

가시아메바의 마우스 감염시 발현이
증가하는 유전자의 동정

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 돈 수

가시아메바의 마우스 감염시 발현이
증가하는 유전자의 동정

지도교수 용 태 순

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

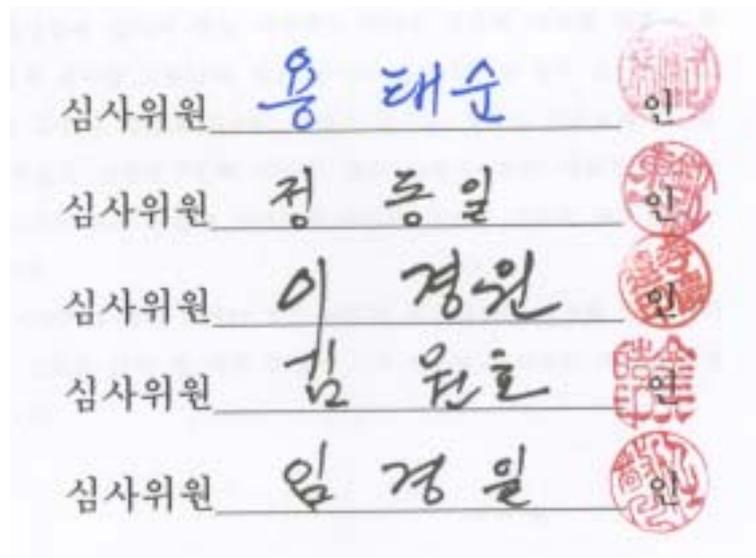
2002년 6 월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 돈 수

김돈수의 박사 학위논문을 인준함



연세대학교 대학원

2002년 6월 5일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어서 항상 자상하고 세심한 지도와 격려를 베풀어 주신 용태순 교수님께 감사를 드립니다. 또한 동시에 연구기간 중 많은 조언과 지도를 해주신 임경일 교수님, 김원호 교수님, 이경원 교수님, 정동일 교수님께 감사를 드리며 자료의 수집과 실험연구진행 과정에 많은 도움을 주신 박순정 교수님, 한규리 선생님 그리고 모든 교실원 여러분의 따뜻한 배려에 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 한없는 사랑으로 감싸 주시는 저희 내외의 부모님들께 감사를 드리며 가까이에서 고틱을 같이 한 아내 은영과 두 아들에게 사랑의 마음과 함께 이 논문을 드립니다.

저자 씀

차 례

| | |
|--------------------------------------------------------------------|----|
| 국문요약 | 1 |
| I. 서 론 | 3 |
| II. 재료 및 방법 | 6 |
| 1. Amoeba의 배양 | 6 |
| 2. 가시아메바에 의한 마우스의 감염 | 6 |
| 3. 마우스를 이용한 병원성 검정 | 6 |
| 4. Total RNA분리 | 7 |
| 5. Single stranded cDNA의 합성 | 8 |
| 6. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction : PCR) | 8 |
| 7. 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)을 통한 증폭 산물의 분석 | 9 |
| 8. 감염 군에서 증가하는 증폭산물의 재증폭 | 11 |
| 9. 증폭산물의 Cloning | 11 |
| 10. Northern blot 분석 | 12 |
| 11. DNA 염기서열 분석 | 14 |
| 12. DD RT-PCR에서 선별된 clone의 정보 검색 | 14 |

| | |
|----------------------------------------------------|----|
| III. 결 과 | 15 |
| 1. 가시아메바의 마우스 감염에 의한 병원성 증가 | 15 |
| 2. Total RNA의 분리 | 16 |
| 3. DD RT-PCR 증폭산물의 분석 | 16 |
| 4. 감염군에서 증가하는 DNA 분획의 재 증폭 | 20 |
| 5. Northern blot 분석에 의한 감염군에서의 발현 증가 재 확인 | 22 |
| 6. 가시아메바에 의해서만 증폭된 DNA의 고유성 확인 | 24 |
| 7. DD RT-PCR에서 선별된 clone의 유전자 동정 | 26 |
| IV. 고 찰 | 28 |
| V. 결 론 | 31 |
| 참고문헌 | 33 |
| 영문요약 | 37 |

그림 차례

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 그림 1. Schematic diagram of Differential Display reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (DD RT-PCR) | 10 |
| 그림 2 Survival rate of mice infected with <i>A. culbertsoni</i> | 15 |
| 그림 3. Differential display using adenine-base anchored-oligo-dT primers. | 17 |
| 그림 4. Differential display using cytosine-base anchored-oligo-dT primers | 18 |
| 그림 5. Differential display using guanine-base anchored-oligo-dT primers | 19 |
| 그림 6. Re-amplification of clones selected by DD RT-PCR. | 21 |
| 그림 7. Northern blot analysis of <i>A. culbertsoni</i> | 23 |
| 그림 8. DNA polymerase chain reaction of 3G for conform it that origin from <i>A. culbertsoni</i> | 25 |

표 차례

| | |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 표 1. Identification of clones selected by DD RT- PCR | 27 |
|---------------------------------------------------------------|----|

-국문요약-

가시아메바의 마우스 감염시 발현이 증가하는 유전자의 동정

토양이나 하천, 호수 등 주위 여러 환경에서 서식하는 자유생활 아메바 중 가시아메바(*Acanthamoeba culbertsoni*)는 Granulomatous amoebic encephalitis (GAE), 및 원발성 아메바성 수막뇌염을 일으킨다. 이러한 가시아메바는 오랜 기간 실험실에서 배양하는 동안 병독성이 감소하며 마우스의 비강내 감염이나 마우스 뇌감염의 반복으로 병독성이 다시 회복하는 것으로 알려져 있다. 특히 재차 감염시 아메바의 peroxidase와 proteinase의 활성이 증가했다고 발표된 바 있다. 따라서 가시아메바를 마우스에 계대감염하면 병원성이 증가하고 이에 관련된 여러 인자들의 발현이 변화되어 병독성 증가에 영향을 미칠 것으로 생각되어 진다. 본 연구에서는 오랜 기간 실험실에서 배양해온 병독성이 감소된 아메바를 비강내에 감염시키고 마우스가 죽으면 뇌에서 아메바를 적출해 단기간 배양하여 다시 같은 방법으로 재 감염시켜 총 3차 감염을 실시했다. 각 계대감염 단계의 아메바를 모아 total RNA를 분리해 cDNA를 합성하여 arbitrary primer와 함께 Differential Display Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (DD RT-PCR) 수행하였다. DD RT-PCR에서 마우스 감염시에 증가된 DNA조각을 선택하여 cloning하고 이를 Northern blot hybridization의 probe로 사용하여 전사단계에서도 이러한 유전자들의 발현이 증가하는지 재확인하였다. 또한 선택된 분획들은 DNA염기서열을 분석하여 유전자의 정보를 알아냈다. DDRT-PCR에서 마우스 감염시 증가된 15개의 분획을 선택하였으며 Northern blot hybridization에서 다시 확인한 결과 10개의 분획이 증가하는 양상을 확인하였다. 이 10개의 분획을 DNA염기서열을 분석하여 유전자의 정보를 찾아본 결과 4개의 분획은 유사한

정보를 찾을 수가 없었으며 그 외에는 ING p33/p47 tumor suppressor protein, 진핵생물의 전사 조절 단백질의 일종인 fet5, 전자전달계에 관여하는 효소중의 하나인 NADH-dehydrogenase, proteasomal ATPase 그리고 GDP-mannose pyrophosphorylase와 유사한 염기서열을 나타내었다. 특히 본 실험에서는 병독성과 연관된 nuoG 유전자를 포함하고 있는 NADH dehydrogenase와 세포내 단백질 분해 과정에 중요한 복합체인 proteasomal ATPase 그리고 병독성 유전자로 알려진 GDP mannose pyrophosphorylase를 분리하였다.

본 연구에서는 오랜기간 배양하여 병독성이 감소한 아메바를 마우스에 감염시켰을 때 여러 물질대사 또는 병독성 관련 유전자들의 발현이 변동함에 따라 아메바의 병독성이 증가하는 것으로 보이며 이러한 관련 유전자를 찾아내고 그 기능을 밝힘으로써 병독성 인자를 밝히는데 기초 자료가 될 수 있다고 본다.

핵심되는 말 : 가시아메바, 병독성, DD RT-PCR, Northern blot hybridization

가시아메바의 마우스 감염시 발현이 증가하는 유전자의 동정

<지도교수 옹 태 순>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 돈 수

I. 서 론

자유생활 아메바는 토양이나 하천, 호수 등 여러 환경에서 서식하는 원생 동물로, 때때로 원발성 아메바성 수막뇌염을 일으키고¹⁻³, 또한 시력 장애를 유발하는 각막염의 원인으로 알려져 왔다^{4,5,6}. 최근에는 후천성 면역결핍증 환자에게 감염되어 급성 피부염 및 수막염을 일으키는 사례가 보고 되면서 관심을 받고 있다⁷⁻⁹. 특히, 자유생활 아메바가 인체에 감염되었을 경우 급성으로 병변이 진행되는 경향이 있다고 보고되었고¹⁰, 따라서 이러한 아메바성 질환의 조기진단은 매우 중요하다고 볼 수 있다. 현재까지 자유생활 아메바의 진단방법은 아메바를 직접 검체로부터 검출하거나^{11,12}, 감염으로 인해 숙주 체내에서 일어나는 여러 변화를 확인하는 것이 있는데 두 방법 모두 오랜 시간이 걸리고 정확도에 있어서 문제점이 있다¹³⁻¹⁵. 또한 아직까지 자유생활 아메바가 일으키는 아메바성 수막뇌염이 어떠한 원인과 기작으로 발생하는 것인지 알려진 바가 없으므로 이의 진단과 치료를 위해서는 자유생활아메바가 감염되었을 때

일어나는 기작과 병원성의 원인을 밝히는 것이 선행되어야 한다.

최근 분자생물학의 발달에 따라 mRNA를 주형으로 합성한 cDNA를 부분적으로 증폭함으로써 서로 다른 조직, 분할 단계 그리고 발달단계에 따른 유전자 발현상의 차이를 분석할 수 있는 DD RT-PCR 방법이 개발되어 암세포 특이적인 mRNA¹⁶, 인체 뇌 조직 특이적인 mRNA¹⁷와 coccidian parasite(*Eimeria bovis*)의 분화단계 특이적인 mRNA¹⁸의 분리가 보고되었다. 그리고 최근에는 DD RT-PCR을 이용하여 사람의 carcinoma cell에 특이한 유전자로 glycosyltransferase family 등을 밝혀 냈고¹⁹, Schistosome이 감염되었을 때 숙주에서 특이적으로 발현하는 유전자로 defesin, serine/threonine kinase, peroxidase, glycosidase등이 보고되었다²⁰.

