 7C). 이러한 결과는 이질아메바에 의한 Jurkat 세포내 단백질들의 탈인산화에는 calpain을 통한 SHP-2 인산가수분해효소의 활성이 중요함을 알 수 있다.

Fig 7C. Effect of calpain inhibitor on the *E. histolytica*-induced proteolysis of SHP-2 phosphatase in Jurkat T cells.

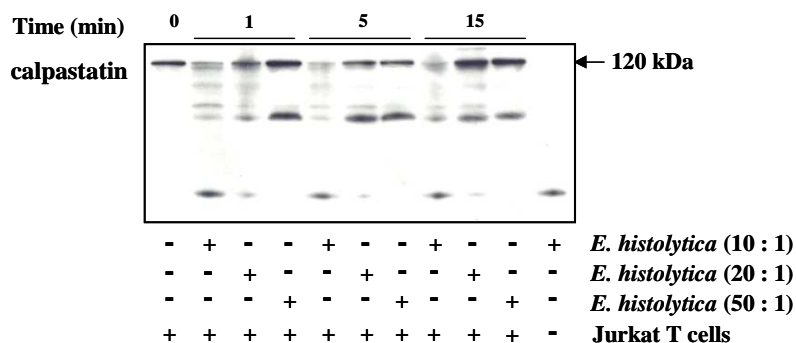


Pretreated Jurkat T cells (1×10^6 /sample) with 1 mM calpeptin or 1% DMSO (v/v) as a control for 15 min at 37°C were incubated with or without *E. histolytica* at a ratio of 10:1, 20:1, or 50:1 (Jurkat T cells to *E. histolytica*) for 1 min at 37°C in a CO₂ incubator. After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-SHP-2 Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

8. 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포내 calpastatin의 절단에 있어서 calpain과 caspase의 역할

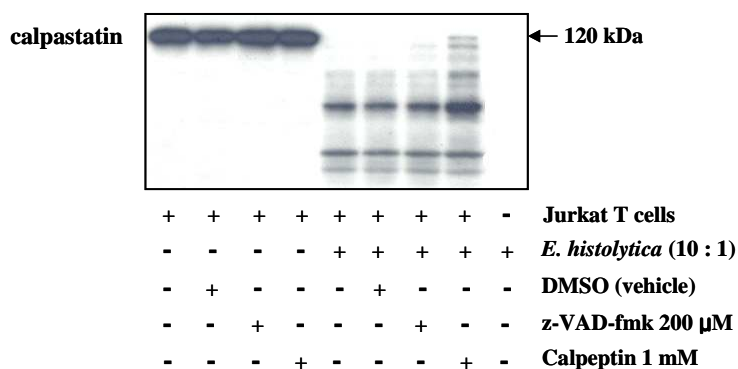
세포내에 존재하는 calpain의 활성 억제자인 calpastatin은 caspase 또는 calpain에 매우 특이적인 기질로 작용하여 calpain의 활성을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다.²⁵ 이질아메바 첨가에 의해 Jurkat 세포내 calpastatin은 빠른 시간 안에 다수의 분획으로 절단되었다 (Fig. 8A). 다음으로 이질아메바에 의해 절단된 calpastatin이 caspases와 calpain의 활성에 의해 조절을 받는지 알아보기 위해 Jurkat T 세포를 이질아메바 첨가 전 pan-caspase 억제제와 calpain 억제제로 각각 전처리 하였다. Calpain 억제제인 calpeptin을 전처리했을 경우 이질아메바에 의한 calpastatin의 단백질 분해가 억제된 반면, pan-caspase 억제제를 처리하였을 때는 전혀 억제되지 못하였다 (Fig. 8B).

Fig 8A. Cleavage of calpastatin in Jurkat T cells stimulated with *E. histolytica*.



Jurkat T cells (1×10^6 /sample) were incubated for 1-15 min at 37°C with or without *E. histolytica* at a ratio of 10:1, 20:1, or 50:1 (Jurkat T cells to *E. histolytica*). After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-calpastatin Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

Fig 8B. Effects of calpeptin and z-VAD-fmk on the *E. histolytica*-induced cleavage of calpastatin in Jurkat T cells.

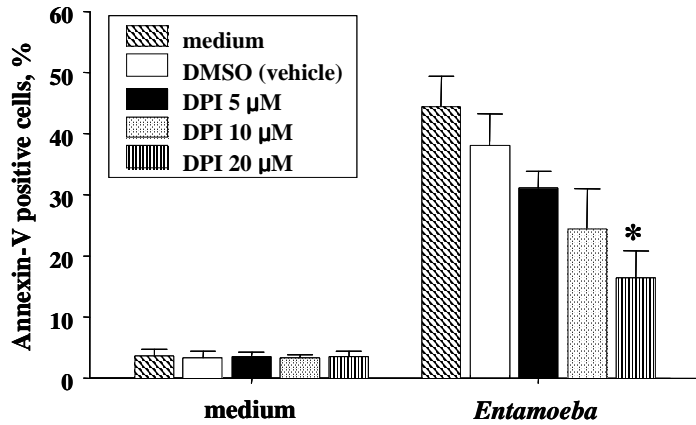


Pretreated Jurkat T cells (1×10^6 /sample) with or without 1 mM calpeptin, 200 μM z-VAD-fmk were incubated for 1 min at 37°C in the absence or presence of *E. histolytica* (1×10^5 /sample) in a CO₂ incubator. After incubation, whole cell lysates were subjected to SDS-PAGE and blotted with anti-calpastatin Ab. The figure is representative of three experiments showing similar results.

