



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위논문

**파울러자유아메바 Cathepsin B 및  
Cathepsin B-Like 단백질에 대한  
단클론항체의 생산과 특성규명**

아주대학교 대학원

의생명과학과/분자의학전공

성기상

**파울러자유아메바 Cathepsin B 및  
Cathepsin B-Like 단백질에 대한  
단클론항체의 생산과 특성규명**

지도교수 신 호 준

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함.

2016년 8월

아 주 대 학 교 대 학 원  
의생명과학과/분자의학전공

성 기 상

성기상의 이학 석사학위논문을 인준함.

심사위원장 신 호 준 인

심 사 위 원 박 선 인

심 사 위 원 김 경 민 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2016년 6월 21일

## 파울러자유아메바 **Cathepsin B** 및 **Cathepsin B-Like** 단백질에 대한 단클론항체의 생산과 특성규명

파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)는 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis; PAM)을 일으키는 병원체이다. 파울러자유아메바의 사람이나 실험 동물에 감염은 아메바가 오염된 물에서 물놀이 혹은 수영활동을 할 때 비강내로 아메바 영양형이 유입될 때 일어난다. 파울러자유아메바의 병인기전으로는 숙주세포와 접촉하여 사멸에 이르게 하는 접촉성 병인기작과 여러가지 단백분해효소를 분비하여 숙주세포에 영향을 주는 비접촉성 병인기작으로 알려져 있다. 파울러자유아메바의 시스테인 단백질분해효소계열인 **Cathepsin B** (NfCPB) 및 **Cathepsin B-Like** (NfCPB-L) 단백질이 클로닝 되었고, 이들의 유전자 크기는 각각 1,038 bp (345개 아미노산) 및 939 bp (313개 아미노산)이다. 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질은 각각 38.4 kDa과 34 kDa의 분자량을 갖고 있으며, 숙주의 조직침투, 면역회피와 영양분흡수에 관련이 있다고 보고되었다. 본 연구는 파울러자유아메바에서 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 분자면역학적 특성을 관찰하기 위하여 단클론항체를 생산하고자 하였다. 먼저 재조합 NfCPB 및 NfCPB-L 단백질을 얻은 후 마우스에 2주 간격으로 3번 면역시키고, 혈청을 얻어서 ELISA를 통해 항체가(titre)가 높아진 것을 확인하였다. 면역된 마우스의 비장(spleen)을 적출하여 비장세포들을 얻고 myeloma cell line인 F/0 세포들과 세포융합기술(cell fusion)을 통해 잡종세포(hybridoma cell)를 얻었다. 항체가가 높은 클론을 선택하여 제한개수희석법(limiting dilution)을 통하여 단클론세포주(monoclon)를 얻었다. 항-NfCPB 단클론항체를 분비하는 단클론세포주 7개를 얻었고, 항-NfCPB-L 단클론항체를 분비하는 단클론세포주 3개를 얻었다. 이 중 항체가가 높은 단클론 세포주들을 각각 한 개씩 즉, 2C9 (항-NfCPB)과 1C8 (항-NfCPB-L)선택하여 마우스의 복강에 주입하여 복수를 얻었고 정제하여 대량의 단클론항체를 얻었다. 각 항원에 대한

western blot을 시행한 결과, 2C9 단클론항체는 파울러자유아메바의 전체세포 추출물(lysate)과 재조합 NfCPB 단백질에서 각각 28 kDa, 38.4 kDa에서 반응하였으며, 1C8 단클론항체는 파울러자유아메바의 전체세포추출물과 재조합 NfCPB-L 단백질에서 각각 24 kDa과 34 kDa에서 반응하였다. 또한, 종 특이성(species-specific)을 확인하기 위하여 파울러자유아메바(*N. fowleri*), 그루버자유아메바(*N. gruberi*), 카스텔란가시아메바 (*Acanthamoeba castellanii*), 대식가시아메바(*A. polyphaga*)의 전체세포 추출물과 2C9과 1C8을 이용하여 각각 western blot을 시행한 결과, 파울러자유아메바 이외의 다른 종의 아메바에서는 반응하지 않았다. Immunocytochemistry assay를 통해 파울러자유아메바 세포내에서 NfCPB와 NfCPB-L 발현위치를 관찰한 결과, 대체로 세포질 전체에서 분포하고 있었으며 특히, 위족(pseudopodia)과 food-cup에 많이 분포하고 있었다. 본 연구결과, 2C9와 1C8 단클론항체는 파울러자유아메바를 면역학적으로 연구하는데 유용하게 사용될 것으로 생각된다.

---

**핵심어** : 파울러자유아메바, 단클론항체, Cathepsin B 단백질, Cathepsin B-Like 단백질

# 차 례

국문요약 .....	i
차례 .....	iii
그림 차례 .....	v
표 차례 .....	vi
I. 서론 .....	1
1) 파울러자유아메바( <i>Naegleria fowleri</i> ) .....	1
2) 원발성 아메바성 수막뇌염(PAM) .....	1
3) 파울러자유아메바의 병인기전 .....	2
4) 시스테인 단백분해효소(Cysteine protease) .....	4
5) NfCPB 및 NfCPB-L 단백질 .....	4
6) 연구의 목적 .....	5
II. 재료 및 방법 .....	6
1) 자유아메바의 배양 및 전체추출물 준비 .....	6
2) 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질 생산 .....	6
3) 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 마우스 면역 .....	7
4) 효소면역측정법(ELISA) .....	7
A. 세포융합(cell fusion) .....	8
B. 마우스의 비장세포준비 .....	8
C. Myeloma세포의 배양 .....	9
5) 세포융합(cell fusion) .....	9

6) 단클론항체를 생산하는 세포군 선택 .....	10
7) 단클론항체의 대량생산 및 정제 .....	10
8) 단클론항체의 isotyping .....	11
9) 항원성 검정을 위한 SDS-PAGE 와 Western blot 시행 .....	11
10) Immunocytochemistry 시행 .....	12
<b>III. 결과</b> .....	<b>13</b>
1) 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질 생산 .....	13
2) 재조합 NfCPB와 NfCPB-L단백질에 대한 단클론항체의 생산 .....	15
A. 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 마우스 면역 .....	15
B. 잡종세포주에서 항-NfCPB 항체와 항-NfCPB-L 항체 분비확인 .....	17
C. 단클론세포주에서 항-NfCPB 항체와 항-NfCPB-L 항체 분비확인 .....	19
3) 항-NfCPB 단클론항체와 항-NfCPB-L 단클론항체의 isotype .....	21
4) 2C9(항-NfCPB)와 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체의 항원성 .....	23
5) 2C9(항-NfCPB)와 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체의 종특이성 .....	25
6) 2C9(항-NfCPB)와 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체의 Immunocytochemistry assay 결과 .....	27
<b>IV. 고찰</b> .....	<b>29</b>
<b>V. 결론</b> .....	<b>33</b>
참고문헌 .....	34
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>38</b>



## 그림 차례

<b>Fig. 1. Distribution map of reported primary amoebic meningoencephalitis caused by <i>N. fowleri</i> infection in worldwide</b> .....	3
<b>Fig. 2. Expression and purification of recombinant NfCPB and recombinant NfCPB-L proteins</b> .....	14
<b>Fig. 3. Antibody formation in mice sera after 3<sup>rd</sup> immunization with rNfCPB and rNfCPB-L</b> .....	16
<b>Fig. 4. Selection of hybridoma cells from 96-well plate and subculture into 75-cm<sup>2</sup> flask</b> .....	18
<b>Fig. 5. Selection of monoclones producing monoclonal antibodies from 96-well plate and subculture into 75-cm<sup>2</sup> flask</b> .....	20
<b>Fig. 6. SDS-PAGE band pattern and western blot analysis of Nf-lysate, Nf-ESP rNfCPB and rNfCPB-L proteins</b> .....	24
<b>Fig. 7. Immunolot analysis of monoclonal antibodies 2C9 and 1C8 with lysates of various amoebae</b> .....	26
<b>Fig. 8. Localization of NfCPB and NfCPB-L proteins in the <i>N. fowleri</i> trophozoite by immunocytochemistry assay using 2C9 and 1C8 monoclonal antibody</b> .....	28

# 표 차례

Table 1. Isotype of monoclonal antibodies ..... 22



# I. 서 론

## 1) 파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)

자유생활을 하는 아메바인 파울러자유아메바(*N. fowleri*)는 습지, 연못과 하천, 수영장 등 다양한 환경에서 발견되며(Cerva, 1971), 실험동물이나 사람에게 치명적인 원발성 아메바성 수막뇌염(Primary amoebic meningo-encephalitis, PAM)을 유발하는 병원체로 보고되었다(Carter, 1970; Culbertson, 1971). 파울러자유아메바는 자연환경에서 포낭형(cyst), 영양형(trophozoite) 그리고 편모형(flagellate)의 세 가지 형태의 생활사 가지고 있다. 인체로의 감염은 파울러자유아메바 영양형이 오염된 물에서 수영과 다이빙 같은 수중활동을 할 때 비강으로 들어오는데, 비강점막을 뚫고 후신경을 따라 중추신경계로 이동하여 뇌로 침범해 원발성 아메바성 수막뇌염(PAM)을 일으킨다(Carter, 1968, 1972).

## 2) 원발성 아메바성 수막뇌염(PAM)

파울러자유아메바에 의한 원발성 아메바성 수막뇌염은 1965년에 처음으로 보고되었고(Fowler and Carter, 1965), 이후 지금까지 약 320건의 증례가 보고되었으며 약 98%의 환자가 사망하였다(De Jonckheere, 2011). 특히, 미국의 경우에는 1965년부터 2010년까지 총 111건의 파울러자유아메바에 의한 원발성 아메바성 뇌수막염이 보고되었다(Su et al., 2013; Lee et al., 2014) (그림 1).