한편, 자유생활아메바의 병독성은 오랜 기간의 실험실 배양에서 감소할 수 있으며 줄어든 병독성은 비강 내 감염 또는 마우스 뇌 감염 방법으로 다시 증가할 수 있다고 알려져 있다²¹. 이렇게 다시 증가하는 병독성은 독성을 지닌 분비 단백질의 생산 증가가 그 원인으로 알려져 있는데, 마우스 뇌 감염에 의해 병원성이 증가된 가시아메바에서 peroxidase와 proteinase의 활성도가 증가되었다고 보고되었다^{21,22}. 따라서 아메바의 감염 전과 감염 후의 병원성 증가 양상의 차이점을 발견하고 재차 감염시 병원성이 증가하는데 관여하는 여러 유전자가 있을 것이라는 가설 하에 본 연구를 시작하게 되었다.

위의 목적을 달성하기 위하여, 일차적으로 자유생활 아메바의 병인기작에 대한 이해를 얻어야 하고 그 과정에 관여하는 병독성 인자를 알아내야 한다. 이에 RNA를 주형으로 한 cDNA를 arbitrary primer와 oligo-dT primer로 증폭함으로써 서로 다른 조직 또는 분화단계에 따른 발현상의 차이를 인식할 수 있는 DD RT-PCR 방법을 적용하고자 한다. 따라서 본 연구에서는 가시아메바가 일으키는 원발성 아메바성 수막뇌염의 원인을 분석하기 위한 기초적인 자료로서, 우선적으로 병변과 치사의 원인이 되는 유전자를 찾아내고자 하였다.

이에 따라 마우스에 가시아메바를 재차 감염시킬 때 증가되는 마우스의 치사량을 관찰하여 병독성이 증가되는지 확인하였고 이 때 증가되는 병독성에 관계된 여러 유전자가 있을 것이라는 가설 하에 DD RT-PCR 방법을 사용하여 감염 시 증가되는 유전자를 발견하고자 하였다. 이를 통해 치사의 원인이 되는 유전자를 동정하여 원발성 아메바성 수막뇌염의 원인을 분석하고 앞으로의 진단과 치료의 연구에 기초적인 자료로 제시하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Amoeba의 배양

자유생활아메바는 미국 ATCC에서 분양 받은 가시아메바 즉, *Acanthamoeba culbertsoni*(#30171)를 사용했다. 가시아메바는 37°C 항온기 (NAPCO, Porland, OR, USA)에서 Casitone-Glucose-Vitamin(CGV) 액체배지를 사용하여 무균적으로 배양했다.

2. 가시아메바에 의한 마우스의 감염

오랜 기간 계대 배양으로 병독성이 감소된 아메바의 병독성을 회복시키기 위해 마우스를 이용해 3차례 계대 감염시켰다. 마우스는 15-20 g의 수컷 ICR 마우스를 사용하며 secobarbital로 체중당 0.06 mg씩 복강내로 주사하여 마취 시킨 후 생리식염수에 부유시킨 가시아메바의 영양형 1×10^5 개를 마우스 비강에 떨어뜨려 인위적으로 감염시켜 마취가 깰 때까지 방치했다. 감염되어 죽은 마우스의 뇌에서 아메바를 적출하여 CGV 액체배지에 무균 상태로 배양하고 배양한 지 10일 이내에 동일한 방법으로 세차례 감염시켰고 아메바를 회수했다.

3. 마우스를 이용한 병원성 검정

감염을 통해 병원성이 회복되는 정도를 파악하고 병원성이 가장 강한 상태의 아메바를 실험에 사용하기 위해서 감염의 각 단계에서 회수된 아메바의 병

원성을 마우스를 이용하여 확인했다. 각 단계별 감염은 ICR 마우스 수컷 20마리씩 사용하였고 대조군으로는 오랜 기간 실험실에서 배양하여 병원성이 감소한 아메바, 실험군으로는 가장 병원성이 강하다고 생각된 3차 감염 후의 아메바로 설정했다.

감염은 가시아메바의 영양형 1×10^5 개를 동일한 방법으로 마우스 비강에 넣었다. 이와 같이 감염시킨 마우스는 20일까지 사망여부 및 행동장애를 관찰하고 사망한 마우스는 뇌를 적출하여 아메바를 회수해 CGV 무균액체배지에 배양하고 아메바가 배양되는 지 확인하며 감염에 의한 사망률을 Kaplan-Meier 생존곡선, 생존률 방법으로 산정했다.

4. Total RNA분리

Total RNA분리는 TRIzol Reagent(Life Technology, Grand Island, NY, USA)를 사용했다 각 감염 단계의 마우스의 뇌에서 적출하여 배양한 아메바를 3000 rpm으로 20분간 원심분리시킨 후 상청액을 버리고 아메바 1×10^8 개당 TRIzol Reagent 1 ml을 넣고 혼합하여 상온에 5분간 방치한 후 chloroform 200 μ l를 첨가하여 강하게 15초간 흔들여 주어 세포가 깨져 RNA가 완전히 나올 수 있도록 했다. 2-3분간 상온에 방치 한 후 12000 rpm 15분간 원심분리하여 상청액을 취하여 0.5배의 isopropyl alcohol을 넣어 침전시키고 4°C, 12,000 rpm 10분간 원심분리하여 침전물을 75% ethanol로 씻어주고 DEPC(diethyl pyrocarbonate, Sigma, St. Louis MO, USA)로 처리한 증류수에 녹인 후 남아있는 DNA를 없애기 위해 DNase I (20 Unit)와 RNA inhibitor (200 Unit) (Message Clean, GenHunter, Nashville, TN, USA)를 처리하여 37°C 액체 항온기에 30분간 방치했다. 현재 남아 있는 protein을 제거하기 위하여 phenol과 chloroform(3:1)을 넣고 원심분리하여 상청액에 부피의

0.1배 3M sodium acetate(pH 5.2) 총 부피의 2배인 100% ethanol을 넣고 -80 °C에 1시간 이상 방치했다. 이를 4°C 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 침전물을 DEPC처리된 증류수에 녹였다. DNase가 처리된 total RNA는 260nm에서 흡광도를 측정해 정량하고 1% formaldehyde agarose gel 에서 확인했다.

5. Single stranded cDNA의 합성

위에서 얻어진 RNA를 주형으로 사용하여 one-base anchored oligo-dT primer(5'-TTTTTTTTTTTMM-3': M은 A, G 또는 C)를 사용해서 3가지 종류의 single-stranded cDNA를 제조했다 (RNAimage, GenHunter, Nashville, TN, USA). 즉, 0.5 ml 튜브 3개에 total RNA 0.2 μ g씩 첨가하고 각각의 튜브에 2 μ M의 oligo-dT₁₁A, oligo-dT₁₁G, oligo-dT₁₁C primer를 넣고 혼합했다. 여기에 각각 역전사 중합효소 완충액(25mM Tris-Cl, pH 8.4, 37.6 mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 5mM DTT)넣고 250mM dNTPs를 첨가하여 효소중합반응기에서(Thermocycler, Perkin Elmer Cetus-9600, CA, USA) 65°C 5분간 방치하여 비활성화 시키고 37°C에서 MMLV 역전사 효소 100 Unit으로 50분간 역전사 시켰다.

6. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction : PCR)

PCR은 DD RT-PCR Kit 1(RNAimage, GenHunter, Nashville, TN, USA)에 있는 8가지 종류의 arbitrary primer를 사용하여 반응시키며 PCR에서 사용하는 oligo-dT는 각 cDNA합성시 사용했던 것과 같은 종류를 배합했다.

즉, 0.5ml 튜브에 single stranded cDNA 30 pg을 넣고 250 μ l dNTPs, PCR 완충액 200nM의 arbitrary primer(GenHunter, Nashville, TN, USA) 및

cDNA를 합성했을 때와 동일한 one-base anchored oligo-dT primer를 각각 200 nM씩 첨가한 후 ^{32}P dATP(2000 Ci/mmmole)을 $0.2\mu\text{l}$, Taq DNA Polymerase(1.5 Unit) (Solgent, Taejon, KOREA)을 넣고 증류수로 총 $20\mu\text{l}$ 가 되도록 했다. 이를 효소중합반응기기를 이용하여 94°C 에서 30초간 변성, 42°C 에서 2분간 결합, 72°C 에서 30초간 합성하는 반복과정을 40회 실시하여 PCR을 수행하였다. 반응 후 시료는 4°C 에 보관 후 95°C 1분간 변성시킨 후 5% polyacrylamide gel 상에서 전기영동하여 분석하였다.

7. 전기영동(polyacrylamide gel electrophoresis)을 통한 증폭 산물의 분석

중합효소연쇄반응을 통해 증폭된 DNA는 7M urea가 포함된 5% polyacrylamide gel상에서 전기영동하여 X-ray film에 감광하여 관찰함으로써 아메바의 감염 전과 1차, 2차, 그리고 3차 감염시 증폭된 DNA 분획상을 비교하는 differential display를 수행했다. 전개 환경은 $10\times\text{TBE}$ 완충액(1 M Tris, 0.83 M boric acid, 10mM EDTA)와 증류수에 polyacrylamide : bisacrylamide(38 : 2)를 녹여 5% acrylamide gel(7 M Urea 포함)을 만들고 시료에 $6\times$ 시료완충액 (0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 15% ficoll)를 첨가하고 95°C 1분간 방치한 후 200 volt 로 3시간 동안 전기영동 했다. 전기영동을 위한 전개 완충액은 음전하 쪽(위쪽)에는 $1\times\text{TBE}$ 양전하(아래쪽) 쪽에는 $0.5\times\text{TBE}$ 완충액을 사용해 전개 중 완충액의 농도 구배가 gel상에서 존재하도록 만들었고 양전하 (아래쪽)에 3 M sodium acetate 용액을 0.5% TBE의 0.5배 넣고 전기영동을 하여 작은 크기의 증폭산물들이 gel 밖으로 빠져나가는 것을 막았다. 전기영동이 끝난 gel은 gel dryer(Drygel Sr. Model SE160, Hoefer, San Francisco, CA, USA)로 gel을 말린 후 X-ray film에 감

광시켜 -70°C 에 보관 후 현상하여 증폭 산물의 분획 양상을 관찰하였다. DD RT-PCR 증폭산물의 관찰을 통해서 비 감염군과 1, 2, 3차의 감염군의 분획 양상을 분석하고 감염군에서만 증폭되거나 감염군에서 증가되는 DNA만을 선별하였다.