9. 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포의 PS 외향화 (externalization)와 DNA 단편형성에 있어서 ROS 억제제의 효과

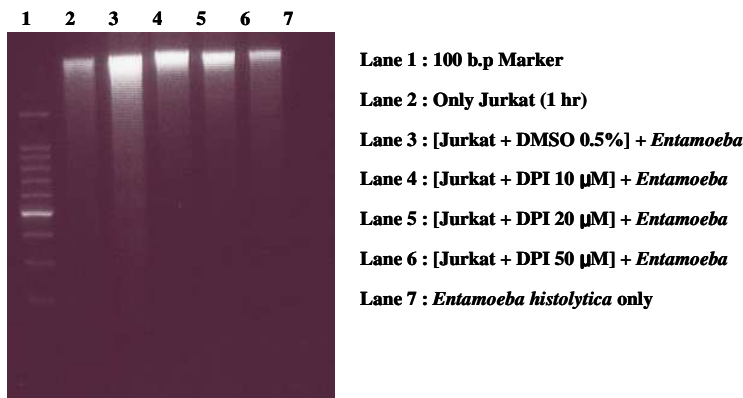
세포내 축적되는 ROS는 세포사멸과정에서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 ROS의 주요 생산장소인 NADPH 산화효소 (oxidase), 사립체 (mitochondria) 및 5-lipoxygenase (LO)의 역할을 조사하였다. NADPH 산화효소 (oxidase)의 플라빈단백 (flavoprotein) 억제제인 DPI, 사립체의 전자전달계 (electron transport chain) 억제제인 rotenone 및 5-LO 억제제인 ETYA를 각각 전처치한 후 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat 세포의 사멸의 억제 효과를 알아보았다. 이질아메바에 의해 유도된 PS 노출 ($44.4 \pm 7.0\%$)은 DPI $20 \mu\text{M}$ 을 전처치 하였을 때 $16.4 \pm 6.3\%$ 으로 크게 억제되었다 (Fig. 9A). 또한, 이질아메바에 의한 Jurkat 세포의 DNA 단편형성도 DPI의 농도에 의존적으로 억제되었다 (Fig. 9B). 반면 rotenone 및 ETYA에 의해서는 이질아메바에 의해 유도된 PS 외향화가 전혀 억제되지 않았다 (Fig. 10, 11). 또한 NO synthase 억제제인 L-NMMA를 Jurkat T 세포에 전처치하였을 때에도 이질아메바에 의한 세포사멸을 억제하지 못하였다 (Fig. 12). 또한 사립체에서 방출된 ROS를 제거할 수 있는 항산화제들인 NAC과 GSH를 Jurkat T 세포에 전처치하였을 때에도 이질아메바에 의한 세포 사멸이 억제되지 않았다 (Fig. 13A, 13B).

Fig 9A. Inhibitory effect of various concentrations of DPI on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



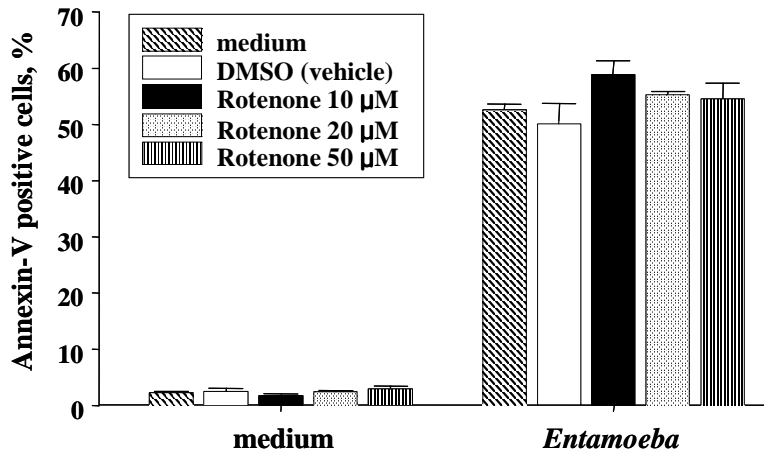
Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with DPI (5-20 μ M) or 1% DMSO (v/v) as a control for 30 min at 37 $^{\circ}$ C were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37 $^{\circ}$ C in a CO₂ incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments. Significant differences from the value obtained with cells incubated with DMSO are shown. *, $p < 0.05$

Fig 9B. Inhibitory effect of various concentrations of DPI on the *E. histolytica*-induced DNA fragmentation in Jurkat T cells.



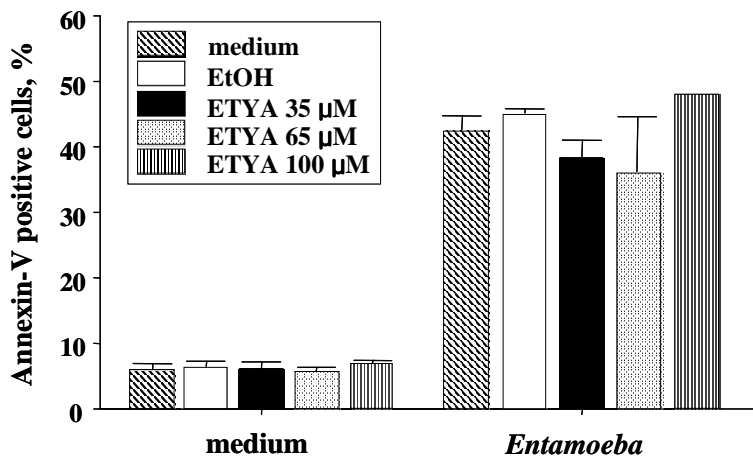
Pretreated Jurkat T cells (4×10^6 /sample) with DPI (10-50 μ M) or 0.5% DMSO (v/v) as a control for 30 min at 37 $^{\circ}$ C were incubated with or without *E. histolytica* (4×10^5 /sample) for 60 min at 37 $^{\circ}$ C in a CO₂ incubator. DNA fragmentation was analyzed by 2% agarose gel electrophoresis. An equal number of amebae and Jurkat T cells were incubated in medium alone as negative controls.