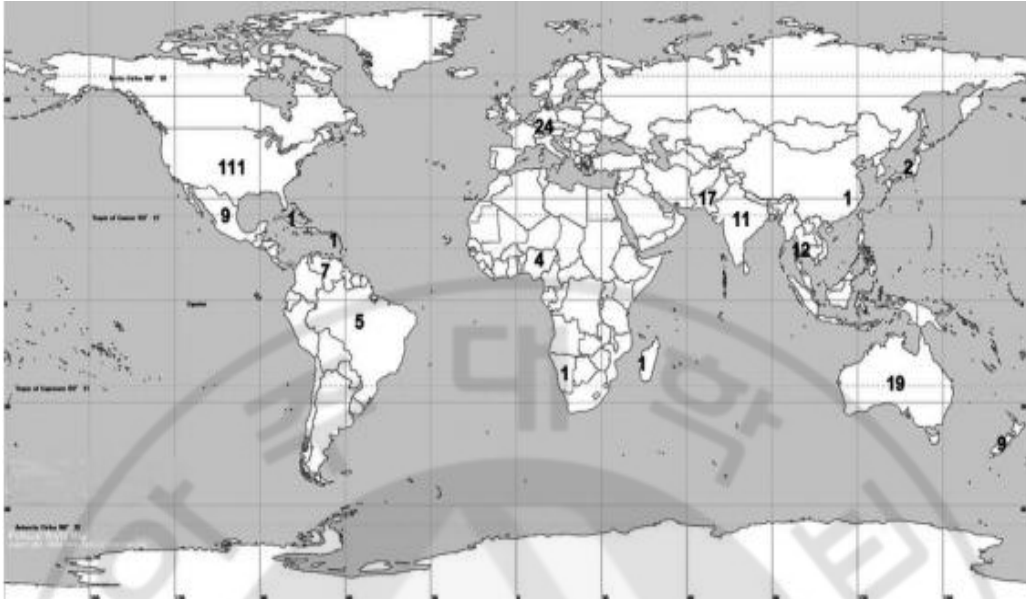
파울러자유아메바에 감염되면 중추신경계의 전뇌(forebrain)에 수막염(meningitis)이 발생되며 극심한 두통, 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 고열(38~40°C), 뇌막자극의 증후 그리고 뇌염을 동반한 치명적인 증상이 동반된다(John, 1982; Martinez and Visvesvara, 1997; Schuster and Visvesvara, 2004; Shin and Im, 2004). 원발성 아메바성 수막뇌염의 임상적 특징은 세균성 수막뇌염 또는 급성

화농성뇌염과 차이가 없어 초기진단 및 치료가 어렵다. 따라서 원발성 아메바성 수막뇌염의 진단은 감염부위의 생검을 통하여 아메바 영양형의 존재유무 혹은, 척수액으로부터 아메바를 배양했을 때 영양형의 유무를 확인하는 것을 기초로 한다(Ma et al., 1990).

### 3) 파울러자유아메바의 병인기전

파울러자유아메바는 숙주에 병변을 일으킬 때 다양한 기작을 가지고 있는데 숙주세포와 직접 접촉하여 사멸에 이르게 하는 접촉성 병인기작 (contact-dependent mechanism)과 숙주세포에 직접 접촉하지는 않고 아메바가 분비하는 여러가지 단백질효소들이 숙주세포에 영향을 주는 비접촉성 병인기작 (contact-independent mechanism)이 있다.

이전 연구에서 파울러자유아메바의 접촉성 병인기작에 관여하는 병인인자(pathogenic factor)들로 세포독성에 관련된 구조로 알려진 amoebastome (food-cup)에서 발현하는 Nfa1(Cho et al., 2003), 파울러자유아메바의 위쪽에 특이적으로 발현하는 Heat shock protein 70와 세포질 내에 광범위하게 분포되어 있으며 식세포작용에 중요한 역할을 하는 food-cup 구조 주변에서 강하게 발현되는 Nf-actin 등이 있다고 보고되었다(Song et al., 2008; Sohn et al., 2010). 비접촉성 병인기작에 관여하는 병인인자는 파울러자유아메바의 분비배설단백질(ESP)에 포함되어 있는 숙주세포의 인지질막을 약하게 하는 phospholipase A와 phospholipase B, 숙주의 조직을 약하게 하여 아메바가 숙주에 침투하기에 용이하게 하는 neuraminidase와 elastase, 숙주의 세포를 용해시키는 perforin-like protein과 pore-forming protein 그리고 cysteine protease가 있다고 보고되었다(Schuster and Visvesvara, 2004; Marciano-Cabral and Cabral, 2007).



**Fig. 1. Distribution map of reported primary amoebic meningoencephalitis caused by *N. fowleri* infection in worldwide (De Jonckheere, 2011).**

#### 4) 시스테인 단백분해효소(Cysteine protease)

시스테인 단백분해효소는 시스테인의 -SH기 촉매기로 하는 단백질가수 분해효소로써 다양한 기생충의 병원성에 많이 관여한다고 알려져 있다. 폐흡충(*Paragonimus westermani*)과 광동주혈선충(*Angiostrongylus cantonensis*)의 시스테인 단백분해효소인 cathepsin B-like 단백질은 숙주의 구조단백질(collagen, fibronectin)을 분해시키는 능력이 있어서 숙주조직에 침투하는데 관여한다고 보고되었다(Na et al., 2006; Long et al., 2015). 만손주혈흡충(*Schistosoma mansoni*)와 간흡충(*Clonorchis sinensis*)의 시스테인 단백분해효소는 숙주의 단백질(hemoglobin, albumin)을 분해하는 능력이 있어서 병원체의 영양분흡수(nutrient uptake)와 관련이 있다고 보고되었다(Chappell and Dresden, 1986; Na et al., 2008). 이질아메바(*Entamoeba histolytica*)의 시스테인 단백분해효소는 숙주의 면역과 관련된 단백질(IgG, IgM, IgA)을 분해하는 능력이 있어서 숙주의 면역 체계를 회피할 때 중요한 역할을 한다고 보고되었다(Keene et al., 1986).

#### 5) NfCPB 및 NfCPB-L 단백질

시스테인 단백분해효소 계열의 단백질에는 cathepsin B와 cathepsin B-Like 와 같은 단백질이 있다. 파울러자유아메바의 cathepsin B (NfCPB)와 cathepsin B-Like (NfCPB-L) 단백질의 유전자(gene) 크기는 각각 1,038 bp와 939 bp이고, 재조합 단백질의 분자량은 각각 38.4 kDa과 34 kDa이다. NfCPB와 NfCPB-L 단백질은 구조 단백질들 예를들어, collagen과 fibronectin의 일부를 파괴하여 숙주조직에 침투하는데 관여하고, IgG, IgM 및 IgA과 같은 면역글로불린을 파괴하여 숙주의 면역체계를 회피하는 것으로 보이며 또한, 헤모글로빈(hemoglobin)이나 알부민

(albumin)을 파괴하여 영양분흡수(Nutrient uptake)에 관여한다고 보고되었다(Lee et al., 2014).

## 6) 연구의 목적

과울리자유아메바의 비접촉성 병인기작에 관여하는 NfCPB와 NfCPB-L 단백질에 대한 분자 면역학적인 연구는 아직 보고된바 없다. 따라서 본 연구는 세포융합기술(cell fusion)을 이용하여 NfCPB와 NfCPB-L 단백질에 대한 단클론 항체를 생산하고, 이 항체를 이용하여 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 면역학적 특성을 규명을 하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1) 자유아메바의 배양 및 전체추출물 준비

과울러자유아메바(Carter Nf69 strain, ATCC 30215)는 10% 우태아혈청을 포함한 Nelson's medium을 이용하여 37°C에서 무균배양 하였다. 비병원성인 그루버자유아메바(Schardinger strain; ATCC 30960)는 10% 우태아혈청을 포함한 PYNFH 배지를 이용하여 33°C에서 무균배양 하였고, 과울러자유아메바와 근연종인 카스텔란가시아메바와 대식가시아메바는 PYG 배지를 이용하여 25°C에서 무균배양 하였다(Lakhundi et al., 2014). 아메바들의 전체세포추출물(lysate)을 얻기 위해서 각각의 아메바 영양형을 원심분리(1,500 rpm, 3분)하여 상층액을 버리고, phosphatebuffered saline (PBS, pH 7.2)으로 두 번 씻어 주었다. 모아진 영양형을 freezing-thawing 방법으로 aqueous extract 즉, 전체세포추출물(lysate)를 만들어 실험에 사용하였다.

### 2) 재조합 NfCPB 와 NfCPB-L 단백질 생산

재조합(recombinant) NfCPB 및 NfCPB-L 단백질을 생산하기 위해 *nfcpb*와 *nfcpb-L* 유전자를 각각 포함하는 pExp5-TOPO TA vector (pExp5- TOPO-*nfcpb*, pExp5- TOPO-*nfcpb-L*, Invitrogen, USA)를 *Escherichia coli* strain인 BL21 (DE3)에 형질전환 하였다. 이후 100 mg/ml의 ampicillin이 들어있는 Luria-Bertani 배지에 접종하여 OD<sub>600</sub>가 0.4~0.6이 될 때까지 37°C, 200 rpm에서 배양하였다. 1 mM isopropyl β-D- thiogalactopyranoside (IPTG, Goldbio, USA)를 넣고 37°C, 200 rpm에서 4시간 동안 배양하였다. 이 후 원심분리(8,000 rpm, 20분, 4°C)를 하여 세포만 모은 후, 모은 세포에 8M Urea lysis buffer (8 M urea, 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.01 M Tris-HCl)를 넣어 재부유시켰다. 이후 원심분리(8,000 rpm, 20분, 4°C)를 하여 상층액만



모았고, 이 상층액을 nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) chromatography (QIAGEN, USA)으로 제조자의 지침서를 따라 정제하였다. 정제된 재조합 단백질은 Amicon® Ultradevice (cut-off 10 kDa; Millipore, Bedford, MA, USA)를 이용하여 농축하였다.

