



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](#)

의학 석사학위 논문

항-Nfa1 다클론항체가 병원성
*Naegleria fowleri*의 증식 및
세포독성에 미치는 영향

아주대학교 대학원

의학과

이상철

항-Nfa1 다클론항체가 병원성
*Naegleria fowleri*의 증식 및
세포독성에 미치는 영향

지도교수 신 호 준

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2004년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 상 철

이상철의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 신 호 준 인

심 사 위 원 임 경 일 인

심 사 위 원 박 선 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2003년 12월 19일

항-Nfa1 다클론 항체가 병원성 *Naegleria fowleri*의 증식 및 세포독성에 미치는 영향

목적: 자유생활아메바 (genus *Naegleria*) 중 *N. fowleri*는 토양과 담수에서 자유생활을 하는 아메바로써 자연환경에서는 세균들을 포식하며, 인체 또는 실험동물들에서 원발성 아메바성 수막뇌염 (primary amoebic meningoencephalitis)을 유발하는 것으로 알려져 있다. *N. fowleri*의 병원성 관련 유전자 탐색의 일환으로 본 연구실에서는 *N. fowleri*에 대한 감염혈청 및 면역혈청을 생산하여 *N. fowleri*의 cDNA로부터 immunoscreening을 통해 병원성 및 항원성과 관련이 있을 것으로 사료되며 특히, 위족 (pseudopodia)에 특이성을 갖는 유전자 *nfa1*을 클로닝을 해 놓았다. 본 연구의 목적은 *N. fowleri*에서 클로닝된 *nfa1*유전자가 병원성 관련 유전자의 하나임을 입증하기 위해, 항-Nfa1 항체가 *N. fowleri*의 증식과 in vitro 세포 독성에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

재료 및 방법: *N. fowleri*에서 클로닝된 *nfa1*유전자로부터 재조합 단백질인 Nfa1을 얻은 다음, 마우스에 면역시켜 Nfa1에 대한 다클론 항체를 생산하여 면역효소흡착법 (ELISA)으로 그 역가를 측정하였으며 또한, western blotting을 통해 항원반응성을 검정하였다. 배양중인 *N. fowleri* 영양형에 항-Nfa1 항체를 처리함으로써 아메바 성장률의 변동을 항체의 농도 및 배양시간별로 관찰하였다. 또한, 표적세포로 사용된 CHO세포들에 대한 *N. fowleri*의 세포 독성에 있어서 항-Nfa1 다클론 항체를 처리함으로써 세포독성의 변화를 항체의 농도별 및 배양시간별로 관찰하였다.

결과: 병원성 *N. fowleri*로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자를 발현시켜 약 17 kDa의 fusion된 재조합 Nfa1 단백질을 다량으로 생산하였으며, enterokinase로 절단하여 13.1 kDa의 순수한 재조합 Nfa1 단백질을 얻었다. 이를 이용하여 얻어진 항-Nfa1 항체는 13.1 kDa의 항원대를 보여주었다. *N. fowleri*의 배양에 항-Nfa1 항

체를 투여할 경우, *N. fowleri*의 증식률은 현저히 감소함이 관찰되었으며 그런 현상은 항체의 희석농도 즉, 투여량에 의존적이었다. *N. fowleri*의 표적세포에 대해 세포독성을 나타냄에 있어서 항-Nfa1 항체를 투여할 경우, *N. fowleri*의 CHO세포에 대한 세포독성은 22% ~ 37%로 크게 감소되었으며 그런 현상은 항체의 투여량과 배양 시간에 의존적이었다.

결론: 결과들을 종합하면, 항-Nfa1 항체가 *N. fowleri*의 증식률과 *in vitro* 세포독성을 크게 감소시키는데 영향을 줌으로써, *N. fowleri*로부터 새로이 클로닝된 *nfa1* 유전자가 아메바의 병원성에도 관련이 있다는 것을 보여주는 결과라 하겠으며, 이런 *nfa1* 유전자는 자유생활아메바의 병원 연구에 중요한 대상 유전자로써 앞으로 보다 구체적인 연구가 필요하다고 생각되어진다.

핵심되는 말: 자유생활아메바, *Naegleria fowleri*, 원발성 아메바성 수막뇌염, 유전자 클로닝, 유전자 발현, 재조합 단백질, 다클론항체, 세포독성

차 례

국문요약	1
차례	2
그림차례	3
표차례	4
I. 서론	6
II. 재료 및 방법	9
A. <i>Naegleria fowleri</i> 의 배양 및 세포추출액 (lysates)의 제조	9
B. CHO 세포 배양	9
C. 클론닝된 <i>nfa1</i> 유전자의 발현 및 재조합 단백질의 생산	9
D. Nfa1 단백질에 대한 다클론항체의 생산	10
E. 다클론항체가 <i>N. fowleri</i> 의 성장률에 미치는 영향 관찰	10
F. 다클론항체가 CHO 세포에 대한 <i>N. fowleri</i> 의 세포독성에 미치는 영향 관찰	11
III. 결과	12
A. <i>nfa1</i> 유전자의 재조합 Nfa1 단백질과 항-Nfa1 다클론항체의 항원성 ...	12
B. 항-Nfa1 항체에 의한 <i>N. fowleri</i> 의 성장률 변화	14
C. 항-Nfa1 항체가 <i>N. fowleri</i> 의 CHO 세포에 대한 세포독성에 미치는 영향	16
IV. 고찰	25
V. 결론	28
참고문헌	29
영문요약	34