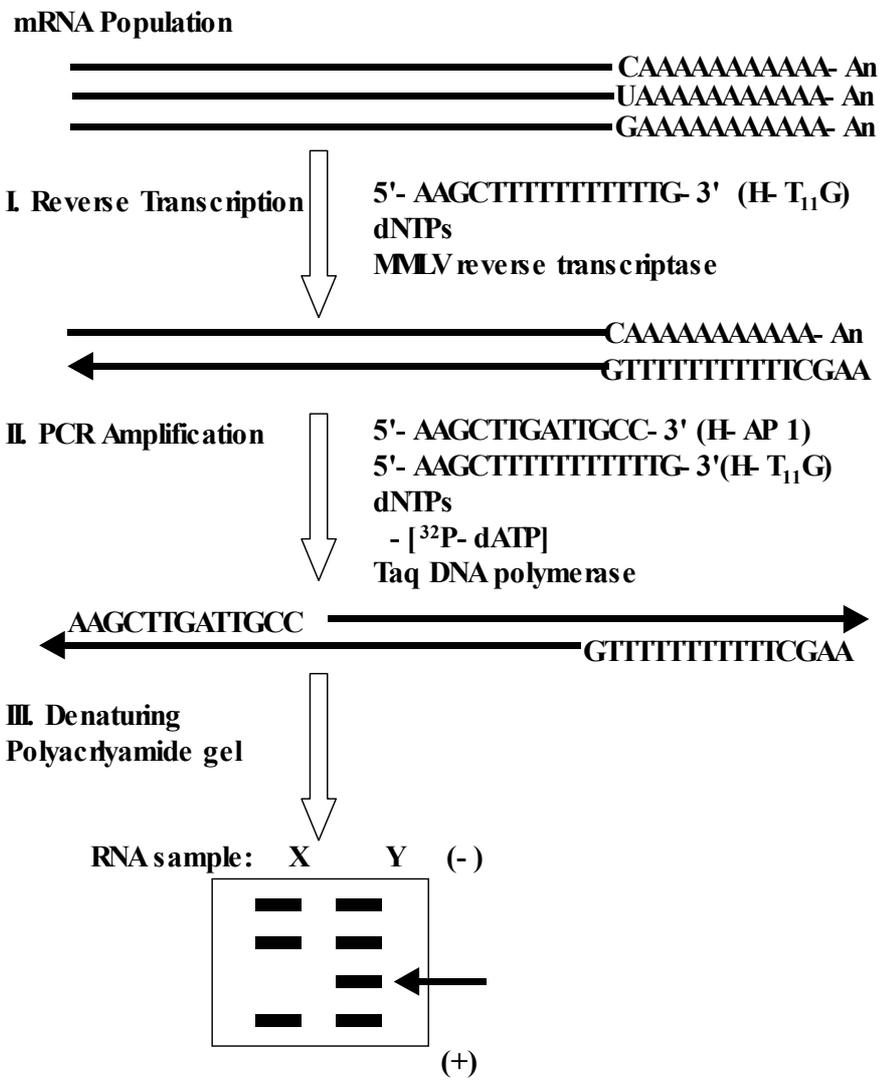


Fig. 1. Schematic diagram of DD RT-PCR

8. 감염 균에서 증가하는 증폭산물의 재증폭

선별된 DNA는 gel 상에서 멸균된 면도칼로 잘라내어 100 μ l dH₂O에 10분 동안 담근 후 끓는 물에서 15분간 gel에서 DNA 용출시켰다. 이를 15,000 rpm에서 1분간 원심분리하여 상층액을 취해 3 M sodium acetate 5 μ l와 glycogen 2 μ g, 그리고 450 μ l 100% ethanol을 넣고 -80 $^{\circ}$ C에 24시간 이상 보관했다. 다음 15,000 rpm 10분간 4 $^{\circ}$ C 원심분리하여 침사를 85% ethanol로 씻어내고 증류수로 녹여 이를 재증폭 DNA로 사용하였다.

재증폭 PCR은 0.5 ml 튜브에 gel상에서 분리된 cDNA를 4 μ l 넣고 10 \times PCR 완충액 4 μ l와 dNTP 20 μ M을 첨가하며 본 시료 분획을 증폭시켰을 때 사용했던 arbitrary primer와 oligo-dT를 각각 0.2 μ l씩, Taq DNA polymerase 1Unit을 넣고 94 $^{\circ}$ C에서 1분간 변성시키고 40 $^{\circ}$ C에서 2분간 결합, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 합성하는 반복과정을 40회 실시하였다. 이렇게 재 증폭된 DNA 분획은 1% agarose gel에 전개 시켜 EtBr 0.2 μ g/ml로 염색하여 UV에서 DNA의 크기를 확인하였다.

이렇게 재 증폭된 DNA는 cloning하여 Northern hybridization의 probe로 사용하고 sequencing하여 유전자 정보를 알아내는데 사용하였다.

9. 증폭산물의 Cloning

1.0% agarose gel에서 확인한, 재 증폭된 DNA 조각은 agarose gel에서 잘라낸 다음 agarose gel에서 DNA 정제해 냈다(UltraCleanTM15, CA, MOBIO, Solana Beach, CA, USA). DNA 정제 방법은 Ultra salt (Sodium iodide solution)을 gel 부피의 3배(600 μ l) 첨가하고 결합수지(Ultra bind resin)를 5 μ l 넣어 30초 동안 vortex를 하고 55 $^{\circ}$ C에서 5분간 gel을 녹이고 12,000rpm에서 1

분간 원심분리하여 상층액을 제거했다. 침전물을 Ultra wash solution(NaCl/Tris/EDTA) 0.5ml을 넣고 vortex를 30초간하고 다시 12000rpm 원심분리하여 상층액을 제거한 후 공기 중에 말리고 증류수 20 μ l 넣어 녹였다. 이를 12000rpm으로 원심분리하여 상층액을 취했다. 정제된 DNA 3 μ l와 10 \times ligation buffer , T4 ligase 1unit, pGEM[®]-T easy vector(Promega, Medison, WI, USA) 50 ng을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 하루밤 동안 ligation 하였다. Ligation한 vector 5 μ l는 DH5a(*E. coli* strain) 100 μ l에 넣고 얼음에 30분간 보관하였다가 42 $^{\circ}$ C에서 1분30초간 열 충격을 주고 얼음에 1분간 보관한 다음 LB 액체배지를 100 μ l 첨가하고 37 $^{\circ}$ C 수욕조에서 1시간 동안 배양하여 형질전환하였다. 형질전환된 클론은 LB 액체배지에 심고 37 $^{\circ}$ C 하루 밤 동안 배양했고 Qiagen plasmid mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 plasmid를 뽑고, EcoR I 효소로 37 $^{\circ}$ C 2시간 동안 처리하여 1% agarose gel에서 분리된 DNA를 확인하였다.

10. Northern blot 분석

오랜 기간 배양하여 병원성이 감소한 아메바와 1, 2, 3차 감염을 하여 수거한 아메바의 total RNA 10 μ g을 1% formaldehyde agarose gel에서 전기 영동하여 분리하고 nylon membrane으로 이적하여 앞에서 선별하고 cloning한 DNA를 probe로 사용하여 hybridization을 수행하였다.

1% formaldehyde agarose은 1g agarose를 증류수 83.123ml에 녹이고 60 $^{\circ}$ C로 온도를 낮춘 후 10ml의 10 \times MOPS 완충액(3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)와 36% formaldehyde 6.875ml을 넣어 만들었다. RNA시료 준비는 10 μ g RNA와 10 \times MOPS 2 μ l, 36% formaldehyde 3.5 μ l, formamide 10 μ l, 그리고 총 20 μ l가 되도록 DEPC처리된 증류를 첨가했다. 이를 55 $^{\circ}$ C에서

10분간 변성시켜 2 μ l RNA loading 완충액(50% glycerol, 1 mM EDTA, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol FF)과 혼합시켜 1% formaldehyde agarose gel 1×MOPS 완충액으로 전개시켰다. 전개된 RNA는 Capillary elution 방법으로 하루 밤 동안 nylon membrane에 이적하고 2×SSPE(20×SSPE : 175g NaCl, 27.6g NaH₂PO₄, 7.4g EDTA, 6.5ml 10N NaOH)로 씻어낸 후 hybridization 반응을 수행하기 위해서 blot을 UV cross linking하고 RNA를 blot에 고정시킨 후 prehybridization 용액(5×SSPE, 5×Denhart's, 0.5% SDS, 50% formamide, salmon sperm DNA(200 μ g/ml))으로 42°C에서 2시간 동안 prehybridization시켰다. Probe 준비는 앞서 cloning하여 EcoR I으로 분리한 cDNA 조각을 agarose gel에서 정제하여(MOBIO, Solana Beach, CA, USA) 그 중 100 ng을 취하고 여기에 Random primer(9mer, Takara) 50 pmol을 첨가하여, 총 14 μ l로 증류수를 넣고 95°C에서 3분 동안 열 변성시키고 즉시 얼음 위에 올려놓고 2.5 μ l 10× reaction buffer(Takara, otsu, Shiga, Japan), dNTP 각 0.2 mM, 0.2 mM ³²P-dATP 그리고 Klenow fragmen 0.1 unit를 넣고 37°C 15분간 반응시킨 후 65°C에서 5분간 반응을 중지시켜 ³²P로 Labeling하였다. Hybridization을 위해서 10ml의 Hybridization 용액(5×SSPE, 5×Denhart's, 0.5% SDS, 50% formamide, salmon sperm DNA(200 μ g/ml), 10% dextran sulfate)에 ³²P로 labeling된 probe를 넣고 42°C에서 16시간 반응시켰다. Blot을 실온에서 200ml의 세척액1(2×SSPE, 0.1% SDS)로 15분씩 2차례 씻어내고, 60°C에서 세척액2(0.1×SSPE, 0.5% SDS)로 30분간 두 차례 씻어냈다. Hybridization된 blot을 부분 건조시킨 후 plastic bag에 밀봉하고 Kodak BIOMAX MR X-ray film상에 감광시켰다. X-ray film을 현상하여 감염 횟수가 늘어남에 따라 선택된 유전자가 실제 전사단계의 mRNA상에서의 발현도 증가하는지 재 확인했다. 또한 blot을 phosphoimager(Image Reader BAS-2500, FUJIFILM, Tokyo, Japan)와 TINA

2.10 program을 이용해 감염횟수에 따라 수치적으로 얼마나 증가했는지 계산하였다.

한편, 먼저 선별된 clone들이 감염 군 단계에서 증가하는 것을 확인하기에 앞서 대조군과 감염 군(1차, 2차, 그리고 3차 감염)의 RNA들이 같은 양으로 전개되었는지 확인하기 위해 대조실험을 실시하였다. 즉, Genbank상에 보고된 *A. culbertsoni*의 유전자 중 18S ribosomal protein gene의 염기서열을 확인하고 이 염기서열에 특이한 primer를 작성해(rRF, rRR)(Fig. 2), PCR을 실시하고 증폭된 산물을 pGEM[®]-T easy vector(Promega, Madison, WI, USA)에 cloning하여 control probe로 사용하였다.