### 3) 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 마우스 면역

각각 50 µg의 재조합 NfCPB 및 NfCPB-L 단백질(rNfCPB 및 rNfCPB-L)과 100 µl의 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA)와 잘 혼합하여 생후 6주된 BALB/c 암컷 마우스(DBL, Korea)의 복강내로 주사하여 1차 면역을 진행하였다. 1차 면역 후 2주일이 지난 뒤 각 25 µg 항원을 100 µl의 Freund's incomplete adjuvant (Sigma, USA)와 혼합하여 복강 내로 주사하여 2차 면역을 진행하였다. 2차 면역을 하고 2주가 지난 뒤 2차 면역방법과 동일한 방법으로 3차 면역을 진행하였다. 3차 면역 후 2주가 지난 뒤 마우스의 꼬리에서 혈액을 채취 후 원심분리(13,000 rpm, 5분, 4°C)하여 혈청을 얻었고, 이를 효소면역측정법(ELISA)을 사용하여 면역역가(antibody titre)를 측정하였다. 마우스의 면역역가가 높아진 것을 확인 한 후, 25 µg의 항원을 마우스 꼬리의 정맥내로 주사하여 boosting을 시행하였다. 이 후 4일이 지난 뒤 마우스의 비장을 적출하여 세포 융합에 사용하였다.

### 4) 효소면역측정법(ELISA)

면역된 마우스의 면역역가와 융합세포(hybridoma cell)들의 항체분비를 확인하기 위해서 효소면역측정법(ELISA)을 시행하였다. 각 항원의 농도가 1 µg/ml이 되도록 0.05 M carbonate-bicarbonate 완충용액(pH 9.6)에 희석하여 polystyrene ELISA plate (Immunoplate, Nunc, USA)에 well당 100 µl씩 분주한 후

4°C에서 12시간 이상 부착시켰다. 항원이 부착된 ELISA plate를 0.05% PBST (Tween 20, Sigma, USA)로 5분씩 3회 세척한 후 3% Bovine serum albumin (Bovogen, Australia) (BSA를 PBS에 녹임) 용액을 각 well당 100  $\mu$ l씩 넣고, 상온에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적 반응을 차단하였다. 각 혈청을 PBS (pH 7.2)에 1:200으로 희석하여 100  $\mu$ l씩 넣어주거나 세포배양액을 100  $\mu$ l씩 넣고 (건강한 마우스의 혈청을 음성대조군으로 사용) 37°C에서 2시간 반응 시켰다. 다시 PBST로 5분씩 3회 세척 후 PBS에 1:10,000으로 희석한 goat anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase (Sigma, USA)을 각 well당 100  $\mu$ l씩 넣고 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 PBST로 5분씩 3회 세척 후 substrate 완충용액 20 ml에 1개의 p-nitrophenylphosphate tablet (p-NPP) (Sigma, USA)를 녹인 뒤, 각 well당 100  $\mu$ l씩 넣었다. 빛이 차단된 곳에서, 20분 동안 실온 반응시키고, ELISA Reader (BIO-RAD, model 680, USA)로 405 nm의 파장에서 각 well의 흡광도를 측정하였다.

## 5) 세포융합(cell fusion)

### A. 마우스의 비장세포준비

마우스의 비장을 적출하기 직전에 마우스의 안와정맥에서 혈액을 채취하여 4°C에서 4시간 보관한 후 원심분리(12,000 rpm, 5분, 4°C)하여 혈청을 얻었고, 얻은 혈청은 항체를 분비하는 융합세포를 검색할 때 양성대조군으로 사용되었다. 마우스의 비장세포를 얻기 위해 비장을 상처내지 않고 적출하여 비장세포들로 분리시켰다. 여기에 적혈구를 제거하기 위하여 RBC lysis buffer (0.15 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0.01 M  $\text{KHCO}_3$ , 0.1 mM EDTA, pH 7.5)를 넣고 상온에서 5분간 반응시켰다. 이 후 원심분리(1,500 rpm, 3분)한 뒤 상층액을 제거하였고, 침전물에 10 ml의 incomplete DMEM (1% P/S를 포함한 DMEM)을 넣고

원심분리(1,500 rpm, 3분)한 뒤 상층액을 제거하였다. 위와 같은 방법을 2번 더 시행하여 비장세포를 세척하였다. 세척이 끝나면 침전된 비장세포에 10 ml의 incomplete DMEM을 넣고 재부유 시켰다.

## **B. Myeloma세포의 배양**

세포융합에는 BALB/c 마우스의 형질 세포주인 F0 세포를 사용하였는데 75-cm<sup>2</sup> culture flask (Falcon, USA)에서 10% 우태아혈청(FBS, Gibco, USA)와 1% penicillin/streptomycin (P/S, Gibco, USA)을 포함하는 complete DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, USA)를 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 항온기에서 배양하였다.

## **C. 세포융합(Cell fusion)**

단세포군 항체를 생산하기 위해 세포융합기술을 시행하였다. 비장 세포와 미리 배양하고 있던 F0 세포(10:1 비율)를 혼합한 후 원심분리(1,500 rpm, 3분)하여 상층액을 제거하였다. 모아진 세포에 미리 37°C로 맞춰둔 50% polyethylene glycol 1450(Sigma, USA) 용액 1 ml을 1분 동안 넣고 1분 동안 실온에서 반응시켰다. 그 후 1 ml의 incomplete DMEM을 1분 동안 넣어주었고, 그 후 2 ml, 3 ml, 5 ml, 8 ml incomplete DMEM을 각각 1분 동안 순서대로 같은 방법으로 넣고 5회 inverting 한 후 원심분리(1,000 rpm, 5분)하였다. 상층액을 제거하고 모아진 세포에 40 ml 의 complete DMEM (20% FBS와 1% P/S를 포함한 DMEM)을 넣어준 후 재부유 시켰다. 그 후 96-well plate (Nunc, USA)에 100 µl씩 분주한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에 넣어 배양하였다. 다음날 96-well plate에서 100 µl씩 덜어내고 1x HAT 배지(Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidine) (Sigma, USA)를 100 µl씩 넣어 주었다. 2일째와 3일째에도 같은 방법으로 HAT 배지로

갈아주었다. 4일째에 96-well plate에서 well 당 100  $\mu$ l씩 덜어내고 1x HT배지 (Hypoxanthine, Thymidine) (Sigma, USA)를 well당 200  $\mu$ l씩 넣어주고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 10일동안 무균배양 하였다. 이 후 96-well plate에서 자란 잡종세포 (hybridoma cell)의 세포배양액을 이용하여 ELISA를 시행하였고, 항체분비가 확인된 세포는 24-well plate (Nunc, USA)로 옮겨 배양하였고, 그 다음 75-cm<sup>2</sup> culture flask로 계대배양하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

## 6) 단클론항체를 생산하는 세포군 선택

단클론항체(monoclonal antibody)를 생산하는 단세포군(monoclon)의 선택은 제한개수희석법(limiting dilution)을 시행하였다. 75-cm<sup>2</sup> culture flask에서 자란 세포들을 수확하여 96-well plate의 well당 0.25개씩 되도록 세포개수를 희석하여 96-well plate에 넣고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다. 그 후 well당 1개의 세포만 들어간 것을 확인하고 충분히 자란 well을 선택하였다. 그 세포배양액을 이용하여 ELISA를 시행하였고 항체분비가 확인된 세포는 24-well plate로, 그 다음 75-cm<sup>2</sup> culture flask로 계대배양하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온기에서 배양하였다.

## 7) 단클론항체의 대량생산과 정제

항-NfCPB 단클론항체와 항-NfCPB-L 단클론항체의 대량생산을 위하여 마우스 복수채취법(ascites collection)을 시행하였다. 8주 정도된 수컷 BALB/c 마우스(DBL, Korea)를 사용하였으며, 복수의 생성을 높이기 위하여 단클론 세포주를 마우스의 복강에 주사하기 4~5일전에 200  $\mu$ l의 Freund's incomplete adjuvant를 먼저 복강 내에 주사하였다. 그 후 배양중인 단클론세포( $5 \times 10^6$ 개)를 마우스의 복강 내에 주사하였다. 1~2주 동안 관찰하면서 마우스에 복수가 차면 18 G 바늘을 이용하여 복수를 채취하였다. 복수를 4°C에서 1시간이상 넣어둔

뒤에 원심분리(8,000 rpm, 20분, 4°C)하고 상층액만 얻었다. 얻은 상층액을 protein A column (proA™, KOREA)을 이용하여 affinity purification을 시행하였고, 정제된 항체는 Amicon® Ultradevice (cut-off 10 kDa)를 이용하여 농축하였으며 이것을 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

## 8) 단클론항체의 isotyping

정제된 단클론항체의 isotype을 확인하고자 mouse monoclonal antibody isotyping kit (Roche, USA)를 제조자의 지침서에 따라 사용하였다.