그림 차례

Fig. 1. Band patterns of SDS-PAGE of a recombinant fusion protein expressed from the <i>nfa1</i> gene and a recombinant protein digested with enterokinase, and Western blotting with an anti-Nfa1 polyclonal antibody and healthy mouse serum	12
Fig. 2. Antibody titers of anti-Nfa1 polyclonal sera (1:200 dilution) obtained from Nfa1-immunized mice	13
Fig. 3. Graphic view for proliferation of <i>Naegleria fowleri</i> trophozoites cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody	15
Fig. 4. Microscopic findings of CHO cells cultured in EMEM, cocultured with <i>Naegleria fowleri</i> trophozoites, and <i>N. fowleri</i> with an anti-Nfa1 at 48 hrs	16
Fig. 5. Visualizing cytotoxicity of <i>N. fowleri</i> trophozoites against CHO cells by LDH release assay	17
Fig. 6. Graphic view for cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:200 dilution)	19
Fig. 7. Graphic view for cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:100 dilution)	21
Fig. 8. Graphic view for cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:50 dilution)	23
Fig. 9. Graphic views for decreasing effect of an anti-Nfa1 polyclonal antibody in the cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells	24

표 차 례

Table 1. Proliferation of <i>Naegleria fowleri</i> trophozoites cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody	14
Table 2. Cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:200 dilution)	18
Table 3. Cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:100 dilution)	20
Table 4. Cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells cocultured with an anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:50 dilution)	22
Table 5. Decreasing effect of an anti-Nfa1 antibody in the cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells	24
Table 6. Cytotoxicity of <i>Naegleria fowleri</i> against CHO cells cocultured with healthy and immunized mice sera (1:100 dilution)	27

I. 서 론

자유생활아메바는 토양과 담수에서 자유생활을 하는 아메바로써 자유 환경에서는 세균들을 포식하며, 자유아메바 (genus *Naegleria*) 중 *N. fowleri*는 인체, 마우스 및 다른 실험동물들에서 원발성 아메바성 수막뇌염 (primary amoebic meningoencephalitis; PAME)을 유발하는 것으로 알려져 있다.^{1,3} 또한, 가시아메바 (genus *Acanthamoeba*) 중 *A. culbertsoni*는 실험동물과 인체에서 만성적인 육아종성 아메바성 뇌염 (granulomatous amoebic encephalitis; GAE)을 유발하였다고 보고되었으며, *A. polyphaga* 등은 아메바성 결막염 (amoebic keratitis)을 유발하는데 특히, 콘택트 렌즈 착용자에서 그 발병률이 높아 사회적으로 문제가 되고 있기도 하다.^{3,4}

병원성과 관련하여 Marciano-Cabral^{5,6}은 숙주의 면역 반응계에 아메바가 침범하는 기전에 대하여는 확실하지는 않지만 병원양상 (pathogen form)에 있어서 어떤 결정적인 변화가 있을 것이라고 예견하였다. 그러나 아직까지는 어떤 단백질이 병원 (pathogen)이 될 수 있는 능력 (capacity)을 갖고 있는지에 대하여는 명확하게 밝혀지지 못하였다. 아메바의 병원성 (pathogenicity)과 관련해서는 4개의 단백질 즉, phospholipase, neuaminidase, cytopathogenic material 및 세포막과 연관되어 있는 틈형성 단백질 (pore-forming protein)이 알려져 있는데 정확한 역할은 잘 알려져 있지 않으며 그나마 비병원성 아메바들에게서도 발견되기도 하였다.⁷⁻¹⁰ Lowrey 및 MaLaughlin¹¹은 아메바성 수막뇌염을 일으키는 전 과정에서 이 아메바의 병원성을 밝히는 확실한 기전을 모르지만 숙주세포를 빠르게 파괴시킬 수 있는 능력이 있음을 볼 때 수막뇌염을 일으키기까지 전 과정에서 용해과정 (cytolytic process)이 이루어질 것이라고 하였다. 또한 동물세포에 비특이적 세포용해 현상이 일어난다고 보고하였는데, 동물세포에 손상을 주는 용해물질 (cytolytic substance)이 주로 세포막의 구성 성분을 분해시키는 효소일 것이라는 생각에서 이 단백질분해 효소들에 대한 연구가 진행되어 왔다.⁵

최근에서는 중체에서 분비되는 단백질분해 효소가 숙주 내로의 침투 및 감염

유발에 직접적인 관련이 있으며, 숙주에 대한 중체 자체의 방어, 영양공급 및 생활사에도 영향을 주는 것으로 인식되었다.¹² 여러 종류의 단백질 분해효소 중, 시스테인계 단백분해효소 (cysteine proteinase)는 기생성 원충류에서 특이할 만한 것으로 기생충이 숙주 내로 침범 시 숙주단백질을 소화시켜 기생충이 쉽게 숙주 내로 침범할 수 있도록 도와주며, 숙주의 면역글로블린을 소화하는 능력이 있어서 숙주의 면역반응에 크게 관여하였다고 하였다.¹³ *N. fowleri*의 시스테인계 단백질 분해효소는 표적세포의 세포막에 손상을 주며, 비병원성인 *N. gruberi*의 배양액과 세포추출물은 세포독성이 없다고 한 보고는 단백질 분해효소가 병원성에 관여할 것이라는 것을 추측케 하였다.¹⁴

또한, 아메바를 액체배지 내에서 무균적으로 오랫동안 배양하면 병원성이 약화되며, 그것을 다시 마우스에 감염시킨 후 뇌 조직으로부터 분리 배양 (mouse brain passage)을 반복하거나 세균 (bacteria)을 혼합 배양하면 병원성이 회복 (또는 증가)된다고 보고되고 있는데, Hu 등¹⁵은 2차원 전기영동법 (two-dimensional electrophoresis)으로 병원성이 회복된 아메바와 병원성이 계대 배양으로 약화된 아메바간의 단백질 합성 양상 (protein synthesis patterns)을 분석하여 그 차이를 인정하였다.