11. DNA 염기서열 분석

DNA 염기서열 분석은 앞에서 cloning한 clone들의 DNA plasmid를 분리하여(Qiagen, Hilden, Germany) T7, SP6 primer를 이용해 Automatic DNA sequencer로 염기서열을 결정했다.

12. DD RT-PCR에서 선별된 clone의 정보 검색

DD RT-PCR에서 선별된 clone들의 염기서열 정보를 NCBI Genbank에서 병원성이 증가함에 따라 발현이 증가하는 유전자들이 어떠한 것들인지 BLASTX를 사용하여 정보를 검색하였다.

III. 결 과

1. 가시아메바의 마우스 감염에 의한 병원성 증가

오랜 기간 동안 실험실에서 계대 배양해 온 아메바를 각각 20마리씩 ICR 마우스 수컷을 이용하여 병원성 검정실험을 실시했다. Fig. 2에 보이는 것과 같이 계대배양해온 아메바 1×10^5 개씩을 직접 마우스에 감염시켰을 때 감염 후 16일까지 20마리의 마우스 중 한 마리도 사망하지 않았고 16일 이후 1마리가 사망하였다. 감염 후 17일째 죽은 마우스의 뇌와 죽지 않은 마우스의 뇌를 적출하여 CGV 배지에 배양해 본 결과 죽은 마우스의 뇌에서는 아메바가 회수되었고 마우스의 뇌에서는 아메바가 자라지 않았다.

한편, 1차 감염을 거친 아메바를 사용하여 2차 감염 시켰을 때는 20마리의

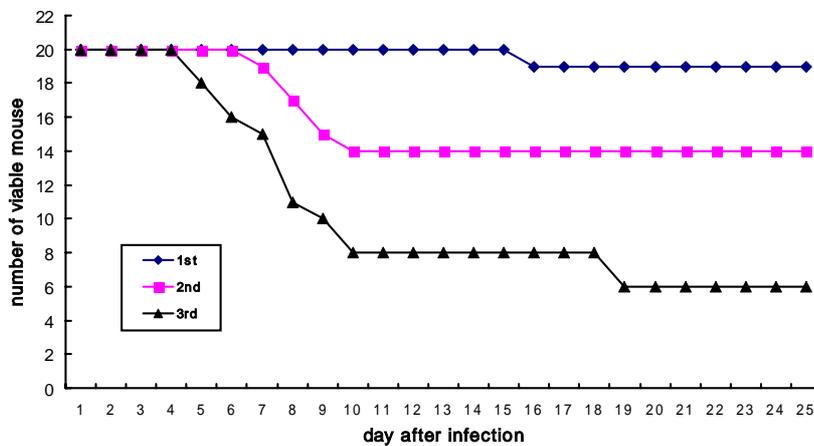


Fig. 2 Survival rate of mice infected with *A. culbertsoni*. 1st(first infection), 2nd(second infection), 3rd(third infection). The survival rate was tested by Kaplan-Meier method. $P < 0.05$

마우스 중 6마리가 7일째부터 11일째 되는 사이에 사망하는 것을 관찰 할 수 있었고 11일 이후에는 더 이상 사망하는 마우스가 없었으므로 2차 감염 시 30%의 사망률을 나타내었다(Fig. 2). 2차 감염 시 사망하거나 감염 후 25일까지 생존한 총 20마리 마우스의 뇌를 적출하여 배양해 본 결과 사망한 6마리의 마우스에서만 아메바가 배양되었다. 2차 감염을 거친 아메바를 이용해서 3차 감염을 시킨 결과 감염 후 4일부터 10일 사이에 10 - 80%의 사망률을 관찰할 수 있었고 18일째 2마리가 또 사망하였다. 그리고 마우스가 사망하는 시간도 1차 감염 시에는 17일째 1마리가 사망, 2차 감염 시에는 7일째부터, 3차 감염 시에는 4일째부터 사망하는 것으로 보아 사망률이 증가할 뿐 아니라 사망하는 시간도 빨라졌다.

2. Total RNA의 분리

오랫동안 실험실에서 배양한 아메바와 1차, 2차 그리고 3차 마우스에 각 단계별로 감염시켜 뇌에서 적출한 아메바에서 DD RT-PCR을 위한 cDNA합성과 Northern blot 분석을 위한 RNA는 5×10^8 개 아메바를 모아 TRIZOL로 분리했다. 분리한 결과 OD₂₆₀에서 흡광도를 측정해 정량한 RNA량은 대조군 392.2 μ g, 1차 감염시킨 아메바 547.2 μ g, 2차 감염시킨 아메바는 396 μ g, 그리고 3차 감염시킨 아메바는 348 μ g이었다. 이렇게 분리된 대조 군과 각 감염단계별 RNA는 DDRT-PCR을 위한 cDNA합성에 각 200ng씩 사용되었고, Northern blot 분석에 각각 10 μ g씩 사용되었다.

3. DD RT-PCR 증폭산물의 분석

중합효소연쇄반응 증폭산물을 5% polyacrylamide gel상에서 전기 영동하여 분

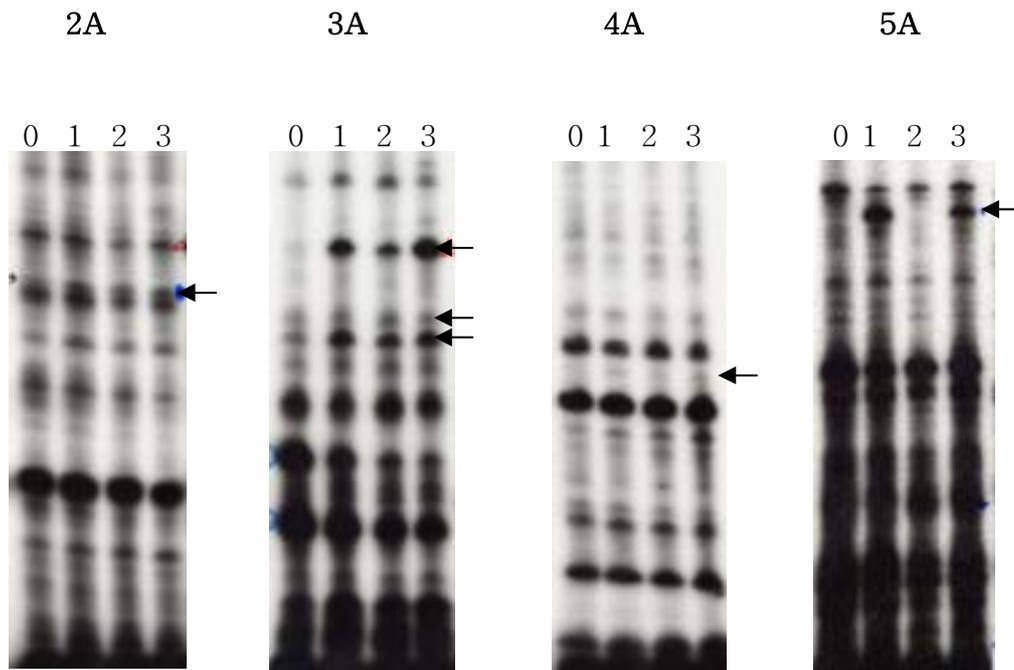


Fig.3. Differential display using adenine-base anchored-oligo-dT primers. 0(non infected), 1st(first infected), 2nd(second infected) and 3rd (third infected) lane were compared by differential display using primer dT₁₁A primer in combinations with 8 arbitrary primers. PCR was carried out with single-strand cDNA from *A.culbertsoni* total RNA of non-infected(0) and infected(1st, 2nd, and 3rd) mouse. The number on lane indicates an arbitrary primer using differential display and arrows by 3rd lane reveal the band of specific for infection. Increased specific band for infection described (a) 2A, (b) 3A-1, 3A-2, 3A-3, (c) 4A, (d)5A.

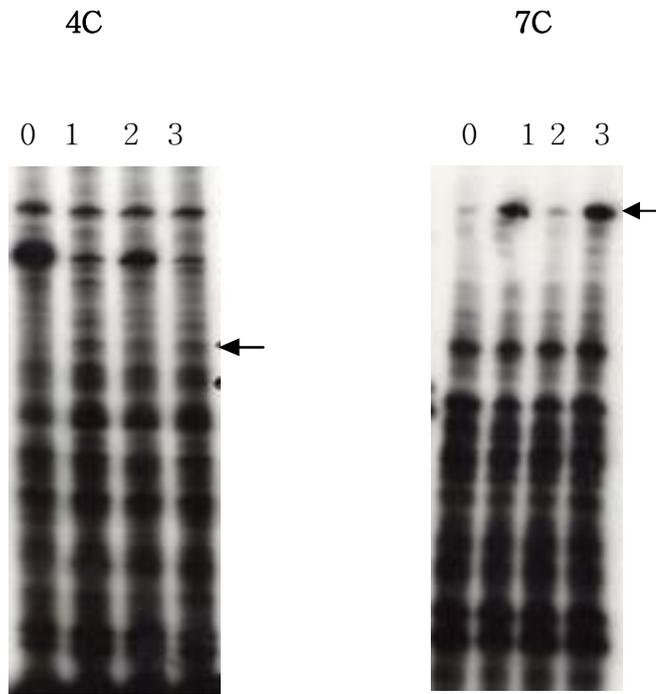


Fig. 4. Differential display using cytosine-base anchored-oligo-dT primers. 0(non-infected), 1st(first infected), 2nd(second infected) and 3rd(third infected) lanes were compared by differential display using primer dT₁₁C primer in strand cDNA combinations with 8 arbitrary primer. PCR was carried out with single-strand cDNA from *A. culbertsoni* total RNA of non-infected(0) and infected(1st, 2nd and 3rd)mouse. The numbers reveal the used an arbitrary primer and arrows indicate the bands specific for infection. .Increased specific band for infection described (a)4C, (b)7C.