## 9) 항원성 검정을 위한 SDS-PAGE 와 Western blot 시행

과올리자유아메바의 전체세포추출액과 정제된 rNfCPB와 rNfCPB-L단백질의 분자량을 확인하기 위해서 Laemmli (1970)의 방법에 따라 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다(Laemmli, 1970). 각각의 단백질에 SDS-PAGE sample loading buffer를 첨가하였으며, 5분간 끓인 후 12% SDS-PAGE gel에 적하하여 100 V로 전기영동 하였다. Western blotting을 위해 전기영동이 끝나기 전에 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore, Bedford, MA)을 100% 메탄올에 미리 5분간 담가놓아 단백질이 membrane에 붙을 수 있도록 활성화 시켜놓은 후, acrylamide gel 단백질을 PVDF membrane으로 250 mA로 2시간 동안 전기이적 하였다. 비특이적인 반응이 일어나는 것을 차단하기 위해서 PVDF membrane을 5% skim milk (BD, USA) 용액에 4°C, 18시간 동안 담가두었다. PBST로 PVDF membrane을 5분씩 3회 세척한 후, 각각의 항-NfCPB와 항-NfCPB-L 단클론항체(3% BSA에 1:200으로 희석)를 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 PVDF membrane을 5분씩 3회 세척한 후, goat anti-mouse IgG conjugated alkaline phosphatase (Sigma, USA)용액을 PBST에 1:10,000으로

희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. PBST로 PVDF membrane을 5분씩 3회 세척하고, substrate 완충용액 20 ml에 1개의 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate/nitro blue tetrazolium tablet (BCIP/NBT) (Sigma, USA)를 녹인 후, 이 용액을 넣고 실온에서 5분간 발색시켰다.

## 10) Immunocytochemistry 시행

과울러자유아메바의 세포내 NfCPB 및 NfCPB-L단백질이 발현되는 위치를 확인하기 위하여 간접형광항체법(indirect fluorescent antibody test)을 약간 변형하여 시행하였다(Kang et al., 2005). Slide coverglass위에서 배양한 아메바 영양형들을 고정하기 위해서 실온에서 10% formaldehyde로 10분 동안 처리하였다. PBS로 2회 세척한 뒤 permeabilization을 하기 위해서 1% ammonium hydroxide를 넣고 실온에서 5분 동안 반응시켰다. PBS로 2회 세척하고 비특이적인 반응이 일어나는 것을 방지하기 위해서 3% BSA 용액을 넣고 4°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 항-NfCPB 단클론항체와 항-NfCPB-L 단클론항체(3% BSA 용액에 1:100 희석)를 각각 넣고 4°C에서 18시간 동안 반응 시켰다. PBS로 2회 세척한 뒤 anti-mouse antibody conjugated fluorescein isothiocyanate (FITC) (Sigma, USA) (3% BSA용액에 1:200 희석)를 넣고 4°C에서 2시간 동안 반응시켰다. PBS로 2회 세척한 뒤 슬라이드 글라스 위에 mounting solution (VECTOR, USA)을 분주하고 그 위에 커버글라스를 덮어 표본으로 만든 후 공초점현미경(confocal microscope) (Zeiss, Germany)으로 관찰하였다.

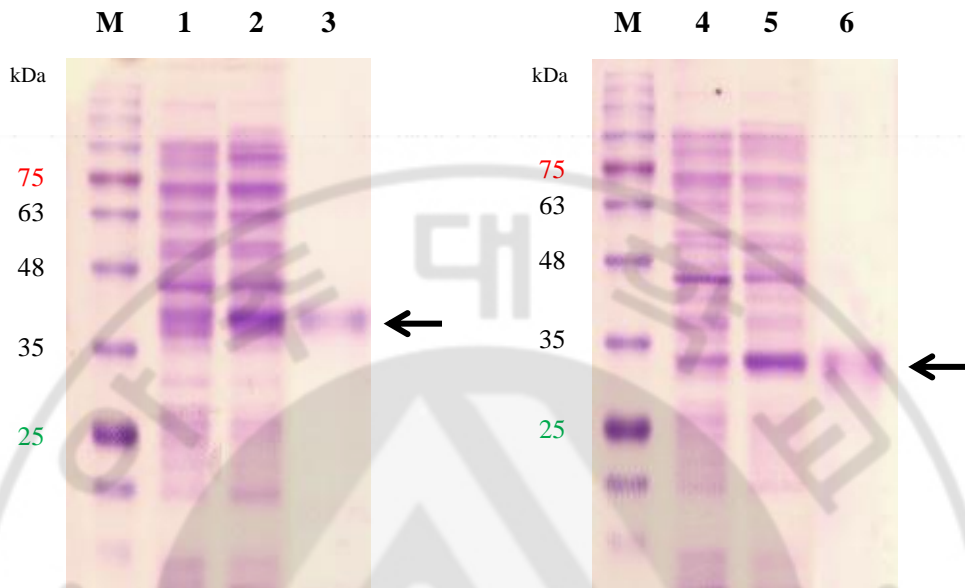
### III.결 과

#### 1) 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질 생산

*E. coli* 발현 시스템에서 발현시키고 정제한 재조합 NfCPB 단백질 및 NfCPB-L 단백질을 12% SDS-PAGE gel 상에서 확인하였다. 그 결과 rNfCPB 단백질의 크기는 38.4 kDa에서 그리고 rNfCPB-L 단백질의 크기는 34 kDa에서 반응대가 확인되었고 각각 10 mg/ml의 재조합 단백질을 얻어 항원으로 사용하였다(그림 2).

(A)

(B)



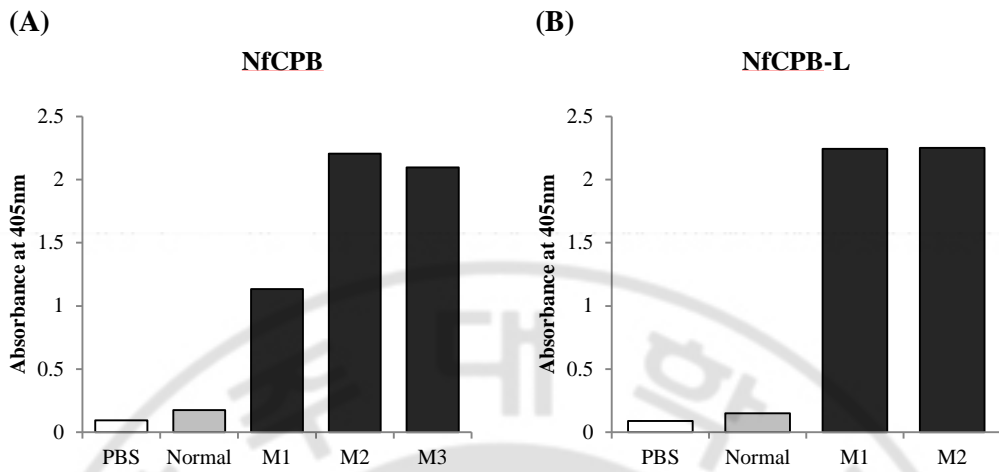
**Fig. 2. Expression and purification of recombinant NfCPB (A) and recombinant NfCPB-L proteins (B).** Lane 1, 4; IPTG-uninduced *E. coli* lysate, lane 2, 5; IPTG-induced *E. coli* lysate, lane 3; purified rNfCPB protein, lane 6; purified rNfCPB-L protein, M; protein size marker.



## 2) 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질에 대한 단클론항체의 생산

### A. 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 마우스 면역

정제된 rNfCPB와 rNfCPB-L 단백질을 BALB/c 마우스에 3번 면역한 후, 마우스의 혈청에서 ELISA법으로 면역역가를 확인하였다. rNfCPB 단백질을 면역한 마우스 3마리의 면역역가는 1.133~2.204 (ELISA OD값)로 항체가 충분히 형성되었음이 관찰되었고, rNfCPB-L 단백질을 면역한 마우스 2마리의 면역역가 역시 2.242~2.251 (ELISA OD값)로 항체가 충분히 형성된 것을 확인하였다 (그림3).