다른 한편으로 자유생활 아메바 중 *N. fowleri*의 병원성 관련 유전자 탐색은 Michigan 대학에 있는 Hu 등¹⁶에 의해 시도되고 있는데 병원성이 강한 아메바와 병원성이 약한 아메바에서 상이하게 발현되는 mRNA를 찾아내어 유전자를 밝혔으며 세린 (serine)계열의 단백질이라고 보고한 바 있다. 그 후 Wessberg 등¹⁷은 *N. fowleri*로부터 해당 작용 (glycolysis)에 관여하는 효소의 일종인 pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase의 유전자를 이미 다른 생물에서 알려진 표식자 (primer)를 이용하여 PCR 방법으로 클로닝하고 발현 정도만 관찰한 바 있다. 한편, Huang 과 Bateman¹⁸은 아메바성 결막염의 원인 원충의 하나로 알려진 *A. catellanii*로부터 TATA-결합 단백질 (TBP)의 단백질 전사 활성화제 (transcription activator)의 하나인 TBT promoter binding factor의 유전자를 클로닝하고 발현 정도를 관찰하고 하였다. 한편, 본 지원자의 연구실에서는 *N.*

*fowleri*에 대한 감염혈청 및 면역혈청을 생산하여 *N. fowleri*의 cDNA로부터 immunoscreening을 통해 병원성 및 항원성과 관련이 있을 것으로 사료되며 특히, 위족 (pseudopodia)에 특이성을 갖는 유전자 *nfal*을 클로닝을 해 놓았다.¹⁹

병원성 아메바에 대한 in vitro 세포독성 (cytotoxicity)연구에 대하여 Haggerty 및 John²⁰은 *N. fowleri* 영양형에 항혈청을 처리했을 때 응집효과가 있다고 보고하였다. Curson 및 Brown²¹은 자유생활아메바의 병원성 유무를 Vero세포를 사용하여 관찰하였으며, Marciano-Cabral 등⁵은 rat neuroblastoma (B-103) 세포가 *Naegleria* spp.에 의해 가장 민감한 세포독성 영향이 있었다고 하였다. Ravdin 등²²⁻²⁴은 CHO (chinese hamster ovary) 세포를 표적세포로 사용하여 *E. histolytica*의 세포독성 강도를 연구하였으며, Cline 등²⁵은 *N. fowleri*를 rat neuroblastoma (B-103) 세포, Vero 세포, HeLa 세포, HEp2 (human larynx epithelium) 세포 및 mouse fibroblasts (L929)와 작용시켜 그 운동성을 관찰하였다. Shin 등²⁶은 한국사람의 콘택트 렌즈 착용자로부터 분리해낸 *Acanthamoeba* spp.가 CHO세포를 표적세포로 사용하여 세포독성이 강하다는 것을 확인하였다.

본 연구의 목적은 *N. fowleri*의 위족 (pseudopodia) 활동과 연관되어 새로이 클로닝된 *nfal* 유전자가 아메바의 병원성과 관련이 있을 것으로 생각되어, *nfal* 유전자로부터 재조합 단백질인 Nfal을 얻은 다음, Nfal에 대한 다클론 항체를 생산하고, 배양중인 *N. fowleri* 영양형에 항-Nfal 다클론 항체를 처리하여 아메바 성장률의 변동을 관찰하고자 하였으며 또한, *N. fowleri* 처리함으로써 CHO세포들에 대한 세포 독성의 변화를 관찰하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. *Naegleria fowleri*의 배양 및 세포추출액 (lysates)의 제조

병원성이 강한 것으로 알려진 *N. fowleri* (Carter Nf69 균주; ATCC No.30215)를 Nelson's 배지²⁷를 이용하여 37℃ 항온기에서 무균적으로 배양하였다. 배양된 영양형들 (trophozoites)을 3분간 1,500×g로 원심분리하고, 그 침사액을 Earle's balanced salt solution (EBSS)으로 두 번 세척한 후, 다시 원심분리하였다. 모아진 침사액을 인산염 완충액으로 부유시켜 3번 얼림-녹임 (freeze-thawing) 과정을 통해 세포막을 파괴하고 20,000×g에서 2시간동안 원심분리 하였다. 수용성 세포추출액 (soluble lysates)만을 모은 후, Bradford assay²⁸를 이용하여 단백질 농도를 측정 한 후 냉동고에 보관하여 실험에 이용하였다.

B. CHO 세포 배양

CHO 세포를 complete EMEM으로 monolayer로 될 때까지 배양한 다음에, 배양액을 제거하고 trypsin-EDTA 용액을 3 ml 넣어준 후 37℃ 항온기에 2분 동안 두어서 세포를 떼어내고, incomplete EMEM으로 3번을 세척하여 15 ml tube에 모았다. 1,000 rpm으로 3분 동안 원심침전 후 모아진 CHO 세포를 96-well plate에 각 well (4×10^4 개의 CHO 세포/100 μ l)에 넣고 24시간 37℃로 배양한 후, monolayer로 형성된 것을 현미경으로 확인하였다.