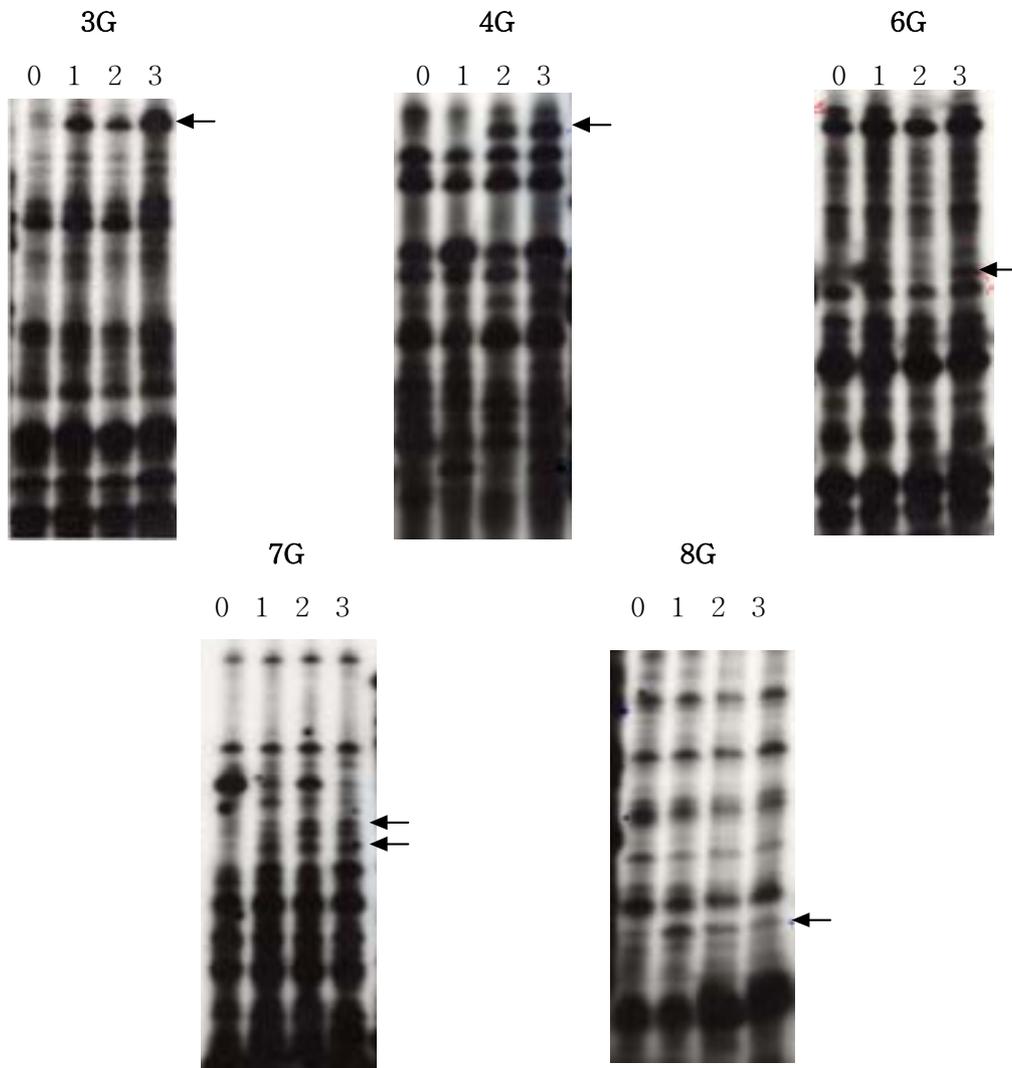


Fig. 5. Differential display using guanine-base anchored-oligo-dT primers. 0 (non-infected), 1st (first infected), 2nd (second infected) and 3rd(third infected) lanes were compared by differential display using primer dT₁₁G primer in combinations with 8 arbitrary primers. PCR was carried out with the same method as PCR single-strand cDNA from *A. culbertsoni* total RNA of non-infected (0) and infected (1st, 2nd, and 3rd) mouse. The numbers reveal an arbitrary primer used and arrows indicate the bands specific for infection. Increased specific band for infection described (a) 3G (b)4G .

획 양상을 비교한 결과 3가지 one base-anchord oligo-dT primer와 8개의 arbitrary primer를 사용한 증합효소연쇄반응을 통해 감염군과 대조군간의 증폭 산물의 변이를 관찰할 수 있었다. 대조군과 감염군(1차, 2차 3차 감염)의 증폭산물 분획 양상은 대부분 비슷했으며 그 중 oligo-dT₁₁A와 조합하여 사용한 8개의 arbitrary primer 중에서 arbitrary primer number 2와의 조합을 통해 증합효소연쇄반응을 수행한 증폭산물 분획 양상의 분석을 통해 1개 (이하 2A라 서술함)의 DNA가 감염 군에서 증폭이 증가하는 것으로 관찰되었다. 이러한 양상이 관찰된 DNA는 arbitrary primer number 3에서 3개 (3A-1, 3A-2, 3A-3), arbitrary primer number 4에서 1개(4A), arbitrary primer number 5에서 1개(5A)로 oligo-dT₁₁A와 조합하여 사용한 8개의 arbitray primer와의 반응에서 감염 군에서 증가하는 DNA는 모두 6개로 관찰되었다 (Fig. 3). 또 oligo-dT₁₁C primer를 사용한 경우 arbitrary primer number 4와의 조합에서 1개(4C), arbitrary primer number 7와의 조합에서 1개(7C)에서 각각 감염 군에서만 증폭된 분획을 확인할 수 있었다. 그 외 arbitrary primer number 1, 2, 3, 5, 6, 8과의 조합에서는 대조 군과 감염 군과의 DNA분획 양상의 차이를 관찰 할 수 없었다(Fig. 4).

그리고 oligo-dT₁₁C primer를 사용한 경우에는 arbitrary primer number 3과의 조합에서 1개(3G), arbitrary primer number 4와의 조합에서 2개(4G-1, 4G-2), arbitrary primer number 6과의 조합에서 1개(6G), arbitrary primer number 7과의 조합에서 2개(7G-1, 7G-2), 그리고 arbitrary primer number 8과의 조합에서 1개 (8G)로 oligo-dT₁₁C와 조합하여 사용한 8개의 arbitrary primer와의 반응에서 감염 군에서 증가하는 DNA는 모두 7개로 관찰되었다 (Fig. 5). 이러한 증합효소 연쇄반응은 두 번에 걸쳐 실시함으로써 실험의 정확도를 확인하였다.

4. 감염균에서 증가하는 DNA 분획의 재 증폭

각각의 oligo-dTM(A, C, G)와 8개의 arbitrary primer와 조합으로 중합효소연쇄반응 결과 감염 균에서 증가하는 DNA의 분획을 총 15개 선택하여 이를 gel상에서 잘라내어 재 증폭하기 위해 gel에서 DNA를 추출해 냈다. 추출한 DNA를 앞서 증폭한 조합과 같은 oligo-dT와 arbitrary primer조합으로 PCR

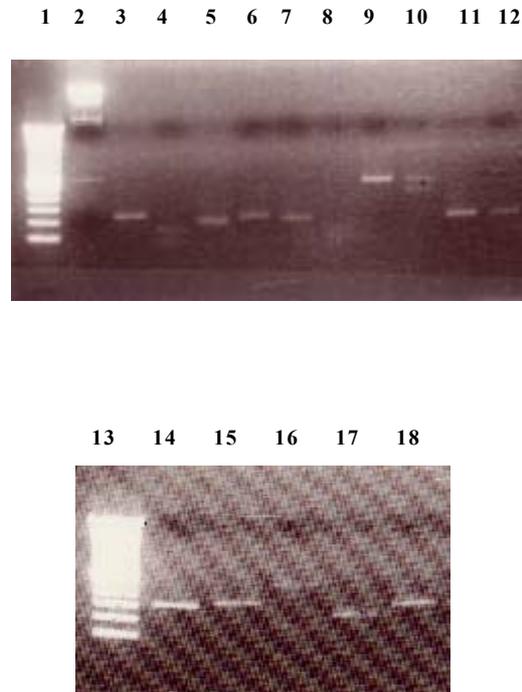


Fig. 6. Re-amplification of clones selected by DD RT-PCR. (1) 100 bp ladder, (2) 1kb ladder, (3) 2A, (4) 6A not amplified, (5) 3A-2, (6) 3A-3, (7) 4A, (8) 5A, (9) 7C, (10) 3G, (11) 4G-1, (12) 4G-2, (13) 100bp ladder, (14) 6G, (15) 3A-1, (16) 7G-1, (17) 7G-2, (18) 8G.

을 다시 수행하였고 재 증폭된 DNA 조각의 크기도 함께 확인하였다. Oligo-dT₁₁A의 2A, 3A-1, 3A-2, 3A-3 그리고 4A는 250에서 500bp정도의 크기로 재 증폭 되었으며 5A는 재 증폭에 실패하였다(Fig. 6, lane8). 한편, oligo-dT₁₁C의 4C와 7C의 재 증폭 결과는 4C는 재 증폭되지 않았으며 7C는 600bp크기로 재 증폭되었다(Fig. 6, lane9). 또한 oligo-dT₁₁G의 3G, 4G-1, 4G-2, 6G, 7G-1, 7G-2, 그리고 8G는 150bp에서 700bp까지 다양하게 재 증폭 되었다(Fig. 6).

따라서 DD RT-PCR을 통해 감염 군에서 증가되어 선택한 14개의 DNA 분획 중 13개가 재 증폭에 성공하였으며 그 크기는 150bp에서 700bp까지 다양하였다.

5. Northern blot 분석에 의한 감염군에서의 발현 증가 재 확인

DD RT-PCR을 통해 감염군에서 증가된 DNA 분획 13개를 pGEM[®]-T easy vector에 cloning하여 probe로 사용하여 Northern blot 분석을 통해 실제로 각 감염단계별 mRNA상에서 선택된 DNA들의 발현이 증가하는지 확인하고자 하였다.

먼저 대조 군과 감염 군(1차, 2차, 그리고 3차 감염)의 RNA들이 같은 양으로 전개되었는지 확인하기 위해 18S ribosomal protein gene으로 Northern blot 분석을 해 본 결과 각 대조 군과 감염 군이 거의 같은 양의 RNA가 전개 되었음을 알 수 있었다(Fig. 7a). 각 선택된 DNA들을 Northern blot으로 확인한 결과, 2A는 큰 차이는 볼 수 없었으나 감염 횟수가 증가할수록 조금씩 발현이 증가하였고 대조 군에서도 발현이 되는 것으로 보이며 phosphoimager로 확인한 결과 2배정도의 차이를 나타내었다(Fig. 7b). 3A-1은 대조 군에서는 전혀 발현이 되지 않고 1차 감염시에 발현이 20배 이상 발현이 크게 증가