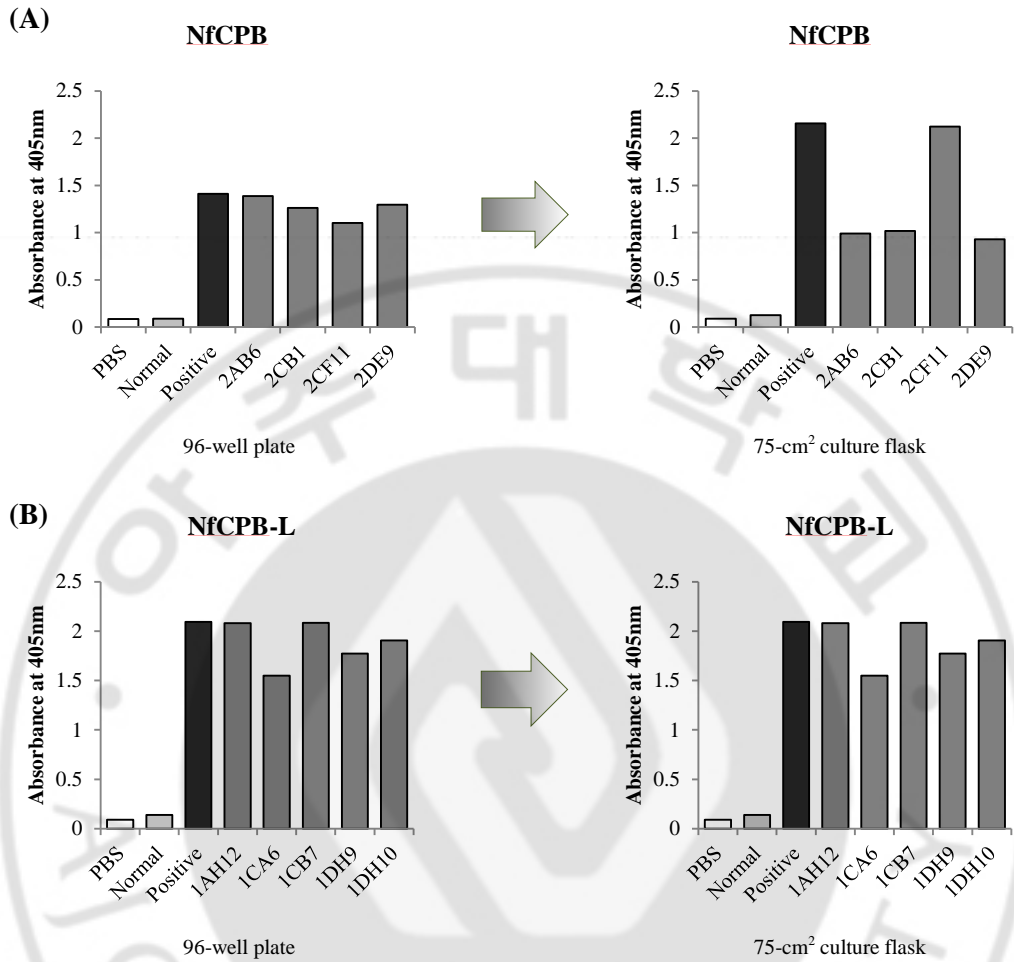


**Fig. 3. Antibody formation in mice sera after 3rd immunization with rNfCPB (A) and rNfCPB-L (B).** PBS and normal mouse serum (Normal) were used as negative controls, M; immunized mouse serum number.

## B. 잡종세포주에서 항-NfCPB 항체와 항-NfCPB-L 항체 분비확인

마우스의 비장세포와 F/0세포를 모아 96-well plate에서 세포융합기술을 시행하였다. 96-well plate에서 먼저 항체가 분비됨을 확인한 후 75-cm<sup>2</sup> culture flask로 계대배양 하였다. 결과적으로, 항-NfCPB 항체를 생산하는 4개의 잡종 세포주 2AB6(0.991), 2CB1(1.019), 2CF11(2.123), 2DE9(0.93)을 얻었다(ELISA OD값) (PBS; 0.089, 정상 마우스 혈청; 0.126, 면역혈청; 2.156).

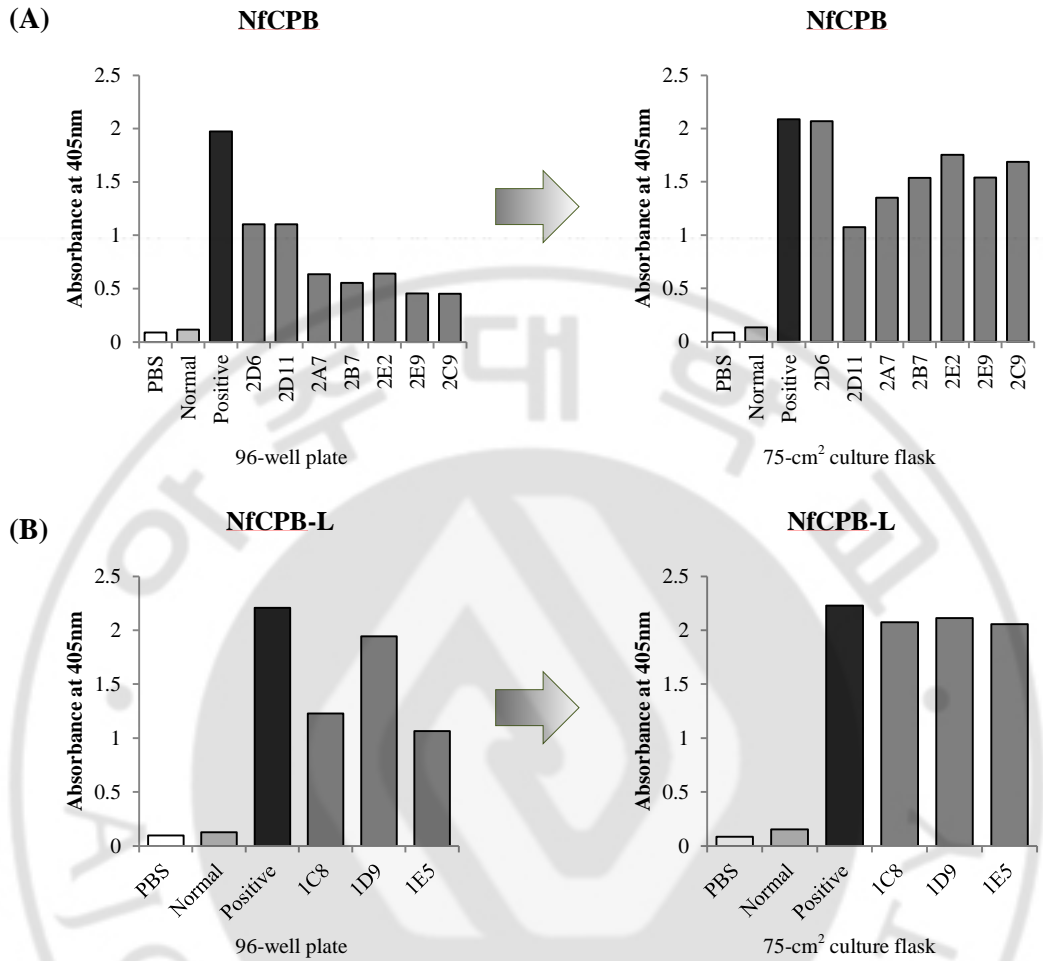
항-NfCPB-L항체를 생산하는 5개의 잡종세포주 1AH12(2.081), 1CA6 (1.549), 1CB7(2.085), 1DH9(1.772), 1DH10(1.907)을 얻었다(ELISA OD값) (PBS;0.091, 정상 마우스 혈청; 0.139, 면역혈청; 2.094) (그림4).



**Fig. 4. Selection of hybridoma cells from 96-well plate and subculture into 75-cm<sup>2</sup> culture flask.** Antibody production was examined by ELISA against rNfCPB (A) and rNfCPB-L (B) protein. PBS and normal mouse serum were used as negative controls; immunized mouse serum was used as positive control.

### C. 단클론세포주에서 항-NfCPB 항체와 항-NfCPB-L 항체 분비확인

단클론세포주를 얻기 위하여 ELISA OD값이 높은 잡종세포주인 2CF11와 2DE9 (항-NfCPB) 그리고 1DH9와 1DH10 (항-NfCPB-L)을 선택하여 제한개수 희석법을 시행하였다. 항-NfCPB 항체를 생산하는 단클론세포주는 2CF11 세포주에서 2D6(2.068)와 2D11(1.075) 2개를 선택하였고(ELISA OD값), 2DE9 세포주에서는 2A7(1.35), 2B7(1.538), 2E2(1.755), 2E9(1.541) 및 2C9(1.689) 5개의 단클론세포주들을 얻었다(ELISA OD값) (PBS; 0.086, 정상 마우스 혈청; 0.134, 면역혈청; 2.086). 항-NfCPB-L 항체를 생산하는 단클론세포주는 1DH10 세포주에서 1C8(2.075)와 1D9(2.114) 2개, 1DH9에서는 1E5(2.056) 1개의 단클론세포주들을 얻었다(PBS; 0.086, 정상 마우스 혈청; 0.153, 면역혈청; 2.228) (그림5).



**Fig. 5. Selection of monoclones producing monoclonal antibodies from 96-well plate and subculture into 75-cm<sup>2</sup> culture flask.** Antibody production was examined by ELISA against rNfCPB (A) and rNfCPB-L (B) protein. PBS and normal mouse serum were used as negative controls; immunized mouse serum was used as positive control.