C. 클론된 *nfa1* 유전자의 발현 및 제조합 단백질의 생산

*N. fowleri*로부터 확보된 클론된 유전자 (*nfa1*)를 PCR-T7/NT TOPO 발현 벡터(expression vector; Invitrogen, Grohinger, Netherlands)를 이용하여 100 μ g/ml의 ampicillin과 34 μ g/ml의 chloramphenicol을 함유하는 LB (Luria-Bertani) 배지

에 37℃ 조건으로 배양하여 600 nm에서 흡광도가 0.5~0.8에 도달하게 한 후, 그때 1 mM의 IPTG를 첨가하였다. 다시 4시간동안 배양한 후, 원심분리 (6,000×g, 15 분)하여 세포들을 수확하였다. 발현된 재조합 단백질 (Nfa1)은 제조자의 지침서 (manufacturer's instruction)에 따라 Xpress™ System Protein Purification kit (Invitrogen)를 이용하여 정제되었다. 정제된 단백질의 크기는 SDS-PAGE를 통해 확인하였다.

D. Nfa1 단백질에 대한 다클론항체의 생산

재조합 Nfa1 단백질 (50 µg/mouse)을 동량의 Freund's complete adjuvant와 혼합하여BALB/c 마우스 (대전 KIST로부터 구입)의 복강 내로 주입하였다. 재조합 Nfa1 단백질과 동량의 Freund's incomplete adjuvant를 혼합하여 4주 동안 2주 간격으로 2회 주사하였다. 혈액을 채취하기 3~4일전 정맥내로 항원을 주사하여 면역성을 높인 후, 채취한 혈액을 4℃에서 30분간 2,500×g에서 원심 분리하여 얻은 혈청을 EBSS로 희석하여 실험에 이용하였다. 얻어진 항-Nfa1 항체는 면역효소흡착법 (ELISA)으로 역가를 측정하였으며, 기존의 방법에 따라 western blotting을 통해 항원성을 검정하였다.²⁹

E. 다클론항체가 *N. fowleri*의 성장률에 미치는 영향 관찰

생산된 항-Nfa1 항체가 Nfa1 단백질에 대해 만들어 졌다면 Nfa1 단백질이 아메바의 위족 활동과 연관이 있다는 보고에 따라, *N. fowleri*의 위족 활동에 영향을 줄 것으로 기대되어 *N. fowleri*의 성장률에 항-Nfa1 항체가 어떠한 영향을 주는가를 관찰하고자 하였다. 배양되고 있는 *N. fowleri* 영양형 (1×10^4 /1 ml)에 항-Nfa1 항체를 적정 희석하여 20 µl씩 첨가한 후 24시간 및 48시간에 영양형의 숫자를 측정하였다. 대조군으로는 동량의 PBS 완충액 (pH 7.4)을 넣어 주었다.

F. 다클론항체가 CHO 세포에 대한 *N. fowleri*의 세포독성에 미치는 영향 관찰

*N. fowleri*가 CHO 세포에 대해 세포독성이 있다고 알려져 있는데, 본 실험에서는 항-Nfa1 항체가 CHO 세포에 대한 *N. fowleri*의 세포독성에 미치는 영향을 보고자하였다. 96-well culture plate를 이용하여 CHO 세포를 EMEM 배지 (100 μ l/well)에서 배양한 다음, 첫번째 실험군으로 *N. fowleri* 영양형 (3×10^4 /well)을 넣어주었다. 두번째 실험군은 CHO 세포들 (3×10^4 /well)에 *N. fowleri* 영양형 (3×10^4 /well)과 적정 희석된 anti-Nfa1 항체 (50 μ l/well)를 각각 넣어주었다. 대조군으로는 CHO 세포만 배양한 well, EMEM 배지만 넣어준 well, *N. fowleri* 영양형만 배양한 well, 항-Nfa1 항체만 넣은 well 등을 준비하였다. 배양 기간별 즉, 24시간과 48시간을 배양한 후 또한, 항-Nfa1 항체 농도별 즉, 1:50~1:200 희석 농도에 따라 세포독성 변화를 관찰하였다. In vitro 세포독성 실험으로는 CytoTox96[®] Non-radioactive Cytotoxicity Assay (Promega)을 이용하여 표적세포 즉, 죽은 CHO 세포로부터 방출되는 LDH의 양을 측정하였다. 96-well plate의 상층액을 pipette를 이용하여 1.5 ml tube에 각각 넣어주었다. 그리고 96-well ELISA Assay plate의 각 well에 상층액을 50 μ l씩 각각 넣어주었다. CytoTox96[®] Non-radioactive Cytotoxicity Assay kit의 분석완충액 (Assay buffer)를 37 $^{\circ}$ C 항온수조기에서 재빨리 녹인 후 바로 각 well에 50 μ l씩 넣은 후 호일 (foil)로 싸서 30분간 실온에서 반응시켰다. CytoTox96[®] Non-radioactive Cytotoxicity Assay kit의 정지용액 (stop solution)을 넣은 후 약 45분간 다시 호일로 덮어서 실온에서 반응시킨 뒤, ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 여기에서 나온 값들은 바탕으로 다음과 같은 계산법으로 세포독성을 계산하였다.

$$\text{*세포독성 (\%)} = (\text{실험군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도} / \text{실험군의 흡광도}) \times 100$$

대조군: CHO 세포 - (배양액, lysis 완충액)

실험군 I: CHO 세포 + 아메바 - (아메바, 배양액, lysis완충액)

실험군 II: CHO 세포 + 아메바 + 항체 - (아메바, 항체, 배양액, lysis 완충액)

III. 결 과

A. *nfaI* 유전자의 재조합 NfaI 단백질과 항-NfaI 다클론항체의 항원성

병원성 *N. fowleri*로부터 클로닝된 *nfaI* 유전자를 *E. coli* 유전자 발현 시스템에서 발현시켜 약 17 kDa의 fusion된 재조합 NfaI 단백질을 다량으로 생산하였으며, enterokinase로 절단하여 13.1 kDa의 순수한 재조합 NfaI 단백질을 얻었다 (Fig. 1A).