Fig 10. Effect of various concentrations of rotenone on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



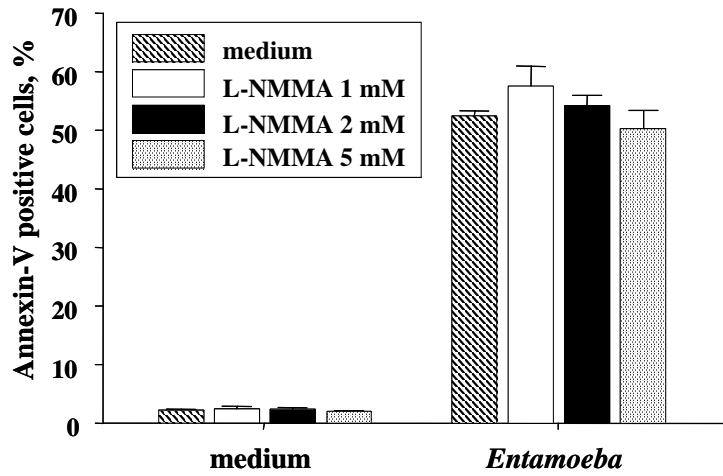
Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with rotenone (10-50 μM) or 1% DMSO (v/v) as a control for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a CO_2 incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments.

Fig 11. Effect of various concentrations of ETYA on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



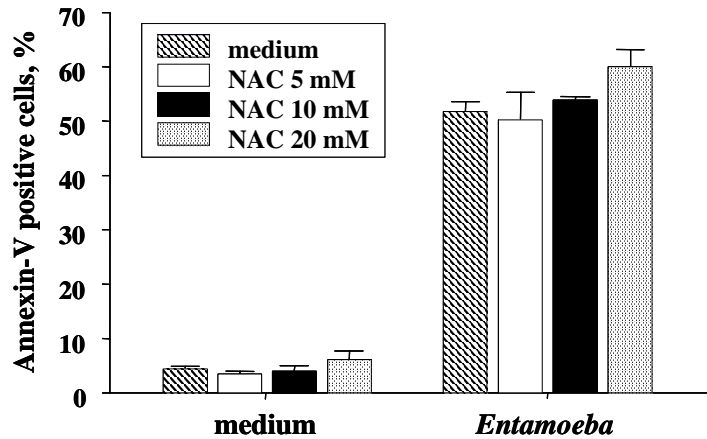
Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with ETYA (35-100 μM) 1% EtOH (v/v) as a control for 30 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37 $^{\circ}\text{C}$ in a CO_2 incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments.

Fig 12. Effect of various concentrations of L-NMMA on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



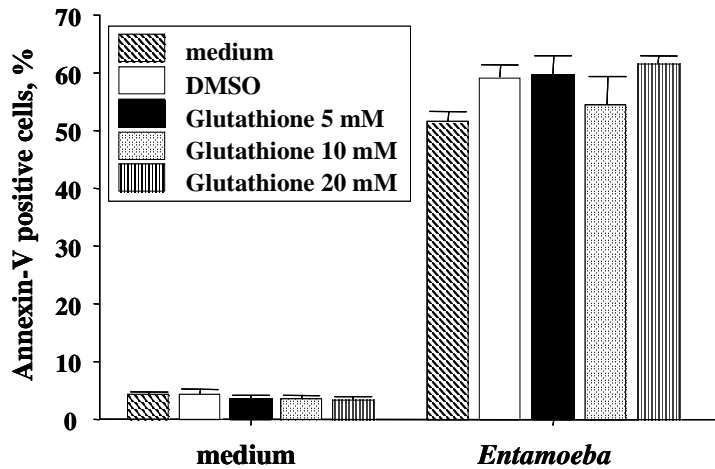
Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with L-NMMA (1-5 mM) for 30 min at 37 °C were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37 °C in a CO₂ incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments.

Fig 13A. Effect of various concentrations of NAC on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



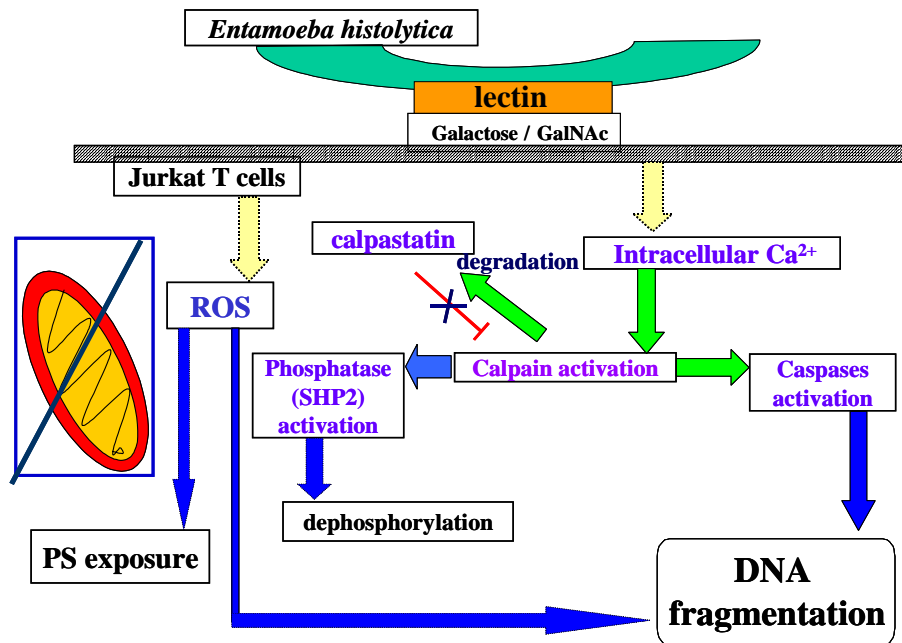
Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with NAC (5-20 mM) for 30 min at 37°C were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37°C in a CO₂ incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments.