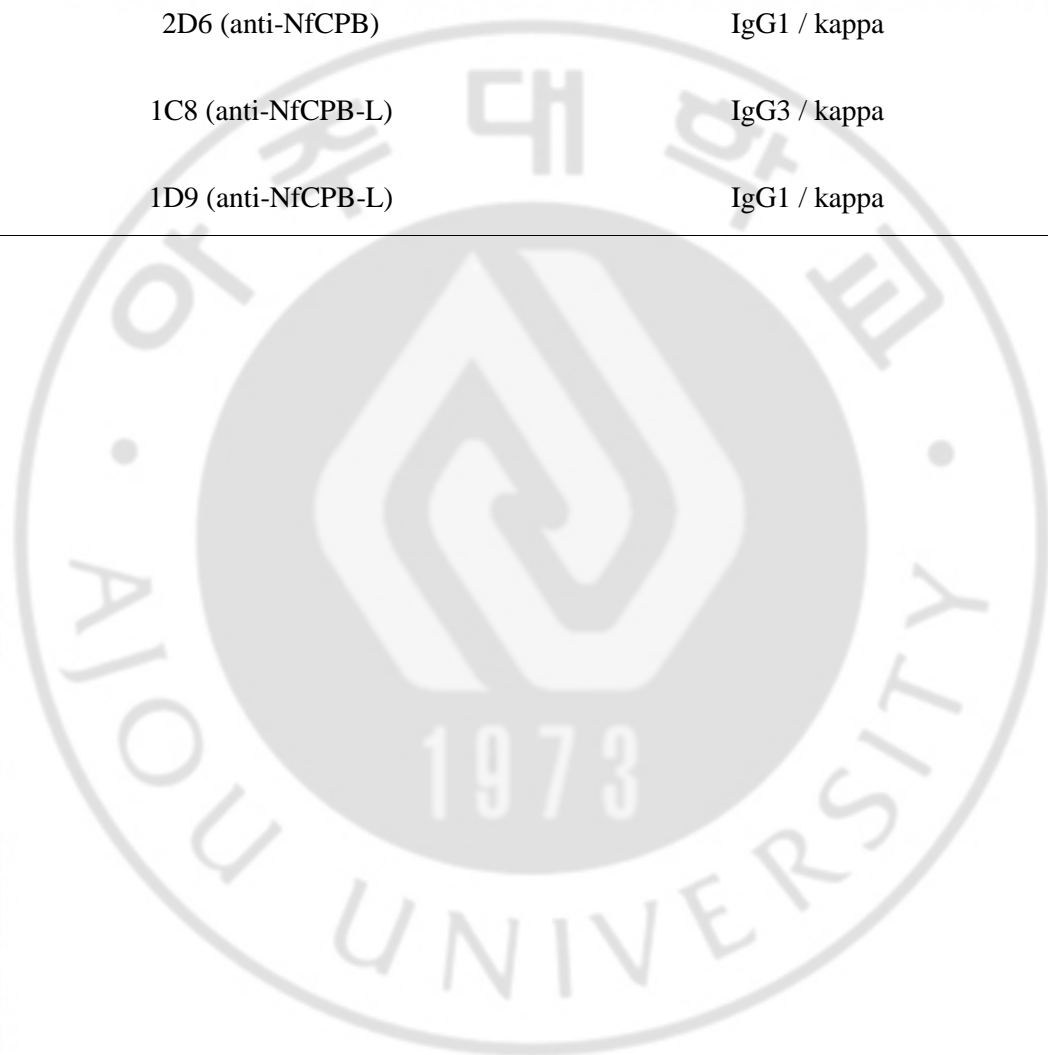
### 3) 항-NfCPB 단클론항체와 항-NfCPB-L 단클론항체의 isotype

Mouse monoclonal antibody isotyping kit를 이용하여 정제된 항체들의 isotype을 확인하였다. 항-NfCPB 단클론항체인 2C9와 2D6의 중쇄는 각각 IgG2a와 IgG1이고, 경쇄는 두 가지 항체 모두 kappa chain인 것을 확인하였다. 항-NfCPB-L 단클론항체인 1C8와 1D9의 중쇄는 각각 IgG3와 IgG1이고, 경쇄는 두 가지 항체 모두 kappa chain인 것을 확인하였다(표 1).



**Table 1. Isotype of monoclonal antibodies**

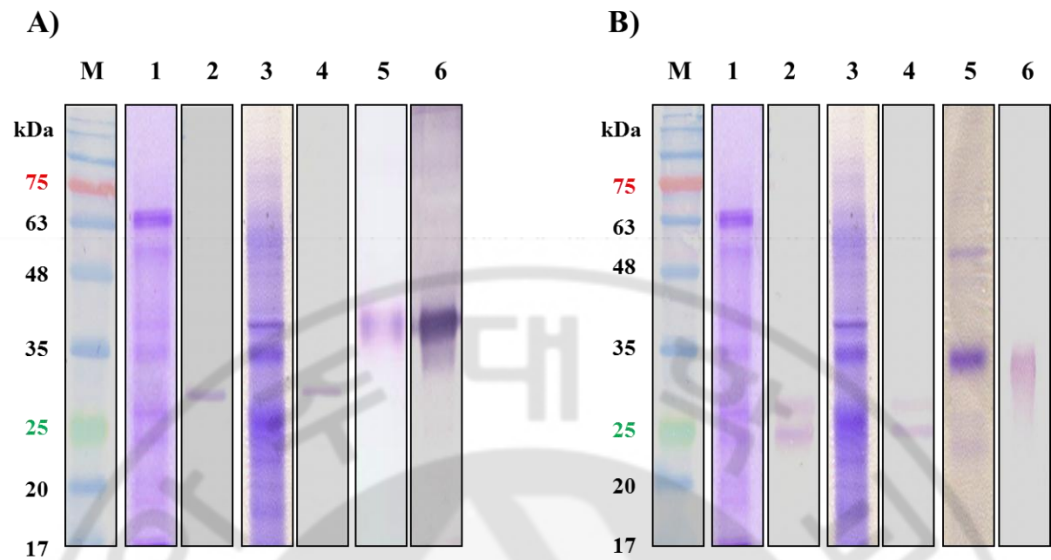
<b>Monoclonal antibodies</b>	<b>Isotype</b>
2C9 (anti-NfCPB)	IgG2a / kappa
2D6 (anti-NfCPB)	IgG1 / kappa
1C8 (anti-NfCPB-L)	IgG3 / kappa
1D9 (anti-NfCPB-L)	IgG1 / kappa





#### 4) 2C9(항-NfCPB)와 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체의 항원성

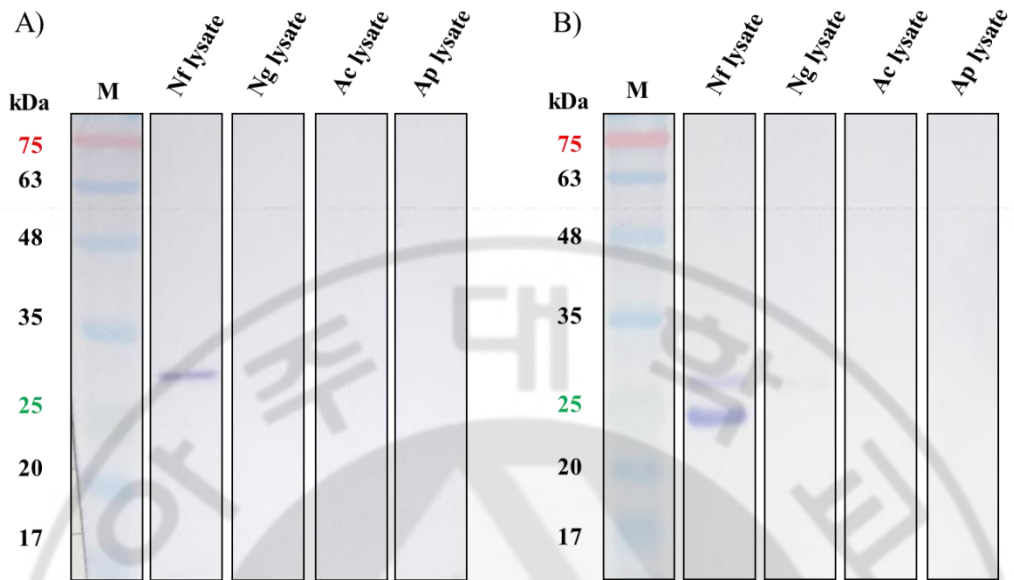
정제된 재조합 NfCPB와 NfCPB-L 단백질과 파울러자유아메바의 전체 세포추출물(Nf-lysate) 및 분비배설항원(Nf-ESP)을 12% SDS-PAGE gel에 적하하고 PVDF membrane으로 전기이적한 후 생산된 단클론항체들을 이용하여 western blot을 시행하였다. 그 결과 2C9 단클론항체는 파울러자유아메바의 전체세포추출물 및 분비배설항원에서는 약 28 kDa, rNfCPB 단백질에서 38.4 kDa 반응대를 보였고, 1C8 단클론항체는 파울러자유아메바의 전체세포추출물 및 분비배설 항원에서는 약 24 kDa, rNfCPB-L 단백질에서 34 kDa에서 반응대를 확인 할 수 있었다(그림 6).



**Fig. 6. SDS-PAGE band pattern and western blot analysis of Nf-lysate, Nf-ESP, rNfCPB and rNfCPB-L proteins.** A) 2C9 was reacted with Nf-lysate (lane 1, 2), Nf-ESP (lane 3, 4) and rNfCPB (lane 5, 6). B) 1C8 was reacted with Nf-lysate (lane 1, 2), Nf-ESP (lane 3, 4) and rNfCPB-L (lane 5, 6). M; protein size marker.

## 5) 2C9(항-NfCPB)와 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체의 종특이성

또한, 2C9(항-NfCPB)과 1C8(항-NfCPB-L)단클론항체가 파울러자유아메바에만 종특이적으로 반응하는지를 확인하기 위해서 파울러자유아메바, 비병원성 그루버자유아메바, 근연종인 카스텔란가시아메바와 대식가시아메바의 전체 세포추출물(Nf-lysate, Ng-lysate, Ac-lysate, Ap-lysate)을 12% SDS-PAGE gel에 적하하고 PVDF membrane으로 전기이적한 후 생산된 각 단클론항체들을 이용하여 western blot을 시행하였다. 그 결과 2C9(항-NfCPB)과 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체 모두 파울러자유아메바의 전체세포추출물에만 반응하는 것을 확인할 수 있었다(그림 7).