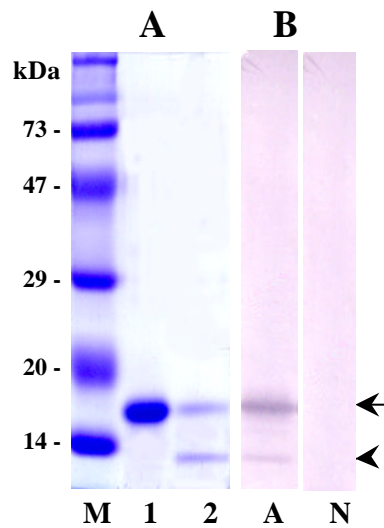


Fig. 1. Band patterns of SDS-PAGE (A) of a recombinant fusion protein (lane 1) expressed from the *nfaI* gene and a recombinant protein digested with enterokinase (lane 2), and Western blotting (B) with an anti-NfaI polyclonal antibody (A) and healthy mouse serum (N). Arrow, uncut 17 kDa protein; Arrow head, cut 13.1 kDa protein; M, Molecular weight marker.

순수 분리된 다량의 재조합 Nfa1 단백질을 마우스에 면역시켜 항-Nfa1 다클론 항체를 얻어 면역효소흡착법으로 역가를 측정한 결과 1:200,000 이상의 값을 얻었으며 (Fig. 2), 이를 재조합 Nfa1 단백질과 반응시킨 결과 17 및 13.1 kDa에서 반응대가 잘 관찰되었다 (Fig. 1B). 항-Nfa1 항체를 모두 모아 이후 실험에 사용하였다.

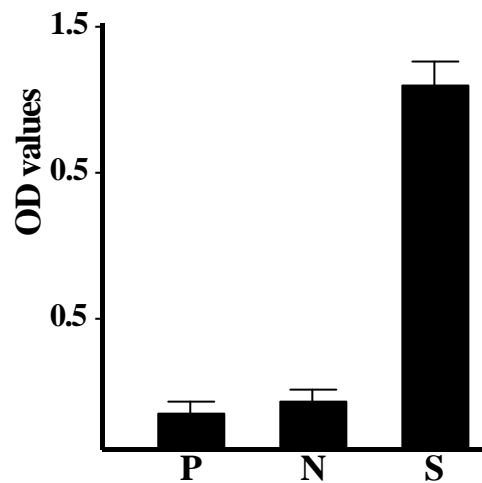


Fig. 2. Antigen reactivity of anti-Nfa1 polyclonal sera. A405 values of sera (1:200 dilution) obtained from Nfa1-immunized mice (n=5) were determined by ELISA reader. P, FBS control; N, normal sera (1:200 dilution); S, anti-Nfa1 polyclonal sera.

B. 항-Nfa1 항체에 의한 *N. fowleri*의 성장을 변화

병원성 *N. fowleri*로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자가 위족 활동과 연관이 있었으므로 본 실험에서는 아메바의 성장률에 항-Nfa1 항체가 미치는 영향을 관찰하였다 (Table 1, Fig. 3). 대조군의 1×10^4 개의 아메바 영양형이 배양 8시간 후에는 1.7×10^4 개, 배양 24시간 후에는 4.9×10^4 개, 32시간 후에는 8.5×10^4 개 그리고 48시간 후에는 21.7×10^4 개로 증식하였다. 반면, 항-Nfa1 항체를 1:200으로 희석하여 첨가한 후 배양한 실험군에서는 각각 1.1×10^4 , 2.9×10^4 , 3.9×10^4 및 15.1×10^4 개로 증식이 억제되었다 ($p < 0.05$). 한편, 항-Nfa1 항체를 1:100으로 희석하여 첨가한 후 배양한 실험군에서는 억제 정도가 더 커서 각각 1.0×10^4 , 2.5×10^4 , 3.2×10^4 및 6.7×10^4 개였다 ($p < 0.001$).

Table 1. Proliferation of *Naegleria fowleri* trophozoites in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody

Antibody added with	Cultivation time				
	0 hr	8 hr	24 hr	32 hr	48 hr
0	1*	1.7 ± 0.29	4.9 ± 0.59	8.5 ± 1.41	21.7 ± 1.06
1:200**	1	1.1 ± 0.59	2.9 ± 1.03	3.9 ± 0.18	15.1 ± 0.88
1:100	1	1.0 ± 0.37	2.5 ± 1.02	3.2 ± 1.06	6.7 ± 1.06

* initial number of *N. fowleri* trophozoites (10^4)

** (v/v) ratio of anti-Nfa1 antibody in 1 ml of culture medium

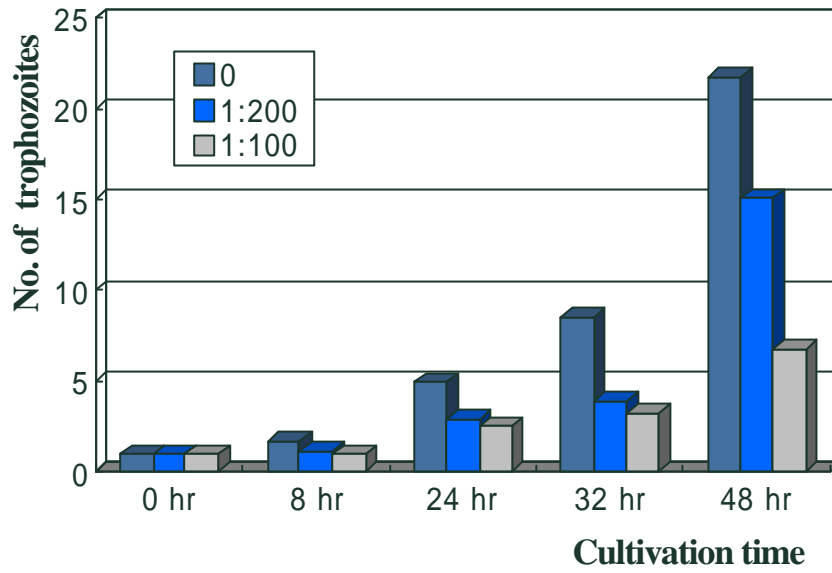


Fig. 3. Graphic view of proliferation of *Naegleria fowleri* trophozoites in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody.