Fig 13B. Effect of various concentrations of GSH on the *E. histolytica*-induced PS externalization on the surface of Jurkat T cells.



Pretreated Jurkat T cells (4×10^5 /well) with rotenone (5-20 mM) or 1% DMSO (v/v) as a control for 30 min at 37°C were incubated with or without *E. histolytica* (8×10^4 /well) for 60 min at 37°C in a CO₂ incubator. After incubation, cells were stained with FITC-conjugated annexin V for flow cytometric measurement. Data are presented as mean \pm SEM from five independent experiments.

Fig. 14. Proposed Model of Signaling Pathways of Jurkat T cell death triggered by *Entamoeba histolytica*



IV. 고찰

이질아메바에 의한 숙주세포의 사멸에는 caspase-3의 활성을 통해 이루어지는 것으로 잘 알려져 있으나 calpain과 ROS의 구체적인 신호역할에 대해서는 아직까지 밝혀져 있지 않고 있다. 이 연구에서는 calpain과 ROS를 매개로 하는 신호전달경로가 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포 사멸에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 처음으로 밝혔다. 이와 같은 결론은 다음과 같은 결과들로부터 얻었다. 첫째, 이질아메바와 함께 배양한 Jurkat T 세포는 배양 30분내에 대조군에 비해 유의한 수준의 세포사멸이 잘 관찰되었다. 둘째, 이질아메바에 노출된 후 5분 내에 칼슘이온의 증가와 칼슘의존성 단백분해효소인 calpain의 활성이 Jurkat T 세포에서 잘 관찰되었다. 셋째, 이질아메바의 첨가로 인한 세포내 caspase-3, -6, -7의 활성은 calpain 특이 억제제인 calpeptin 처치에 의해 크게 억제되었다. 이때 calpeptin의 전처치는 이질아메바에 의해 유도된 세포내 calpain의 활성을 억제시켰다. 넷째, 이질아메바의 접촉으로 인한 calpain의 활성은 고농도의 pan-caspase 억제제 (z-VAD-fmk)에 의해서 전혀 영향을 받지 않았다. 다섯째, 이질아메바의 첨가로 인해 유도된 SHP-2 타이로신 인산가수분해효소의 활성이 calpeptin 처치에 의해 크게 억제되었다. 여섯째, 이질아메바에 의한 세포사멸 (PS 외향화 및 DNA 단편형성)은 ROS 억제제인 DPI를 처치하였을 때 크게 억제되었다. 이상의 결과를 요약하면, 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포사멸에는 calpain을 통한 caspase 및 인산가수분해효소의 활성경로, 그리고 ROS를 통한 신호전달이 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다 (Fig. 14)

이 연구에서 보여준 calpain을 통한 caspase의 활성경로와 유사한 신호전달체계는 etoposide에 의해 유도된 생쥐 T 세포 사멸 시,³⁷ B 세포클론의 삭제과정 시,³⁸ 그리고 영양물질을 제거했을 때 유도되는

망막유래세포 죽음 시에³¹ 잘 보고되어 있다. 그러나 이와 반대로 calpain이 활성형의 caspase-9 또는 caspase-3를 직접 절단함으로써 caspase의 세포사멸 기능을 방해할 수 있다는 보고도 있다.³⁹⁻⁴¹ 이와는 반대로 caspase는 calpain의 내재성 억제자인 calpastatin을 가수분해함으로써 calpain의 활성을 촉진시킬 수 있다고 한다.^{16,20,25,42,43} Calpastatin은 세포사멸 시 절단된 형태를 보일 수 있다. 고사 (apoptosis)를 통한 Jurkat T 세포사멸 시에는 110 kDa의 calpastatin 단백질이 75 kDa과 35 kDa의 조각으로 절단되어지고 caspase 특이 억제제에 의해 그 절단이 억제된다.²⁵ 그러나 calpain의 기질로 calpastatin이 작용하였을 때에는,^{44,45} calpain의 단백질분해작용으로 인해 많은 수의 조각으로 calpastatin이 분해된다.⁴⁶ 이 연구에서 관찰한 이질아메바에 의한 세포사멸모델에서는 calpain이 직접 calpastatin을 가수분해함으로써 calpain의 활성을 조절하였다. 즉 이질아메바에 자극은 Jurkat T 세포내 다수의 절단된 형태의 calpastatin을 잘 유도하였으며 이러한 calpastatin의 절단은 calpain 특이 억제제인 calpeptin 처리에 의해서는 잘 억제되었지만 pan-caspase 억제제에 의해서는 전혀 억제되지 않았다. 따라서 이질아메바에 의해서 유도되는 calpain 활성을 통한 calpastatin의 단백질분해는 calpain의 활성을 더욱 증가시켜 세포의 생존과 관련된 여러 가지 단백질들 (caspases 및 PARP)을 가수분해함으로써 세포사멸을 촉진시키는 것으로 추측된다.