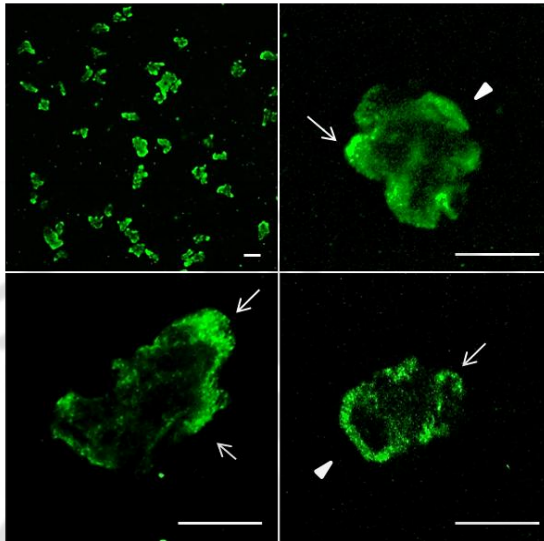


**Fig. 7. Immunoblot analysis of monoclonal antibodies 2C9 (A) and 1C8 (B) with lysates of various amoebae.** Nf lysate; *Naegleria fowleri* lysate, Ng lysate; *Naegleria gruberi* lysate, Ac lysate; *Acanthamoeba castellanii* lysate, Ap lysate; *A. polyphaga* lysate. M; protein size marker.

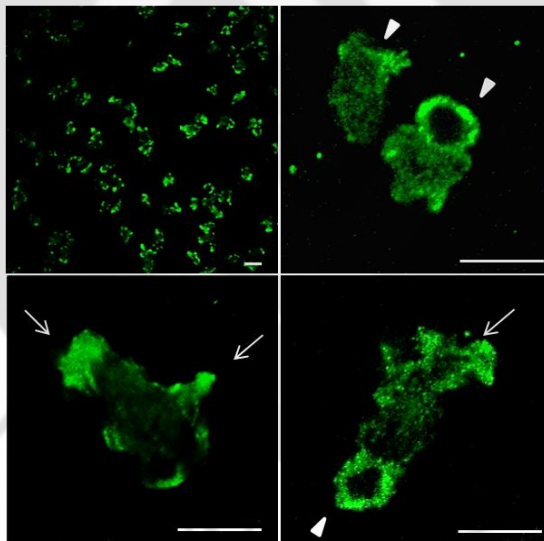
## 6) 2C9와 1C8 단클론항체의 세포내 발현분석

파울리자유아메바내에 분포하고 있는 NfCPB와 NfCPB-L의 발현위치를 확인하고자 2C9(항-NfCPB)과 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체를 이용하여 Immunocytochemistry assay를 시행하였다. 2C9(항-NfCPB) 단클론항체로 반응시킨 결과, NfCPB 단백질은 파울리자유아메바의 전체세포질내 전반적으로 발현하였는데 특히, 위족(psuedophodia)과 식세포작용시 중요한 인자인 food-cup구조에서 강하게 발현하였다. 1C8(항-NfCPB-L) 단클론항체를 반응시킨 결과도 2C9 단클론항체를 반응시킨 것과 유사하게 세포질 전체 특히, 위족과 food-cup 구조에서 강하게 발현 되었다(그림8).

A)



B)



**Fig. 8. Localization of NfCPB and NfCPB-L protein in the *N. fowleri* trophozoite by immunocytochemistry assay using 2C9 (A) and 1C8 (B) monoclonal antibody. Pseudopodia (arrow) and food-cup (arrow head) were predominant sites. scale bar; 10  $\mu$ m.**

## IV.고 찰

병원성 파울러자유아메바는 방송매체를 통해 뇌먹는 아메바(Brain-eating amoeba)로 소개되고 있으며(Zaheer, 2013), 한국 질병관리본부에서는 대한민국도 지구온난화로 인하여 더 이상 파울러자유아메바의 안전지대가 아니라고 하였다. 외국의 경우 파울러자유아메바는 토양, 습지, 강, 연못 등에서 서식하는데 염소를 처리한 수영장이나 물온도가 높은 온천에서도 분리배양된다(Sheehan et al., 2003).

파울러자유아메바의 병인기전은 크게 접촉성 병인기전과 비접촉성 병인기전이 있으며 이러한 병인기전을 통해 숙주세포를 죽음에 이르게 한다(Kim et al., 2008). Cysteine protease 계열의 단백질인 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질은 파울러자유아메바의 감염시 숙주조직침투, 숙주의 면역체계회피, 영양분흡수와 관련있다고 보고되어(Lee et al., 2014), 병인기작에 대한 연구가 이루어지고있다.

본 연구에서는 세포융합기술을 이용하여 cathepsin B (NfCPB)와 cathepsin B-Like (NfCPB-L) 단백질에 대한 단클론항체를 생산하고, 이들 항체를 이용하여 NfCPB와 NfCPB-L 단백질을 면역학적 특성을 규명 하고자 하였다.

먼저 파울러자유아메바의 NfCPB와 NfCPB-L 단백질에 대한 단클론항체를 생산하기 위해서 앞선 보고에 따라 *nfcpb*와 *nfcpb-L*를 클로닝하여 재조합 단백질을 생산하였으며(Lee et al., 2014), 이 재조합단백질을 마우스에 3번 면역 후 높은 항체형성을 확인하였고, 세포융합시행 4일전에 꼬리정맥으로 항원을 한번 더 boosting 하는 면역스케줄을 본 실험에 모두 시행하였다. 세포융합 기술을 이용하여 마우스 비장세포와 myeloma 세포주인 F/0 세포들을 세포융합시켜 항-NfCPB 항체와 항-NfCPB-L 항체를 분비하는 잡종세포주를 얻을 수 있었다. 그 중에서 항체가 높은 항-NfCPB 잡종세포주(2CF11와 2DE9)와 항-NfCPB-L 잡종세포주(1DH9와 1DH10)를 각각 2개씩 선택하였고, 단클론세포주

를 얻기 위하여 제한개수희석법을 시행한 결과, 7종류의 항-NfCPB 단클론 세포주(2D6, 2D11, 2A7, 2B7, 2E2, 2E9와 2C9)를 얻었으며 3종류의 항-NfCPB-L 단클론세포주(1C8, 1D9와 1E5)를 얻었다. 그 중 항체가가 높은 2C9와 2D6 항-NfCPB 단클론세포주와 1C8와 1D9 항-NfCPB-L 단클론세포주를 선택하여 마우스에서 복수를 만들었다. 이를 protein A column으로 정제하여 단클론 항체를 대량으로 얻었으며, 각각의 단클론항체들의 isotype은 IgG2, IgG1, IgG3 및 IgG1로 다양한 isotype의 단클론항체들이 생산됨을 확인하였다.

이 중에서 가장 많이 생산된 2C9(항-NfCPB)와 1C8(항-NfCPB-L) 단클론 항체를 선택하여 이후 실험을 진행하였는데, 항원-항체 반응을 보기위해 western blotting과 ELISA를 시행하였다. 먼저 Western blotting 결과, 2C9 단클론항체는 *N. fowleri*의 전체추출물(Nf-lysate) 및 분비배설항원(Nf-ESP)과 약 28 kDa에서, 재조합 NfCPB 단백질과는 약 38 kDa에서 반응대를 보였고, 1C8 단클론항체도 *N. fowleri*의 전체추출물 및 분비배설항원과 약 24 kDa에서, 재조합 NfCPB-L 단백질에서 약 34 kDa에서 반응대를 보였다. *N. fowleri*의 전체추출물 및 분비배설항원에 존재하는 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질의 크기가 재조합 NfCPB 와 NfCPB-L 단백질의 크기보다 작은 이유는 두 단백질은 단백질 분해 효소로서 전구체(precursor)를 가지고, 이 전구체의 아미노산 서열의 일부가 잘려나가는 과정 즉, 번역 후 변형(post-translation modification)을 거치면서 활성화된 단백질분해효소는 처음 만들어진 단백질보다 작은 크기의 단백질을 나타내기 때문이라 생각되는데(Cooper GM., 2000), NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 아미노산 서열분석을 통해, 실제로 active form의 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 크기는 각각 약 25 kDa과 24 kDa인것을 확인하였다.

과올러자유아메바의 다양한 항원들 즉, Nf-lysate (10 µg), Nf-ESP (10 µg), rNfCPB (0.1 µg)와 rNfCPB-L 단백질(0.1 µg)을 ELISA plate에 각각 코팅한 후 indirect ELISA를 시행결과, 2C9 단클론항체는 Nf-lysate, Nf-ESP 및 rNfCPB-L 단백질에서 반응하였고(0.501, 1.151, 0.491). (ELISA OD값) 특히, rNfCPB 단백질



(2.135) 에서는 강하게 반응하는 것을 확인하였다. 1C8 단클론항체는 Nf-lysate, Nf-ESP, rNfCPB 단백질 및 rNfCPB-L 단백질에서 모두 강하게 반응하였다(2.186, 2.233, 1.547 및 2.188). (ELISA OD값) 따라서 Western blot와 ELISA결과를 통해 2C9 항체와 1C8 항체는 파울러자유아메바의 항원들에 대한 반응경향이 비슷하였으며, 추가적으로 2C9 항체는 rNfCPB-L 단백질, 1C8 항체는 rNfCPB 단백질에 cross-reactivity가 있는 것을 확인하였다. 그러나 NfCPB 및 NfCPB-L 단백질의 아미노산서열을 비교하여 상동성(homology)을 분석한 결과 50.6% 상동성이 확인되었다.

한편, 2C9와 1C8 두 단클론항체가 다른 종들의 아메바의 전체세포추출물과 cross-reactivity가 있는지 확인하기 위하여 western blotting을 시행한 결과, 2C9 와 1C8 두 단클론항체는 비병원성인 *N. gruberi*와 근연종인 *A. castellanii*, *A. polyphaga*의 전체세포추출물에서는 반응하지 않았으며, 파울러자유아메바의 전체세포추출물에서만 반응하는 것을 확인하였다. 이를 통해 2C9 와 1C8 단클론항체는 파울러자유아메바의 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질에만 반응하는 종 특이적인 항체임을 확인하였다. 아울러 비병원성인 *N. gruberi*의 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질의 염기서열을 비교했을 때 각각 56%와 46%의 상동성을 보였고(Lee et al., 2014), 근연종인 *A. castellanii*와 *A. polyphaga*의 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질에 대한 상동성은 보이지 않았다.