C. 항-Nfa1 항체가 *N. fowleri*의 CHO 세포에 대한 세포독성에 미치는 영향

병원성 *N. fowleri*의 CHO 세포들에 대한 세포독성에 있어서 항-Nfa1 항체를 첨가하였을 때 어떠한 영향이 있는지를 알아보기 위하여 광학현미경하에서 관찰하였다 (Fig. 4). 정상적인 CHO 세포들에 비해 (Fig. 4A) *N. fowleri*를 같이 배양한 실험군은 CHO 세포의 숫자가 현저하게 줄어들었으며 또한, 변형된 모양들이 관찰되었다 (Fig. 4B). 반면, 항-Nfa1 항체를 넣어준 실험군에서는 상대적으로 CHO 세포의 숫자가 많이 남아 있었으며, 형태 또한 정상적인 세포들이 대다수 관찰되었다 (Fig. 4C).

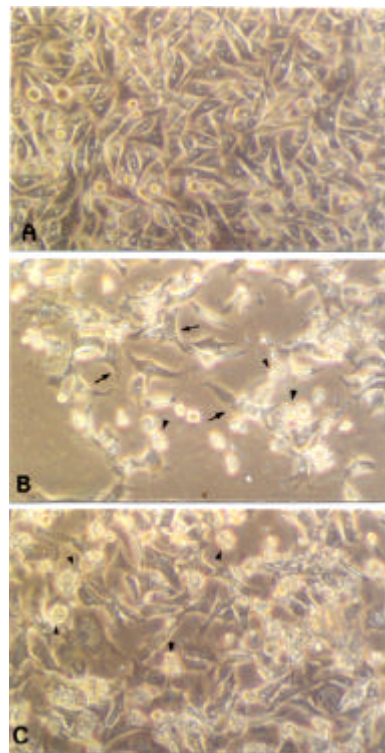


Fig. 4. Microscopic findings of CHO cells (arrows) incubated in EMEM (A), with *Naegleria fowleri* trophozoites (arrow heads) (B), or with *N. fowleri* and an anti-Nfa1 antibody (C) at 48 hrs post cultivation. x200.

세포독성 실험을 정량화하기 위하여 표적세포 즉, CHO 세포들로부터 방출되는 LDH 분비량을 색깔 변화로 측정하는 실험을 진행하였는데, CHO 세포들만 배양한 wells (Fig. 2; 1-A,B,C)에서 분비된 LDH의 양보다 *N. fowleri*를 같이 배양한 wells (Fig. 5; 1-D,E,F)에 더 많이 분비됨 (가장 진한 색깔)이 관찰되었으며, 여기에 항-Nfa1 항체를 첨가해준 wells (Fig. 5; 2-D,E,F)에서는 방출된 LDH의 양이 줄어들었다. 대조군으로 사용된 *N. fowleri*만 넣어준 wells (Fig.5; 4-A,B,C)과 항-Nfa1 항체만 넣어준 wells (Fig. 5; 3-D,E,F)에서는 기본 값과 별다른 변화가 없었다. 이 결과를 토대로 항-Nfa1의 첨가량과 또, 배양기간별로 차이가 있을 것으로 생각되어 구체적인 실험을 진행하였다.

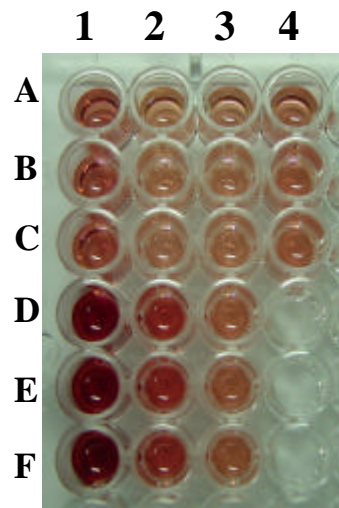


Fig. 5. Visualizing cytotoxicity of *N. fowleri* trophozoites against CHO cells by LDH release assay. CHO cells were cultured only in EMEM (1-A,B,C), with *N. fowleri* trophozoites (1-D,E,F), or with *N. fowleri* trophozoites in the presence of the anti-Nfa1 antibody (2-D,E,F). Other wells were control groups.

첫 번째 실험군으로, 항-Nfa1 항체를 1:200으로 희석하여 첨가해준 뒤 24시간 및 48시간 후에 LDH의 분비량을 측정한 결과 (Table 2, Fig. 6), 배양 후 24시간 후에 *N. fowleri*의 CHO 세포에 대한 세포독성은 55.3%이었으며, 항-Nfa1 항체를 첨가하여 배양하였더니 43.7%로 세포독성이 저하되었다 ($p < 0.05$). 48시간 배양 후에는 *N. fowleri*의 CHO 세포에 대한 세포독성이 59.3%이었으나, 항-Nfa1 항체를 첨가하여 배양한 결과에서 48.0%로 세포독성이 저하되었다 ($p < 0.05$).