다양한 세포사멸모델에서 calpain과 caspase 모두 활성화될 수 있는 것으로 잘 알려져 있다.^{20,32,47-49} 그러나 calpain의 역할은 세포의 종류와 세포사멸 자극인자의 종류에 따라 다르게 나타날 수 있다. 예를 들면 번역 (translation) 억제제인 cycloheximide에 의한 중성구의 DNA 단편형성은 calpain 억제제로 억제되었지만 Fas 수용체를 통한 세포사멸은 calpain 억제제로 억제되지 않았다.⁵⁰ 이러한 결과는 새로운 유전자의 발현이 요구되는 (induction model) DNA 단편형성에는 calpain이 필수적이지만 새로운 유전자발현이 필요 없는 (transduction

model) DNA 단편형성에는 calpain이 무관함을 알 수 있다. 본 연구에서, 이질아메바에 의한 DNA 단편형성은 pan-caspase 억제제로는 억제되었지만 calpain 억제제에 의해서는 전혀 억제되지 않았다. 이러한 결과를 종합하면 이질아메바에 의한 세포의 DNA 단편형성은 calpain의 활성화와 직접적인 관련이 없음을 알 수 있었다. 또한 본 연구에서 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포의 PS 외향화는 pan-caspase 억제제 및 calpain 억제제에 의해 전혀 억제되지 않았다. 고사를 통한 세포사멸의 한 특징인 PS 외향화는 일반적으로 caspase의 활성화와 관련이 있으나^{51,52} 노화된 혈소판의 세포사멸 그리고 etoposide 또는 staurosporine에 의한 세포사멸 시 유도되는 PS의 전치는 caspase의 활성화와 무관하게 일어난다고 보고되어 있다.^{53,54} 따라서 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포의 PS 외향화에는 calpain과 caspase의 활성화가 아닌 다른 신호전달물질의 활성화에 의해서 유도됨을 잘 알 수 있다.

UVB로 유도한 Jurkat T 세포의 죽음은 caspase 활성화와 무관하게 PS의 노출이 유도된다고 보고되어 있으며 이것은 UVB의 자극에 의한 세포내 ROS의 생성과 관련이 있다.⁵⁵ 또한 최근 이질아메바 또는 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*)에 의한 중성구 세포사멸에 있어서 NADPH 산화효소의 활성화로 인해 방출되는 ROS가 매우 중요한 역할을 하고 있음이 알려져 있다.⁵⁶ 이러한 ROS의 생산 장소인 NADPH 산화효소는 중성구 같은 식세포뿐만 아니라 T 세포와 같은 비식세포 (nonphagocytic cell)에서도 유사한 NADPH 산화효소가 존재하고 있음이 최근 알려져 있다.⁵⁷ 따라서 이질아메바에 의해 유도되는 Jurkat T 세포의 세포사멸기전을 밝히기 위해서는 다양한 세포기능의 조절에 중요한 제2의 전달자 (second messengers)인 ROS의 역할을 밝히는 것이 매우 중요하다고 생각하였다. 이 밖에 ROS의 생성 장소로는 사립체와 5-lipoxygenase 등이 있다. 본 실험에서는 NADPH 산화효소, 사립체 전자전달계 및 5-lipoxygenase (LO)의 특

이 억제제인 DPI, rotenone, eicosatetraynoic acid (ETYA)를 Jurkat 세포에 각각 전처리한 후 이질아메바에 의한 세포사멸을 측정하였다. 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포의 PS 외향화와 DNA 단편형성은 DPI 처리에 의해 억제되었지만 rotenone 및 ETYA에 의해서는 전혀 억제되지 않음을 관찰하였다. 이러한 결과는 세포내 NADPH 산화효소에서 유리되는 ROS의 생성이 이질아메바에 의한 세포사멸에 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사하고 있다. 그러나 이질아메바에 의한 Jurkat T 세포 사멸에 있어 NADPH 산화효소의 세밀한 역할에 대하여 보다 더 정밀한 연구를 수행하여야 할 것으로 생각된다.

이질아메바 감염에 의한 숙주조직의 손상은 숙주세포로의 부착(adherence), 부착의존성 세포용해(contact-dependent cytolysis) 및 포식(phagocytosis)의 3가지 단계를 거쳐 이루어지게 된다. 이러한 세가지 과정은 이질아메바의 병원성과 직접적인 관련이 있다. 이질아메바의 부착에 의한 숙주세포 사멸은 세포내에 있는 고사 유도 기기가 활성화됨으로써 이루어지는 것으로 이해하고 있다. 최근보고에 의하면 많은 병원체들은 감염시 숙주세포의 생존과 죽음을 조절할 수 있다. 괴사(necrosis)와 달리 고사를 통한 세포사멸은 조직염증반응을 유도하지 않아 병원체의 생존에 유리하며 그리고 과격한 염증반응으로 인한 조직손상을 막을 수 있어 병원체와 숙주에 모두 다 유익한 면역반응이다. 이질아메바 외에도 다른 병원체에 의한 숙주세포의 고사 기전이 자세히 연구되고 있다. 즉, 소의 생식기에 기생하며 트리코모나스증(trichomoniasis)을 일으키는 기생원충인 트리코모나스 페투스(*Trichomonas foetus*)는 caspase-3의 활성을 유도하여 생식기의 상피세포를 사멸시킨다.⁵⁸ Group B *Streptococcus* (GBS)는 쥐의 대식세포(macrophages)에서 세포사멸을 유도한다. GBS는 β -hemolysin을 생성하여 숙주세포내의 막 투과성을 증가시켜 칼슘이온농도를 높인다. 이러한 변화로 인한 대식세포의 사멸은 β -hemolysin 생성 억제제와 칼슘 억제제에 의해 억제되었으나 caspase 억제제에 의해서는 억