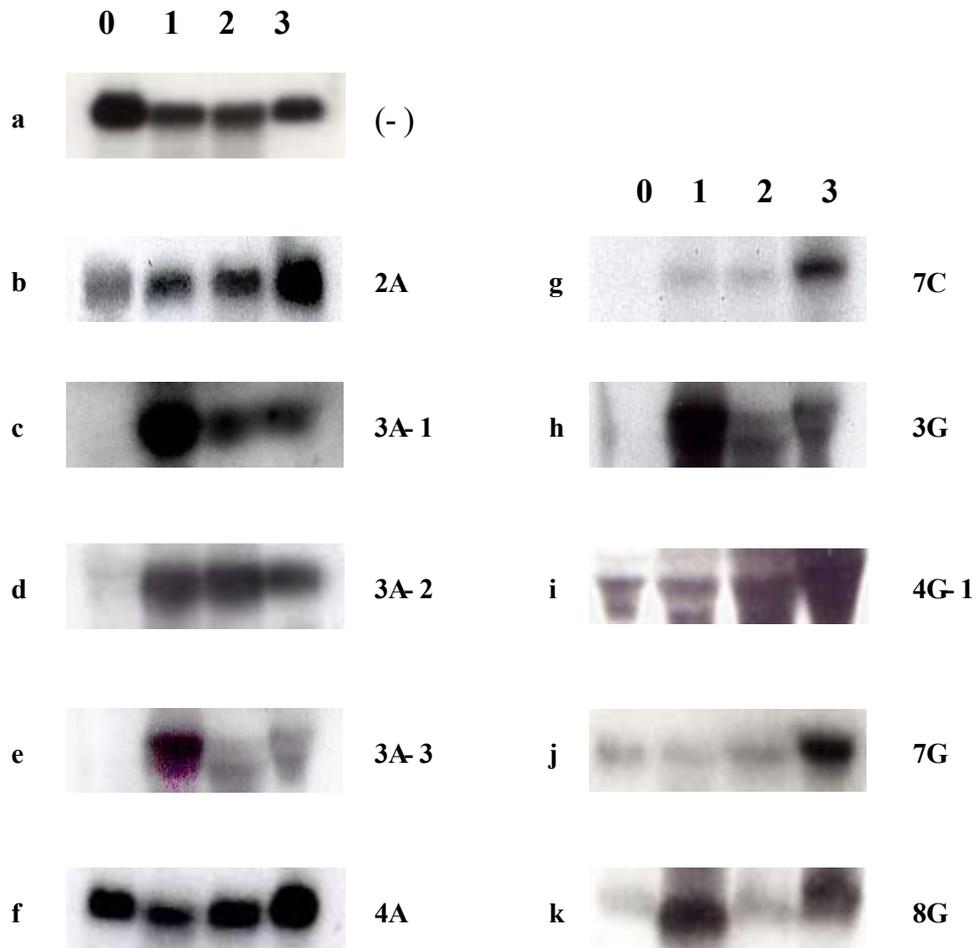


Fig 7. Northern blot analysis of *A. culbertsoni* RNA obtained from the non-infected(0) and infected(1 : 1st infection, 2 : 2nd infection, 3 : 3rd infection) in mice. (-): negative control

했으며 2차, 3차 감염 시에는 대조군에 비해서는 10배정도 증가했으나 1차 감염 때 보다는 조금씩 감소하는 경향을 보였다(Fig. 8c). 3A-3은 3A-1과 거의 같은 결과가 나타났고(Fig. 7e), 3A-2는 3A-1과 거의 비슷하나, 대조 군에서 약간의 발현을 관찰할 수 있었다(Fig. 7d). 5A와 4C는 Northern blot상에 반응을 찾아 볼 수 없었으며 4A는 대조 군과 감염 군과의 발현 양상의 차이를 찾을 수가 없었다(Fig. 7f).

한편, 7C는 대조 군에서 1차, 2차, 3차 감염으로 갈수록 점점 발현이 증가하는 모습을 보였고 phosphoimager결과 3차 감염 시 대조 군에 비해 10배정도 차이를 나타내었다(Fig. 7g). 3G는 앞의 3A-1과 비슷한 결과가 나왔는데 대조 군에서는 발현을 하지 않고 1차 감염 시 크게 증가했다가(20배 이상) 2차, 3차로 갈수록 조금씩 감소하는 경향을 보였다(Fig 7h). 4G-1은 큰 차이를 보이지 못했으나 각 감염 군들은 대조 군에 비해 1.5배정도 증가하는 결과를 나타내었으며(Fig. 7i), 4G-2는 대조 군 감염군의 차이를 찾아 볼 수 없었다. 한편, 6G는 Northern blot에 반응하지 않았고, 7G-1는 대조 군에 비해 감염 군이 3배정도 차이가 났으며(Fig. 8j), 7G-2는 2배정도 차이를 보였다. 마지막으로 8G는 대조 군에서 미약하게 발현되었으며 대조 군에 비해 감염 군이 3배정도 증가했다(Fig. 8k).

6. 가시아메바에 의해서만 증폭된 DNA의 고유성 확인

앞에서 선별된 DNA clone이 다른 DNA로 오염되지 않고 가시아메바로 부터 나온 유전자임을 증명하기위해 선별된 clone 중 DNA 염기서열에 특이한 primer를 작성하여 가시아메바와 다른 종의 genomic DNA를 주형으로 하여 PCR을 수행해 가시아메바의 genomic DNA에서만 증폭산물이 나오는지 확인하였다. 다른 종의 genomic DNA는 마우스의 뇌와 *E. coli*, *E. histolytica*

그리고 *T. vaginalis*를 사용하였다. PCR 결과는 *A. culbertsoni*에서만 400bp의 증폭산물이 나왔다(Fig. 8).

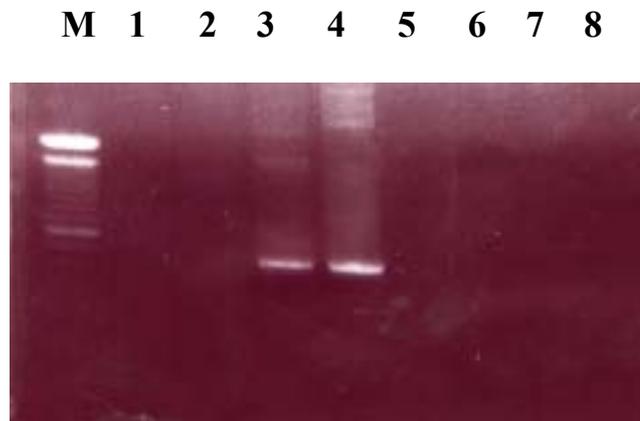


Fig. 8. DNA polymerase chain reaction of 3G for confirm it that origin from *A. culbertsoni*. M . 100bp ladder, 1. *A.culbertsoni* genomic DNA, only forward primer reaction ; 2. *A.culbertsoni* genomic DNA, only reverse primer reaction ; 3. *A.culbertsoni* genomic DNA, forward primer plus reverse primer reaction ; 4. 3G DNA, forward primer plus reverse primer reaction ; 5. Mouse genomic DNA ; 6. *E. coli* genomic DNA; 7. *E. histolytica* genomic DNA; 8. *T. vaginalis* genomic DNA

7. DD RT-PCR에서 선별된 clone의 유전자 동정

DD RT-PCR에서 감염 군에서 증가하는 15개의 clone중 Northern blot 분석에서 대조 군과 감염 군과의 차이를 나타낸 10개 clone을 다시 선별하여 plasmid를 뽑아 내어 automatic sequencer로 DNA 염기서열을 결정하였다.

DNA염기서열을 결정하여 BlastX로 다른 염기서열과의 정보를 비교 검색한 결과 먼저 3A-1와 3A-2 3A-3, 3G, 4G-1는 유사성이 높은 알려진 유전자를 찾을 수 없었다.

한편, 2A는 p47, tumor suppressor protein과 유사한 결과가 나왔으며, e-value는 2e-09로 높은 유사성을 보였다. 7C는 *Acanthamoeba castellanii*에서 발견한 dehydrogenase와 유사한 염기서열로 나타났고 7G-1는 proteasomal ATPase, 7G-2는 ATP(GTP)-binding protein fet5 mRNA로 두 유전자 모두 높은 유사성을 보였으며, 8G는 GDP-manose pyrophosphorylase B(GMPPB) mRNA와 유사한 결과가 나왔으며 e-value는 4.1로 매우 낮았다(Table 1).