Table 2. Cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:200 dilution*)

Groups	Cultivation time	
	24 hr	48 hr
CHO cells + trophozoites	55.3±0.57	59.0±2.00
CHO cells + trophozoites + anti-Nfa1 antibody	43.7±1.52	48.0±1.00

* (v/v) ratio of anti-Nfa1 antibody in 200 μ l of culture medium

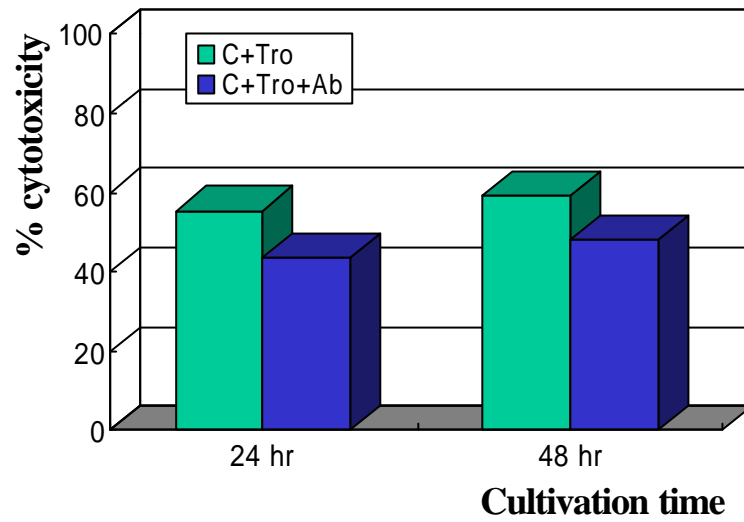


Fig. 6. Graphic view for cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:200 dilution).

두 번째 실험군으로, 항-Nfa1 항체를 1:100으로 희석하여 첨가해준 뒤 24시간 및 48시간 후에 LDH의 분비량을 측정한 결과 (Table 3, Fig. 7), 배양 후 24시간 후에 *N. fowleri*의 CHO 세포에 대한 세포독성은 50.6%이었으며, 항-Nfa1 항체를 첨가하여 배양하였더니 39.3%로 세포독성이 저하되었다 ($p < 0.05$). 48시간 배양 후에는 *N. fowleri*의 CHO 세포에 대한 세포독성이 53.3%이었으나, 항-Nfa1 항체를 첨가하여 배양한 결과에서 41.3%로 세포독성이 저하되었다 ($p < 0.05$).

Table 3. Cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:100 dilution*)

Groups	Cultivation time	
	24 hr	48 hr
CHO cells + trophozoites	50.6±4.16	53.3±3.51
CHO cells + trophozoites + anti-Nfa1 antibody	39.3±3.05	41.3±3.21

* (v/v) ratio of anti-Nfa1 antibody in 200 μ l of culture medium

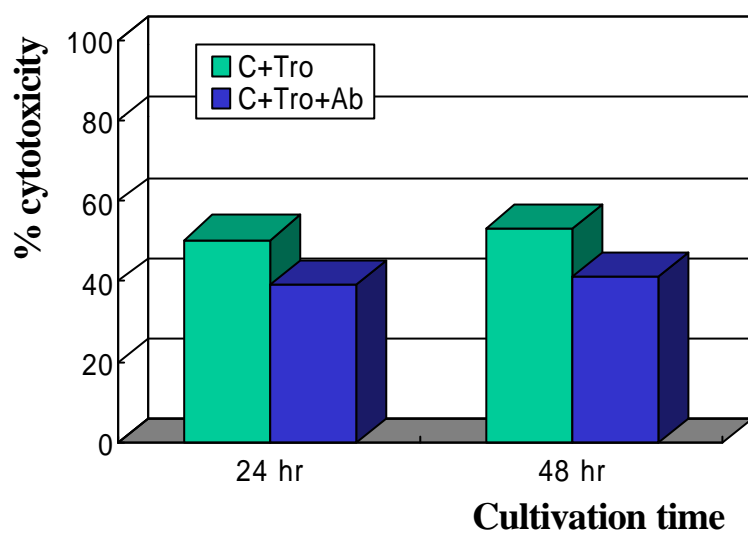


Fig. 7. Graphic view for cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:100 dilution).

세 번째 실험군으로, 항-Nfa1 항체를 1:200으로 희석하여 첨가해준 뒤 24시간 및 48시간 후에 LDH의 분비량을 측정한 결과 (Table 4, Fig. 8), 배양 후 24시간 후에 *N. fowleri*의 CHO 세포에 대한 세포독성은 54.3%이었으며, 항-Nfa1 항체를 첨가하여 배양하였더니 34.0%로 세포독성이 저하되었다 ($p < 0.05$). 48시간 배양 후에는 *N. fowleri*의 CHO 세포에 대한 세포독성이 66.3%이었으나, 항-Nfa1 항체를 첨가하여 배양한 결과에서 42.0%로 세포독성이 저하되었다 ($p < 0.05$).