제되지 않았다.⁵⁹ 또한 인체의 위점막에 기생하는 *Helicobacter pylori*도 숙주세포의 면역반응을 피하기 위해 대식세포를 사멸시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다. *Helicobacter pylori*에 감염에 의해 세포사멸은 세포내 다아민 산화효소 (polyamine oxidase 1)의 활성화로 인한 ROS의 생산과 사립체 막 분극 (depolarization)을 통해 이루어진다.⁶⁰ 재향군인병 (legionnaires' disease)을 일으키는 레지오넬라 뉴모필라 (*Legionella pneumophila*)는 인체의 폐포에 감염되어 폐포 상피세포와 대식세포를 사멸시킨다. 레지오넬라 균에 의한 U937 대식세포의 사멸은 caspase-3의 활성화로 인한 PARP의 절단을 통해 이루어지며, caspase-3 특이 억제제 처리시 caspase-3의 활성화와 세포사멸이 억제된다고 보고되어 있다.⁶¹ 이와는 반대로 세포내 기생하는 어떤 병원체는 숙주세포의 죽음을 억제시킴으로써 병원체의 증식과 생존을 확보하려 한다. 예를 들면 톡소포자충 (*Toxoplasma gondii*)은 숙주세포에 감염 시 NF- κ B의 활성을 통한 고사억제 (ant-apoptotic) 단백질들의 생산이 증가되어 세포사멸이 억제된다.⁶² 따라서 병원체에 의한 숙주세포의 생존과 사멸의 조절기전에 대한 연구는 체내에서 일어나는 숙주와 병원체간의 상호관계를 정확히 이해할 수 있어 매우 중요하다.

V. 결론

이질아메바에 의한 세포사멸에는 calpain을 통한 caspase 및 인산가수분해효소의 활성화 경로와 ROS를 매개로 한 신호경로가 매우 중요함을 알 수 있었다. 이러한 신호전달경로는 이질아메바에 의한 세포사멸의 기전을 보다 확실히 이해할 수 있어 이질아메바증의 병인과정을 밝히는데 도움을 줄 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

1. Stanley SL JR, Reed SL. Microbes and microbial toxin: paradigms for microbial-mucosal interactions. VI. *Entamoeba histolytica*: parasite-host interactions. Sm J physiol Gastrointest Liver Physiol 2001;280:G1049-1054.
2. Espinosa-Cantellano M, Martinex-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amebiasis: from molecules to disease. Microbial Rev 2000;13:318-331.
3. Hughes MA, Lee CW, Holm CF, Ghosh S, Mills A, Lockhart LA, et al. Identification of *Entamoeba histolytica* thiol-specific antioxidant as a GalNAc lectin-associated protein. Mol Biochim Parasitol 2003;127:113-120.
4. Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR. Waterborne protozoan pathogens. Clin Microbiol Rev 1997;10(1):67-85.
5. Teixeira JE, Mann BJ. *Entamoeba histolytica*-induced dephosphorylation in host cells. Infect Immun 2002;70(4):1816-1823.
6. Leippe M, Ebel S, Schoenberger OL, Horstmann RD, Muller-Eberhard HJ. Pore-forming peptide of pathogenic *Entamoeba histolytica*. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:7659-7663.
7. Seydel KB, Stanley SL Jr. *Entamoeba histolytica* induces host cell death in amebic liver abscess by a non-Fas-dependent, non-tumor necrosis factor α -dependent pathway of apoptosis. Infect Immun 1998;66:2980-2983.
8. Ragland BD, Ashley LS, Vaux DL, Petri WA. *Entamoeba histolytica*: target cells killed by trophozoites undergo apoptosis

- which is not blocked by bcl-2. *Exp Parasitol* 1994;79:460-467.
9. Ravdin JI, Moreau F, Sullivan JA, Petri WA Jr, Mandell GL. Relationship of free intracellular calcium to the cytolytic activity of *Entamoeba histolytica*. *Infect Immun* 1988;56:1505-1512.
 10. Ravdin JI, Murphy CF, Guerran RL, Long-Krug SA. Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1985;152:542-549.
 11. Ravdin JI, Sperelakis N, Guerrant R L. Effect of ion channel inhibitors on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1982;146:335-340.
 12. Neumar RW, Xu YA, Gada H, Guttman RP, Siman R. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278(16):14162-14167.
 13. Frangioni JV, Oda A, Smith M, Salzman EW, Neel BG. Calpain-catalyzed cleavage and subcellular relocation of protein phosphotyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) in human platelets. *EMBO J* 1993;12:4843-4856.
 14. Saido TC, Sorimachi H, Suzuki K. Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J* 1994;8(11):814-822.
 15. Perrin BJ, Huttenlocher A. Calpain. *Int J Biochem Cell Biol* 2002;34:722-725.
 16. Neumar RW, Xu YA, Gada H, Guttman RP, Siman R. Cross-talk between calpain and caspase proteolytic systems during neuronal apoptosis. *J Biol Chem*

- 2003;278(16):14162-14167.
17. Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol* 1994;159(2):229-237.
 18. Witkowski JM, Zmuda-Trzebiatowska E, Swiercz JM, Cichorek M, Ciepluch H, Lewandowski K et al. Modulation of the activity of calcium-activated neutral proteases (calpains) in chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) cells. *Blood* 2002;100(5):1802-1809.
 19. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000;150(4):887-894.
 20. Waterhouse NJ, Finucane DM, Green DR, Elce JS, Kumar S, Alnemri ES, et al. Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death Differ* 1998;5(12):1051-1061.
 21. Porn-Ares MI, Samali A, Orrenius S. Cleavage of the calpain inhibitor, calpastatin, during apoptosis. *Cell Death Differ* 1998;5(12):1028-1033.
 22. Carmody RJ, Cotter TG. Oxidative stress induces caspase-independent retinal apoptosis in vitro. *Cell Death Differ* 2000;7(3):282-291.
 23. Donovan M, Carmody RJ, Cotter TG. Light-induced photoreceptor apoptosis in vivo requires neuronal nitric-oxide synthase and guanylate cyclase activity and is caspase-3-independent. *J Biol Chem* 2001;276(25):23000-23008.
 24. Doonan F, Donovan M, Cotter TG. Caspase-independent photoreceptor apoptosis in mouse models of retinal degeneration. *J Neurosci* 2003;23(13):5723-5731.