Table 1. Identification of clones selected by DD RT - PCR

| clone | sequence | Northern blot | Possibility | E-value |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------------------------------------|---------|
| 2A | TTAAGCTTCGACTGTCGGGTGGAGTGGTCCACTTCGAGTGGC TCGGTCTCTCGCCGCCAAAGGGTAAATGGTATTGCAACGA ATGCACGTCTCGGTAAAAAGCAGGGGCTGATGAAAAATAA ATTAAAAATGGAGGAAAAAGGAAAGGAAATGTACC AACACAA CCCCAATCGTATAAATCATGCGGATTAGCAAAAAATTATTTGC TCGTAAAAAATAA | 2 | P47 tumor suppressor protein | 2e-09 |
| 3A-1 | GATTAAAGCTTTGGTCAGGGCAAAGAAATATGAGAGGGGATTG GCTCCCTTATTAAGTAATACTACTACAATTAAATTAACAC AAAGTATGCCATTCCATAAAAACTTAGCTAAAATAAGGGCAAT ACTAATTCACCCAGCCAAAAAATTCCTTTAATAATTATGGCAA ATCCCAATGTTTCATAAAAAATAGGCCCTAAAGCAGCAATCTT ATAACAATATGCAAAATGTAATTTAACCTTCACGTGATCTTCA AAAGAGGACCACAAGTCTTTG | 25 | Novel gene | |
| 3A-2 | GATTAAAGCTTTGGTCAGGGCAAAGAAATATGAGAGGGGATTG GCTCCCTTATTAAGTAATACTACTACAATTAAATTAACAC AAAGTATGCCATTCCATAAAAACTTAGCTAAAATAAGGGCAAT ACTAATTCACCCAGCCAAAAAATTCCTTTAATAATTATGGCAA ATCCCAATGTTTCATAAAAAATAGGCCCTAAAGCAGCAATCTT ATAACAATATGCAAAATGTAATTTAACCTTCACGTGATCTTCA AAAGAGGACCACAAGTCTTTG | 10 | Novel gene | |
| 3A-3 | ACTAGTGATTAAAGCTTGCACCAATGGACATATCAACCCAGTTA CTCCTTCCACACACCCAGTGTGGATCCATTGCCATAGGCTAC GAAACCTTCCTCTCATCGTGAACCACTCTATAATCCAAACAT GTTAACCTTCCTCTCATCGTGAACCACTCTATAATCCAAACAT AGAAAAACAGATGGAGTTGGTCTTCAAGAGAATGACATAAGC CTTCTATTCGCAATTCCTTGTGTAACCTTCAAGGTTGGCG TGGTCCGGGGATAGGCATGTTTATGAGAAGAATGTTGGTCT TGCACGCTTCCAAAAAATAAATCTTAAATC | 15 | Novel gene | |
| 7C | TTAAGCTTAAAGAGTACTTATTTGGTATAAATTATTATAAATAT AAAGCTTAAAGAGGCTTCGAGAAATATAAAAAATGCTCG TCACAAAGGATTTGATAGCCCTTTGTAATGAGCAGCAGT TTTTTTTATTTTTCATAGCTATGTTAGCTGAACTAATAGACA CCCTTTTGTATTTAGCAGAGGCAGAAATCGGAGTTAGTTCTGGG TACAATGTTGAAACACAGTAGTGTCTATTTGCTCTTTTCTTTT TGCTGAGTATGCTAACAATATATTTGTTATGCCATGTTGCTAC TATTTATTTTAGGTGGATGAGCAGTCCGGGATTTTATTTT TTTATTAAGTAAACAGAAATGATATTTGGCGATGAGCT ATTTTITGACAGCTTAAAGACAGCTTTTATGATTTGACTTG GCTTTATCATCAGCTTTTATATAAATAAGGTGTTAGCTTAC TTATTTGCTTCAATTTGGTAAAGACTACTTTGCCCTGTTAAG CTTAATCACTAGT | 10 | NADH dehydrogenase - <i>Acanthamoeba castellanii</i> | 1e-37 |
| 3G | GATTAAAGCTTTGGTCAGGGCAAAGAAATATGAGAGGGGATTG GCTCCCTTATTAAGTAATACTACTACAATTAAATTAACAC AAAGTATGCCATTCCATAAAAACTTAGCTAAAATAAGGGCAAT ACTAATTCACCCAGCCAAAAAATTCCTTTAATAATTATGGCAA ATCCCAATGTTTCATAAAAAATAGGCCCTAAAGCAGCAATCTT ATAACAATATGCAAAATGTAATTTAACCTTCACGTGATCTTCA AAAGAGGACCACAAGTCTTTGTTTATTTGATATCTGTCCAAAT TTATTTATTTAGAGTTTATATAATTAGCAGCTAGAAATCAGA AGGTTGTTTCTACAGATTAATGATAAGGGTGGGATAA TTAAGCTTAAAGAGTAAAGAGAAATGATGATGATGATGATG GTTCAAAAACCCACCCAGCGCGCCACCGAGTATAAACACAC CCGAAAGTGTATGTCAGAAACTTAACGAAAAAACGACCAA AAAAAATAA | 25 | Novel gene | |
| 4G-1 | GATTAAAGCTTCTCAAGTACTGACTTCACTTGATTGATTTCT GAATATCGGGGAGACCGTGTCTTTGGTATTCCGTAAACG GTCATTAAGCTAACAAAAAGAAATGATGATGATGATGATG AAAGAGTTAGAGGTTCCAGCAGCTGTAAAGTACAGATTTGAAA ATACCTAACAAATGCAACAGAAATGCTGTAACAAAAAATAA AGCTTAATCACTAGT | 1.5 | Novel gene | |
| 7G-1 | CCGCGGATTCGATTAAAGCTTAAAGGTTACAGAGGACGATG CTGGAGCTCATCAATAGCTCGACGTTTCGACCTCGCGTA ACATCAAGTCTCATCGCCAGAAACAGACCCAGACTCTGTA TCGGCCCTCACACGGCTGGCGTCTGGACAGGAAGTCGAA GTGGACCTCCGATCTCGAGGGAAGCGCCAGATCTCAAGA TTCACACCAAGTCGATGTCAGTTGAAAGGATATCCGATTGGA GTGTTGGCCGCTTTTGGCCCTAACCCACCGGCGCTGACATC CGCTCTGTGTGACGGAGGCGGGCATGTTTGGCTCAGGAGA GAAGAAAGCCGTCACAGAAAAAGACTTCCCTGGAATGATCAA CAAGGTCACTCAAGGCTTAGCCAGCTTCACAGCTACCTCAAG TACATGTTCTTAGAGCTTAGCCACTCTGACAGTACCTTCCAG ACAGTAAATATCTTTTGGCCCTTCAAAAAAATAAAGCTTAAT CACTAGT | 3 | Proteasomal ATPase | 4e-47 |
| 7G-2 | GATTAAAGCTTAAAGGAGCATGGGGAAGAAGTCTTTAAACTC AAGCGTTCGATTGGCTCATTTGCTCGAAAAATGACCCATGGTGT CTTTTACCTCTGATATACAGAAATGAGACACTCTGAGT AGTTACCCCCACAAAGACAGGCAACGATAGCGGAGAT CTGAGCCGAGCCGCCAAAGATCTTATGAGTGAACCAATA AAATTACAATATCAAAAAAATAAAGCTTAATCACTAGT | 2 | ATP(GTP)-binding fet5 mRNA | 2e-07 |
| 8G | ACTAGTGATTAAAGCTTTTACCGCACAAGGCAATCTCTGCATCC ATCCCGAGCTGATATTTATGTAATATGACATCCATACCG ACGTCCCTTACCAGATCACCAGCTTCCCTTCAAAAAAATAA AAGCTTAAATC | 3 | GDP-mannose pyrophosphorylaseB (GMPPB)mRNA | 0.41 |

IV. 고찰

병원성 자유생활 아메바는 오랜 기간 실험실내에서 계대배양을 할 경우 병독성이 떨어진다. 그러나 이들을 수 차례 걸쳐 계대 감염시키면 병독성이 증가한다는 사실이 마우스를 이용한 연구에서 보고된 바 있다^{21,23}. 이러한 사실로 미루어 마우스 뇌에 계대감염 시킨 아메바는 병독성에 직접적인 영향을 미치는 물질의 발현을 증가시킨다고 추정하여 본 실험에 접근하였다.

이들 병원성 관련 물질의 생체 내 합성에 관여하는 유전자의 발현상의 차이를 규명하기 위해서 본 연구에서는 기존의 분자 유전학적 분석법인 DD RT-PCR을 이용하였다. 이 방법의 주된 원리는 mRNA로부터 PCR의 주형으로 필요한 cDNA를 형성하는 단계에서 역전사 합성시에 3가지 종류의 oligo-dT primer를 사용하여 각기 다른 cDNA pool을 합성한 다음, 각각 cDNA 합성시에 사용한 primer와 한가지의 arbitrary primer를 조합으로 사용하여 PCR을 수행함으로써 무작위로 cDNA를 증폭하여 비교 시료간의 증폭양상의 차이를 분석하는 것이다. 이 분석법은 기존의 염기서열 정보가 전혀 없는 상태에서 arbitrary primer를 사용하여 genomic DNA를 PCR에 의해 무작위로 증폭해서 그 다형성을 분석하는 random amplified polymorphic DNA 분석법에 착안해서, 그리고 mRNA상의 3'말단부에 다수의 특정 염기가 일률적으로 부착(poly-A)된다는 점을 고려하여 개발함으로써 mRNA 발현상의 차이를 빠르게 분석할 수 있다는 장점이 있다.

본 연구에서는 이러한 방법을 통해 총 15개의 계대감염 아메바에서 증가한 분획들을 확인하였으며, 이들 중에서 계대감염 시키지 않는 아메바에서보다 계대감염을 시킨 아메바에서 더 발현이 증가하는 분획을 mRNA상에서 다시 확인하기 위해 Northern blot 분석을 실시한 결과 10개의 분획이 계대 감염시

에 발현이 증가함을 확인하였다. 이러한 분획들은 가시아메바로부터 온 유전자인지 확인하기 위해 분획의 염기서열에 특이한 primer를 작성하여 마우스의 뇌 genomic DNA와 *A. culbertsoni*, *T. vaginalis*, *E. histolytica*, 그리고 *E. coli* 등의 genomic DNA를 주형으로 PCR을 수행하여 *A. culbertsoni*에서만 PCR 증폭산물이 나옴을 확인하였다.

계대감염시 증가한 분획들의 유전자 정보를 동정하고자 Automatic sequencer로 DNA 염기서열을 분석하여 결정하고 BLASTX 프로그램으로 선택한 유전자 정보와 유사한 유전자를 검색한 결과, 2A는 ING p33/p44 tumor suppressor protein과 유사하였고, 3A-1, 3A-2, 3A-3, 3G-1 그리고 4G-1은 어떤 것과도 유사한 DNA 염기서열을 검색할 수 없었다. 또한 7C는 NADH-dehydrogenase, 7G-1는 proteasomal ATPase와 7G-2는 ATP(GTP)-binding fet5 mRNA, 그리고 8G는 GDP-mannose pyrophosphorylaseB와 비슷한 염기서열을 나타내었다. 특히 이렇게 동정된 분획들 중 계대감염시 발현이 10배 증가한 NADH-dehydrogenase는 미토콘드리아내의 전자전달계의 전자 공여체로 알려져 있으나 NADH dehydrogenase내에 포함되어 있는 nuoG 유전자를^{24,25} 장티프스를 일으키는 Salmonella에서 제거하였을 때 Salmonella의 자연형에 비해 병독성이 현저히 줄어들었다고 보고된 바 있어²⁶, NADH-dehydrogenase가 병독성과 연관된 유전자를 포함하고 있는 것으로 생각되어진다. 또한 Proteasomal ATPase의 Proteasome은 세포내에서 proteolysis의 역할과 DNA대사중 전사단계를 조절하는 것으로 알려져 있다²⁷. 특히 본 실험에서 발견한 ATP-dependent protease 복합체는 주요세포내 protease로서 리소좀 밖으로의 단백질 분해 단계에 관여한다고 알려졌다²⁸. 이는 병독성이 감소한 가시아메바의 계속된 계대감염으로 가시아메바의 위와 같은 숙주의 단백질 분해효소의 발현 증가로 병독성이 증가할 수 있는 것으로 사료된다. 다음으로 ATP(GTP)-binding fet5는 그 기능이 잘 알려져 있지 않

는 진핵생물의 전사조절 요소로 보고되어 있다²⁹. 계대감염시 발현이 3배 증가한 GDP-mannose pyrophosphorylase는 숙주동물의 병원성과 생존에 필요한 mannose의 형성에 필수적인 효소로서 mannose의 glycosylation반응에 관여한다³⁰. 이러한 GDP-mannose pyrophosphorylase를 삭제면 곰팡이가 사멸한다는 보고가 있었으며³⁰, Leishmania의 GDP-mannose pyrophosphorylase를 없앴을 때 macrophage와 마우스의 감염시 감염능을 잃어버린 결과로, GDP-mannose pyrophosphorylase는 병독성 유전자로 알려졌다³¹. 한편, 어떤 유전자와도 유사성을 나타내지 못한 분획들중 3A-1, 3A-2, 3A-3 그리고 3G-1는 계대감염 하지 않은 것과 비교했을 때 계대감염할 경우 발현이 10배에서 25배까지 증가하여 병독성의 증가와 관련될 것으로 여겨지며 이들의 기능과 정보를 찾아 나가는 것이 앞으로의 과제로 생각되어진다.

이상과 같이 오랜 기간 실험실내에서 배양해 병독성이 감소한 *A. culbertsoni*를 마우스 계대 감염시킴으로써 병독성이 증가함을 보았고 이는 여러 병독성과 관련한 여러 인자들의 증가로 인한 것으로 생각되어지며 본 실험에서도 병독성과 연관되는 여러 인자들을 동정할 수 있었으며 이러한 인자들이 병독성 증가에 관여하는 것으로 추정된다.