파울러자유아메바 세포내에서 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질의 분포를 확인하고자 2C9과 1C8 단클론항체를 이용하여 immunocytochemistry assay를 시행하였다. 그 결과 NfCPB와 NfCPB-L 단백질은 파울러자유아메바의 전체세포질에 분포하고 특히, 식세포작용과 연관된 food-cup 구조와 아메바의 이동에 관여하는 위족에서 강하게 발현하는 것을 확인하였다. 이는 파울러자유아메바의 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질이 표적세포의 용해에 연관된 중요한 인자라고 사료된다.

결과적으로, 본 연구에서 얻은 단클론항체(2C9과 1C8)는 자유생활아메바들 사이에서 파울러자유아메바를 면역학적으로 동정하거나, NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 병리면역학적(immunopathology) 기능을 연구하는데 있어서 중요하게 사용될 것으로 생각된다.



## V. 결 론

본 연구는 원발성 아메바성 수막뇌염을 유발하는 파울러자유아메바의 비접촉 기작에 관여하는 cathepsin B와 cathepsin B-Like 단백질에 대한 단클론 항체를 생산하여 항원성과 세포내 발현양상을 관찰하였다. Western blot 결과에서 2C9 (항-NfCPB)와 1C8 (항-NfCPB-L) 단클론항체는 비병원성인 그루버 자유아메바, 근연종인 카스텔란 가시아메바와 대식가시아메바와 같은 다른 아메바의 전체추출물에서는 반응하지 않고, 파울러자유아메바의 전체추출물에서만 반응하는 중 특이적인 항체임을 확인하였다. 2C9와 1C8 단클론항체를 이용한 Immunocytochemistry assay결과, 아메바 세포질 전체에서 발현하였는데 특히, 아메바의 이동에 관여하는 위족과 식세포작용에 관여하는 food-cup 구조에서 강하게 발현하는 것을 확인하였다. 결과적으로, 2C9및 1C8 단클론항체는 다양한 자유생활아메바들 중에서 파울러자유아메바를 면역학적인 방법으로 동정하거나, 추후 연구에서 NfCPB와 NfCPB-L 단백질의 세포면역학적 기능을 관찰하는데 유용하게 사용될 것이라고 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. Carter RF: Primary amoebic meningo-encephalitis: clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J Pathol Bacteriol* 96: 1-25, 1968
2. Carter RF: Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J Pathol* 100: 217-244, 1970
3. Carter RF: Primary amoebic meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 66: 193-213, 1972
4. Cerva L: Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi* strain Vitek. *Folia Parasitol (Praha)* 18: 171-176, 1971
5. Chappell CL, Dresden MH: *Schistosoma mansoni*: proteinase activity of "hemoglobinase" from the digestive tract of adult worms. *Exp Parasitol* 61: 160-167, 1986
6. Cho MS, Jung SY, Park S, Kim KH, Kim HI, Sohn S, Kim HJ, Im KI, Shin HJ: Immunological characterizations of a cloned 13.1-kilodalton protein from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Clin Diagn Lab Immunol* 10: 954-959, 2003
7. Culbertson CG: The pathogenicity of soil amebas. *Annu Rev Microbiol* 25: 231-254, 1971
8. De Jonckheere JF: Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect Genet Evol* 11: 1520-1528, 2011

9. Fowler M, Carter RF: Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br Med J* 2: 740-742, 1965
10. John DT: Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Annu Rev Microbiol* 36: 101-123, 1982
11. Kang SY, Song KJ, Jeong SR, Kim JH, Park S, Kim K, Kwon MH, Shin HJ: Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 12: 873-876, 2005
12. Keene WE, Pettitt MG, Allen S, McKerrow JH: The major neutral proteinase of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 163: 536-549, 1986
13. Kim JH, Kim D, Shin HJ: Contact-independent cell death of human microglial cells due to pathogenic *Naegleria fowleri* trophozoites. *Korean J Parasitol* 46: 217-221, 2008
14. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970
15. Lakhundi S, Khan NA, Siddiqui R: The effect of environmental and physiological conditions on excystation of *Acanthamoeba castellanii* belonging to the T4 genotype. *Parasitol Res* 113: 2809-2816, 2014
16. Lee J, Kim JH, Sohn HJ, Yang HJ, Na BK, Chwae YJ, Park S, Kim K, Shin HJ: Novel cathepsin B and cathepsin B-like cysteine protease of *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins and their biochemical properties. *Parasitol Res* 113: 2765-2776, 2014

17. Long Y, Cao B, Yu L, Tukayo M, Feng C, Wang Y, Luo D: *Angiostrongylus cantonensis* cathepsin B-like protease (Ac-cathB-1) is involved in host gut penetration. *Parasite* 22: 37, 2015
18. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK: *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev Infect Dis* 12: 490-513, 1990
19. Marciano-Cabral F, Cabral GA: The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* 51: 243-259, 2007
20. Martinez AJ, Visvesvara GS: Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol* 7: 583-598, 1997
21. Na BK, Kang JM, Sohn WM: CsCF-6, a novel cathepsin F-like cysteine protease for nutrient uptake of *Clonorchis sinensis*. *Int J Parasitol* 38: 493-502, 2008
22. Na BK, Kim SH, Lee EG, Kim TS, Bae YA, Kang I, Yu JR, Sohn WM, Cho SY, Kong Y: Critical roles for excretory-secretory cysteine proteases during tissue invasion of *Paragonimus westermani* newly excysted metacercariae. *Cell Microbiol* 8: 1034-1046, 2006
23. Schuster FL, Visvesvara GS: Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int J Parasitol* 34: 1001-1027, 2004
24. Sheehan KB, Fagg JA, Ferris MJ, Henson JM: PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl Environ Microbiol* 69: 5914-5918, 2003

25. Shin HJ, Im KI: Pathogenic free-living amoebae in Korea. *Korean J Parasitol* 42: 93-119, 2004
26. Sohn HJ, Kim JH, Shin MH, Song KJ, Shin HJ: The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* 106: 917-924, 2010
27. Song KJ, Song KH, Kim JH, Sohn HJ, Lee YJ, Park CE, Shin HJ: Heat shock protein 70 of *Naegleria fowleri* is important factor for proliferation and in vitro cytotoxicity. *Parasitol Res* 103: 313-317, 2008
28. Su MY, Lee MS, Shyu LY, Lin WC, Hsiao PC, Wang CP, Ji DD, Chen KM, Lai SC: A fatal case of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis in Taiwan. *Korean J Parasitol* 51: 203-206, 2013
29. Zaheer R: *Naegleria fowleri*-the brain-eating amoeba. *J Pak Med Assoc* 63: 1456, 2013
30. Cooper GM, *The Cell: A Molecular Approach*. 2nd ed., Sinauer Associates Sunderland (MA), 2000

- ABSTRACT -

## **Production and characterization of monoclonal antibodies against cathepsin B and cathepsin B-Like proteins of *Naegleria fowleri***

Gi-Sang Seong

*Department of Microbiology, Ajou University*

(Supervised by Ho-Joon Shin, Ph.D)

*Naegleria fowleri* causes a fatal primary amoebic meningoencephalitis (PAM) in human and experimental animals. Cathepsin B (NfCPB) and cathepsin B-like (NfCPB-L) gene of *N. fowleri* consist of 1,038bp of DNA (345 amino acid) and 939bp of DNA (313 amino acid), and molecular weights of recombinant proteins are 38.4 and 34 kDa, respectively. In the previous study, rNfCPB and rNfCPB-L refolding protein play important roles in host tissue invasion, immune evasion and nutrient uptake. In this study, we produced anti-NfCPB and anti-NfCPB-L monoclonal antibody (rNfCPB-McAb and rNfCPB-L-McAb) using the cell fusion technique and observed the immunological characteristics. Seven hybridoma cells secreting rNfCPB-McAb (2D6, 2D11, 2A7, 2B7, 2E2, 2E9, 2C9) and three hybridoma cells secreting rNfCPB-L-McAb (1E5, 1C8, 1D9) were produced. Among them, 2C9 (a cell line producing rNfCPB-McAb) and 1C8 (a cell line producing rNfCPB-L-McAb) which showed high antibody titre were selected. By western blotting, 2C9 McAb was reacted with *N. fowleri* lysate and Nf-ESP or rNfCPB protein which showed about 28 kDa or 38.4 kDa of band pattern, respectively. 1C8 monoclonal antibody was reacted with *N. fowleri* lysate and Nf-ESP or rNfCPB-L protein which showed 24 kDa or 34 kDa of band pattern. 2C9 and 1C8 monoclonal antibodies were not reacted with another amoebic lysates such as *N. gruberi*, *Acanthamoeba castellanii*, *A. polyphaga* in western blot analysis. In the results of the immuno-



cytochemistry analysis, NfCPB and NfCPB-L protein were mainly detected in cytoplasm of *N. fowleri* trophozoite especially, pseudopodia and food-cup. These results suggested that monoclonal antibodies against rNfCPB and rNfCPB-L may be useful for the further immunological study.

---

Keyword: *Naegleria fowleri*, Monoclonal antibody, Cathepsin B protein, Cathepsin B-Like protein