25. Wang KK, Posmantur R, Nadimpalli R, Nath R, Mohan P, Nixon RA, et al. Caspase-mediated fragmentation of calpain inhibitor protein calpastatin during apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 1998;356(2):187-196.
26. Shi Y, Melnikov VY, Schrier RW, Edelstein CL. Downregulation of the calpain inhibitor protein calpastatin by caspases during renal ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000;279(3):F509-517.
27. Sim S, Yong TS, Park SJ, Im KI, Kong Y, Ryu JS, et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of *ERK1/2* is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J Immunol* 2005;174(7):4279-4288.
28. Diamond LS, Harlow DR, Cunnick CC . A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. *Trans.R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1978;72:431-432.
29. Gobeil S, Boucher CC, Nadeau D, Poirier GG. Characterization of the necrotic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1): implication of lysosomal proteases. *Cell Death Differ* 2001;8(6):588-594.
30. Ravdin JI, Croft BY, Guerrant RL. Cytopathogenic mechanisms of *Entamoeba histolytica*. *J. Exp. Med* 1980;152:377-390.
31. Gómez-Vicente V, Donovan M , Cotter TG. Multiple death pathways in retina-derived 661W cells following growth factor deprivation: crosstalk between caspases and calpains. *Cell Death and Differentiation* 2005;12:796-804.
32. Knepper-Nicolai B, Savill J, Brown SB. Constitutive apoptosis in human neutrophils requires synergy between calpains and

- the proteasome downstream of caspases. *J Biol Chem* 1998;273(46):30530-30536.
33. Gao G, Dou QP. N-terminal cleavage of bax by calpain generates a potent proapoptotic 18-kDa fragment that promotes bcl-2-independent cytochrome C release and apoptotic cell death. *J Cell Biochem* 2000;80(1):53-72.
 34. Li M, Kondo T, Zhao QL, Li FJ, Tanabe K, Arai Y, et al. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *J Biol Chem* 2000 ;275(50):39702-39709.
 35. Guan KL, Dixon JE. Protein tyrosine phosphatase activity of an essential virulence determinant in *Yersinia*. *Science* 1990;249:553-556.
 36. Nandan D, Knutson KL, Lo R, Reiner NE. Exploitation of host cell signaling machinery: activation of macrophage phosphotyrosine phosphatases as a novel mechanism of molecular microbial pathogenesis. *J Leukoc Biol* 2000;67:464-470.
 37. Varghese J, Radhika G, Sarin A. The role of calpain in caspase activation during etoposide induced apoptosis in T cells. *Eur J Immunol* 2001;31(7):2035-2041.
 38. Ruiz-Vela A, Gonzalez de Buitrago G, Martinez-A C. Implication of calpain in caspase activation during B cell clonal deletion. *EMBO J* 1999;18(18):4988-4998.
 39. Chua BT, Guo K, Li P. Direct cleavage by the calcium-activated protease calpain can lead to inactivation of caspases. *J Biol Chem* 2000;275(7):5131-5135.
 40. Bizat N, Hermel JM, Humbert S, Jacquard C, Creminon C,

- Escartin C, et al. In vivo calpain/caspase cross-talk during 3-nitropropionic acid-induced striatal degeneration: implication of a calpain-mediated cleavage of active caspase-3. *J Biol Chem* 2003;278(44):43245-43253.
41. Volbracht C, Chua BT, Ng CP, Bahr BA, Hong W, Li P. The critical role of calpain versus caspase activation in excitotoxic injury induced by nitric oxide. *J Neurochem* 2005;93(5):1280-1292.
 42. Barnoy S, Kosower NS. Caspase-1-induced calpastatin degradation in myoblast differentiation and fusion: cross-talk between the caspase and calpain systems. *FEBS Lett* 2003;546(2-3):213-217.
 43. Vaisid T, Kosower NS, Barnoy S. Caspase-1 activity is required for neuronal differentiation of PC12 cells: cross-talk between the caspase and calpain systems. *Biochim Biophys Acta* 2005;1743(3):223-230.
 44. Nagao S, Saido TC, Akita Y, Tsuchiya T, Suzuki K, Kawashima S. Calpain-calpastatin interactions in epidermoid carcinoma KB cells. *J Biochem (Tokyo)* 1994;115(6):1178-1184.
 45. Blomgren K, Hallin U, Andersson AL, Puka-Sundvall M, Bahr BA, McRae A, et al. Calpastatin is up-regulated in response to hypoxia and is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Biol Chem* 1999;274(20):14046-14052.
 46. Wang KK. Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* 2000;23(1):20-26.
 47. Nath R, Raser KJ, Stafford D, Hajimohammadreza I, Posner A, Allen H, et al. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by

- calpain and interleukin 1 β -converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem J* 1996;319 (Pt 3):683-690.
48. Wood DE, Newcomb EW. Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1999 Mar 19;274(12):8309-8315.
 49. Brown SB, Bailey K, Savill J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* 1997;323 (Pt 1):233-237.
 50. Squier MK, Sehnert AJ, Sellins KS, Malkinson AM, Takano E, Cohen JJ. Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* 1999;178(3):311-319.
 51. Martin SJ, Finucane DM, Amarante-Mendes GP, O'Brien GA, Green DR. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts requires ICE/CED-3 protease activity. *J Biol Chem* 1996;271(46):28753-28756.
 52. Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271(49):31075-31085.
 53. Brown SB, Clarke MC, Magowan L, Sanderson H, Savill J. Constitutive death of platelets leading to scavenger receptor-mediated phagocytosis. A caspase-independent cell clearance program. *J Biol Chem* 2000;275(8):5987-5996.
 54. Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard JP, Genestier L. Caspase-independent phosphatidylserine exposure during apoptosis of primary T lymphocytes. *J Immunol* 2002;169(9):4805-4810.