V. 결 론

자유생활 아메바는 토양이나 하천, 대기 중 등 여러 환경에서 분리되며, 가시아메바속에 속하는 아메바들은 종종 육아종성 아메바성 뇌염과 심각한 시력 장애를 유발하는 각막염을 야기 시킨다. 이러한 아메바성 질환의 진단과 치료를 위해서는 병독성과 관련한 인자를 찾아내어 병독성의 원인을 이해하여 근본적인 치료와 진단방법을 찾는 것이 필요하다. 또한 보다 효율적이고 민감도가 높은 분자 생물학적 방법으로 아메바의 병독성이 증가함에 따라 발현이 변하는 유전자를 찾아내어 그 특성을 규명함은 아메바성 질환의 요인을 찾는 데 중요한 자료가 될 수 있다고 본다. 일반적으로 병원성 자유생활아메바는 오랜 기간동안 실험실내에서 계대배양을 할 경우 그 병독성이 급격히 떨어지나 이들을 수 차례에 걸쳐 마우스를 이용하여 계대감염을 시키면 그 병독성이 회복된다는 사실에 입각하여 계대감염을 시킨 아메바는 병독성에 직간접적인 영향을 미치는 물질의 발현이 증가되는 것으로 추정할 수 있다.

본 연구에서는 실험실에서 계대배양 되어온 자유생활 아메바 중 가시아메바를 마우스에 계대 감염을 시킨 후 아메바의 병독성 변화, 즉 병독성 이 증가함에 따라 증가하는 특이적인 유전자를 DD RT-PCR 분석법에 의해 동정하고자 하였으며 그 결론은 다음과 같다.

1. 오랜기간 실험실에서 배양하여 병독성이 감소한 가시아메바를 마우스 비강에 3차례 감염시킨 결과 마우스의 사망률은 첫 번째 감염군에서 5%였으나 세 번째 감염군에서는 70%로 증가하여 병독성이 회복됨을 알 수 있었다.
2. 가시아메바의 병독성 인자를 분리하기 위해 DD RT-PCR을 수행하였고, 실제 mRNA상에서 10개의 분획이 비 감염군에 비해 감염군에서 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

3. 10개의 분획의 DNA 염기서열을 BLASTX로 분석한 결과 5개의 분획은 유사한 염기서열이 보고된 바 없었으며 그 외에는 ING p33/p47 tumor suppressor protein, 진핵생물의 전사 조절 단백질의 일종인 fet5, 전자전달계에 관여하는 효소중의 하나인 NADH-dehydrogenase, 그리고 GDP-mannose pyrophosphorylase와 유사한 염기서열을 나타내었다.

4. 특히 본 실험에서는 병독성과 연관된 nuoG 유전자를 포함하고 있는 NADH-dehydrogenase와 세포내 단백질 분해 과정에 중요한 복합체인 proteasomal ATPase 그리고 병독성 유전자로 알려진 GDP-mannose pyrophosphorylase를 분리하였다.

이상의 분석결과 오랜기간 배양하여 병독성이 감소한 아메바를 마우스에 감염시켰을 때 여러 물질대사 또는 병독성 관련 유전자들의 발현이 변동함에 따라 아메바의 병독성이 증가하는 것으로 보이며 이러한 관련 유전자를 찾아내었고 그 기능을 밝힘으로써 병독성 인자를 밝히는데 기초 자료가 될 수 있다고 본다.

참고문헌

1. Fowler M, Carter RF. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. Apreliminary report. Br Med J 1965;2:740-42.
2. Culbertson CG. The pathogenicity of soil amebas. Annu Rev Microbiol 1971; 25:231-54.
3. Wong MM, Karr SL, Balamuth WB. Experimental infections with pathogenic free-living amoeba susceptibility to *Naegleria fowleri*. J Parasitol 1975;61: 109-208.
4. Cohen EJ, Buchanan HW, Laughrea PA, Adams CP, Galentine PG, Visvesvara GS, Folberg K, Arentsen JJ, Laibson PR. Diagonosis and management of *Acanthameba* keratitis. Am J Ophthalmol 1985;100:389-95.
5. Jones DB. *Acanthamoeba* the ultimate opportunist? Am J Ophthalmol 1986;102:527-30.
6. Cohen EJ, Parlato CJ, Arentsen JJ, Genvert GI, Eagle RC Jr Wieland MR, Laibson PR. Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba*. J Protozool 1987;32:604-07.
7. Gardner HAR, Martnez AJ, Visvesvara GS, Sotrel A. Granulomatos amoebic encephalitis in an AIDS patient. Neurology 1991;41:1993-95.
8. Helton J, Loveless M, White CR. Extraordinary case reports: Cutaneous *Acathamoeba* infection associated with leukocytoclastic vasculitis in an AIDS patient., Am J Dermatopathol 1993;15:146-49.
9. Tan B, Weldon-Linne M, Rhone DP, Penning CL, Visvesvara GS. *Acanthamoeba* infection presenting as skin lesions in patients with the aquired immunodeficiency syndrome. Archpathol Lab Med 1993;117:1043-46.
10. 임경일. Pathogenic free-living amoeba. Korean J Parasitol 1990;28:29-39.

11. Bohle AL, Friedman TA, Braunstein H, Tomasulo M. Rapid diagnosis of primary meningoencephalitis due to *Naegleria* : Detection of organisms with bacterial strains. J Clin Pathol 1978;32:36-37.
12. Lynne SG, Lawrence RA. In diagnostic parasitology clinical laboratory manual St. Louis, CV Mosby 1979:1-67.
13. Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J Protozool 1967;14:709-24.
14. Sigh BN, Das SR. Studies on pathogenic and non-pathogenic small free-living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the other Amoeba. Philos Trans R Soc Lond 1970;259:435-76.
15. Costas M, Griffiths AJ. Enzyme composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. J Protozool 1985;32:604-07.
16. Liang P, Averboukh L, Pardee AB. Distribution and cloning of eukaryotic mRNA by means of differential display; refinements and optimization. Nucleic Acids Res 1993;21:3269-75.
17. Sokolov BP, Prockop DJ. A rapid and simple PCR-based method for isolation of cDNAs from differentially expressed genes. Nucleic Acids Res 1994;22:4009-15.
18. Abrahamsen MS, Jonhson PR, Hathaway M, White MW. Identification of *Eimeria bovis* merozoite cDNAs using differential mRNA display. Mol Biochem Parasitol 1995;71:183-91.
19. Gromova I, Gomov P, Cetus JE. A novel member of the glycosyltransferase family, beta3 Gn-T2, highly downregulated invasive human bladder cell carcinomas. Mol Cacinog 2001;32:61-72.
20. Schneider O, Zelck UE. Differential display analysis of hemocytes from

- Schistosome-resistant and Schistosome-susceptible intermediate hosts.
Parasitol Res 2001;87(6):489-91.
21. Marzur I, Hadas E. The effect of the passage of *Acanthamoeba* strains through mice tissue on their virulence and its biochemical markers.
Parasitol Res 1994;80:431-34.
 22. Hadas E, Mazur T. Proteolytic enzyme of pathogenic and non pathogenic strains of *Acanthamoeba* spp. Trop Med Parasitol 1993;44:197-200.
 23. 이득기, 이근태, 임경일. 자유생활아메바 *Naegleria fowleri*의 계대감염에 의한 병원성의 변화에 관한 연구. 기생충학잡지 1983;21:234-40.
 24. Anraku, Y and Gennis, RB. The aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*, Trends Biochem Sci 1987;12:262 - 66.
 25. Anraku, Y. Bacterial electron transport chains. Ann Rev Biochem 1988; 57:101-32.
 26. Li ZB, Arthur KT, Gordon D, Paul AB. Protection of chickens against experimental fowl typhoid using a nuoG mutant of Salmonella serotype Gallinarum. Vaccin 1998;16:899-903.
 27. DeMartino GN, Moomaro CR, Zagnitko OP, Proske RJ, Chu-ping M, Afendis SJ, Swaffield JC, Slaughter CA. PA700, an ATP-dependent activator of the 20S proteasome, and ATPase is containing multiple members of nucleotide-binding protein family. J Biol Chem 1994;269:20878-84.
 28. Aaron C. The Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway. Cell 1994;79:13-21.
 29. Shpakovskii GV, Lebeddenko EN. The first member of a novel family of eukaryotic transcription factors detected by the heterospecific complementation Bioorg khim 1997;23:234-37.
 30. Varki A Exploring the biological roles of glycans. In Varki, A, Cummings,

R, Esko, J, Freeze, H, Hart, G and Marth, J(eds). Essentials of Glycobiology., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1999:57-68.

31. Attila G, Thomas L. Disruption of mannose activation in *Leishmania mexicana* GDP-mannosepyrophosphorylase is required for virulence, but not for viability. The EMBO 2001;20:3657-66.

Abstract

Identification of differentially expressed *Acanthamoeba culbertsoni* mRNA induced by the mouse brain passage via DD RT – PCR analysis

Don-Soo Kim

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

(Directed by Professor Tai-Soon Yong)

Free-living amoebae in the genus *Acanthamoeba* are ubiquitous in environment (fresh water, soil and air free-living amoebae) and some of the facultatively cause humans of granulomatous amoebic encephalitis and amoebic keratitis. In this study, based on the fact that the virulence of an amoeba (*Acanthamoeba culbertsoni*) which has been cultured in laboratory is restored via consecutive brain passages, identification of the genes responsible for restoring virulence in the brain passaged *A. culbertsoni* was attempted via differential display reverse-transcriptase polymerase chain reaction (DD RT-PCR) analysis. Restoring of the virulence of the long-term cultured *A. culbertsoni* in the laboratory was verified via 2 consecutive mouse brain passages. Mortality of the infected mice was

raised from 5% in the first infection to 70% in the third infection (the second brain passage). By DD RT-PCR analysis, 15 brain passaged amoeba induced amplicons were observed and screened to identify the amplicons which more expression brain passaged amoeba than non-brain passaged amoeba mRNAs by all the primer combinations used in DD RT-PCR via Northern blot hybridization analysis. For RNA Northern blot hybridization, amplicon reamplified each DD RT-PCR reaction, which was pooled and used as probes after labeling with ³²P. ten of the 15 brain passaged amoeba induced amplicons were turned out to be increased from the brain passaged amoeba mRNAs. Further characterization of the 10 brain passage induced amplicons by DNA sequencing and BLASTX search. five amplicons were not identified and each amplicon is matched by ING p33/47 tumor suppressor protein, NADH-dehydrogenase, Proteasomal ATPase, ATP/GTP-binding fet5 mRNA and GDP-mannose pyrophosphorylaseB. NADH-dehydrogenase, Proteasomal ATPase and GDP-mannose pyrophosphorylaseB are reported that they are related virulent elements. In conclusion, each gene may be played an role in resorting virulence of *A. culbertsoni* via the mouse brain passage.

Key Word : free-living amoeba, *Acanthamoeba culbertsoni*, virulence, DD RT-PCR analysis, Northern blot hybridization