55. Murahashi H, Azuma H, Zamzami N, Furuya KJ, Ikebuchi K, Yamaguchi M, et al. Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leukoc Biol* 2003;73(3):399-406.
56. Perskvist N, Long M, Stendahl O, Zheng L. Mycobacterium tuberculosis promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-xL via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol* 2002;168(12):6358-6365.
57. Jackson SH, Devadas S, Kwon J, Pinto LA, Williams MS. T cells express a phagocyte-type NADPH oxidase that is activated after T cell receptor stimulation. *Nat Immunol* 2004;5(8):818-827.
58. Singh BN, Lucas JJ, Hayes GR, Kumar Ish, Beach DH, Frajblat Marcel, et al. *Tritrichomonas foetus* Induces Apoptotic Cell Death in Bovine Vaginal Epithelial Cells. *Infect Immun* 2004;72:4151-4158.
59. Katia Fettucciari, Emanuela Rosati, Lucia Scaringi, Paola Cornacchione, Graziella Migliorati, Rita Sabatini, et al. Group B *Streptococcus* Induces Apoptosis in Macrophages. *J Immunol* 2000;165:3923-3933.
60. Rupesh Chaturvedi, Yulan Cheng, Mohammad Asim, Bussiere FI, Hangxiu Xu, Gobert AP, et al. Induction of Polyamine Oxidase 1 by *Helicobacter pylori* Causes Macrophage Apoptosis by Hydrogen Peroxide Release and Mitochondrial Membrane Depolarization. *J Biol Chem* 2004;279(38):40161-40173.

61. Gao LY, Yousef AK. Activation of Caspase 3 during *Legionella pneumophila*-Induced Apoptosis. Infect Immun 1999;67:4886-4894.
62. Payne TM, Molestina RE, Sinai AP. Inhibition of caspase activation and a requirement for NF-kappaB function in the *Toxoplasma gondii*-mediated blockade of host apoptosis. J Cell Sci 2003;116(Pt 21):4345-4358.

Abstract

Role of calpain and reactive oxygen species in cell death of Jurkat T cells induced by *Entamoeba histolytica*

Kyeong Ah Kim

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Myeong Heon Shin)

Entamoeba histolytica is a tissue-invasive protozoan parasite that causes amoebic dysentery and liver abscess in human beings. To silence host immune responses, *Entamoeba histolytica* can induce cell death of host immune cells through apoptosis. It has been well known that elevation of intracellular Ca^{2+} and activation of caspase-3 play important role in *Entamoeba*-induced cell death. However, detailed signaling mechanism of cell death induced by *E. histolytica* remains to be identified. In this study, we investigated a signaling role of calpain and reactive oxygen species (ROS) in the *Entamoeba*-triggered cell death model. Reduced viability, phosphatidylserine externalization, PARP degradation, and DNA fragmentation in Jurkat T cells were induced following exposure to live trophozoites of *E. histolytica*. Incubation of Jurkat T cells with *E. histolytica* resulted in cleavage of caspase-3, -6, and -7 as well as elevation of intracellular calcium level. Calpain activation in

Jurkat cells also occurred as early as 1 min after exposure of *Entamoeba*, which was evidenced by the cleavage of small regulatory subunit (30 kDa) of calpain. We also observed multiple fragmentation of calpastatin, endogenous calpain inhibitor, in Jurkat cells following exposure of the *amoeba*. The *Entamoeba*-induced cleavage of caspase-3, -6 and -7 were markedly inhibited by calpain inhibitor calpeptin. Calpeptin effectively inhibited *Entamoeba*-induced calpain activation. In contrast, pretreatment of cells with pan-caspase inhibitor z-VAD-fmk did not block the calpain activation by the *Entamoeba*. *Entamoeba*-induced calpastatin degradation was strongly retarded by pretreatment of cells with calpeptin, but not z-VAD-fmk. We next examined whether *E. histolytica* can induce activation of SHP-2 tyrosine phosphatase, and whether *Entamoeba*-induced SHP-2 tyrosine phosphatase is regulated by calpain. Incubation with *Entamoeba histolytica* markedly caused tyrosine dephosphorylation and proteolysis of SHP-2 tyrosine phosphatase in Jurkat T cells. *Entamoeba*-induced cleavage of SHP-2 phosphatase was strongly inhibited by pretreatment of cells with calpeptin.

Pan-caspase inhibitor effectively inhibited the *Entamoeba*-induced DNA fragmentation, but not PS externalization, in Jurkat T cells. Calpeptin did not inhibit either DNA fragmentation or PS externalization induced by *E. histolytica*. These results led us to speculate that ROS-dependent pathways is involved in *Entamoeba*-induced death in Jurkat T cell. We therefore examined whether diphenylneiodonium (DPI), which is a ROS inhibitor, can inhibit *Entamoeba*-induced PS externalization and DNA fragmentation. Pretreatment of cells with DPI resulted in

marked reduction of PS externalization and DNA fragmentation induced by *E. histolytica*. However, mitochondrial inhibitor rotenone and 5-LO inhibitor ETYA failed to inhibit *Entamoeba*-induced cell death in Jurkat T cells. All together, our results suggest that calpain-mediated activation of caspases and SHP-2 tyrosine phosphatase and/or ROS-dependent pathways is closely linked to apoptotic process in Jurkat T cells induced by *E. histolytica*.

Key words : *Entamoeba histolytica*, Jurkat T cell, apoptosis, calpain, reactive oxygen species, caspases, calpastatin, tyrosine phosphatase