Table 4. Cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:50 dilution*)

Groups	Cultivation time	
	24 hr	48 hr
CHO cells + trophozoites	54.3±3.21	66.3±5.51
CHO cells + trophozoites + anti-Nfa1 antibody	34.0±3.61	42.0±6.24

* (v/v) ratio of anti-Nfa1 antibody in 200 μ l of culture medium

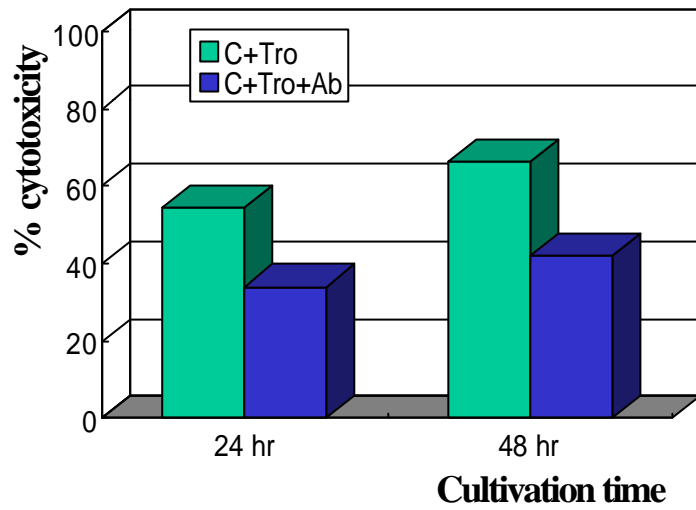


Fig. 8. Graphic view for cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells in the presence of the anti-Nfa1 polyclonal antibody (1:50 dilution).

위의 결과들을 종합해보면, 병원성이 강한 *N. fowleri*는 CHO 세포에 대해 강한 세포독성을 나타내었으나 항-Nfa1 항체를 1:200 희석하여 첨가하였을 때 그 세포독성이 22.2% 감소하였으며, 1:100 희석농도에서는 약 27.8% 그리고 1:50 희석농도에서는 37.4%가 감소하였다. 이런 감소율은 배양시간별로 별 차이가 없었다 (Table 5, Fig. 9).

Table 5. Decreasing effect of an anti-Nfa1 antibody in the cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells

Cultivation time	Anti-Nfa1 antibody titers*		
	1:200	1:100	1:50
24 hr	22.2%**	27.8%	37.4%
48 hr	22.5%	27.7%	36.7%

* (v/v) ratio of anti-Nfa1 antibody in 200 μ l of medium

** percentage value calculated from Table 1~3

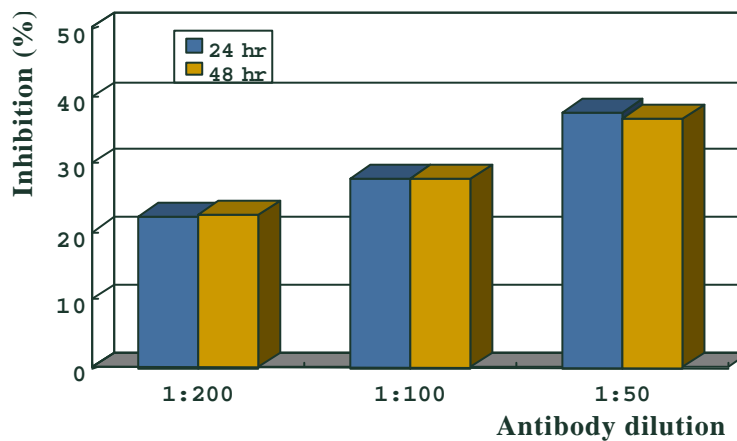


Fig. 9. Graphic views for decreasing effect of an anti-Nfa1 polyclonal antibody in the cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells.

IV. 고찰

병원성 *N. fowleri*의 병원 또는 항원성과 관련된 유전자의 클로닝과 유전자 pools의 구축은 병원성 아메바의 병원 규명이나 항원성 규명, 더 나아가서는 진단과 치료에 접근하는 중요한 정보를 제공하게 되는데, 본 실험에서 사용된 *nfa1* 유전자는 최근에 클로닝된 유전자이다.¹⁹ 병원성 *N. fowleri*의 cDNA library를 구축하여 *N. fowleri*의 감염혈청 및 면역혈청으로 immuno-screening 과정을 통해 얻어진 양성 clone들 중에서 DNA sequencing을 통하여 357 bp의 DNA 염기서열(119개의 아미노산)을 밝힌 것으로, GeneBank에서 상동성을 찾아본 결과, 하등동물의 myohemerythrin의 유전자와 43%의 상동성을 갖고 있었다. 또한, *nfa1* 유전자로부터 발현된 재조합 단백질(Nfa1)을 전기영동한 뒤 13.1 kDa의 분자량이 확인되었으며 감염 및 면역 혈청으로 western blotting을 수행한 결과 13.1 kDa에서 반응대가 잘 관찰되었다.¹⁹ 본 실험에서도 *E. coli* 유전자 발현 시스템을 이용한 결과, 순수분리된 13.1 kDa의 재조합 Nfa1 단백질을 얻을 수 있었다.

한편으로, 재조합 Nfa1 단백질을 마우스에 면역시켜 항-Nfa1 다클론 항체(anti-Nfa1 polyclonal antibody)를 생성하여 Nfa1 단백질의 세포내 분포위치를 관찰하고자 peroxidase를 이용하여 cytochemistry를 시행한 결과, 전자현미경적 관찰에서 활발히 활동하는 위족(pseudopodia)에 집중적으로 분포하였으며 적은 양이 식포(food vacuole)로 생각되어지는 곳에 분포하였다. 또한 비병원성인 *N. gruberi*에서는 발현되지 않음이 관찰되어 Nfa1은 아메바의 병원성과 연관 있을 것으로 주목하고 있다.³⁰ 따라서 아메바의 위족 활동과 연관이 있으며 또한, 병원성 아메바에서 왕성하게 발현되는 것으로 보아 병원성과의 연관이 있을 것으로 사료되어 병원성 아메바인 *N. fowleri*의 병원성의 한 요인을 찾고자 본 연구에서는 in vitro cytotoxicity 실험을 계획하였다.

그 첫 번째로 본 실험에서는 *E. coli*를 이용한 유전자 발현 시스템을 통해 재조합 Nfa1 단백질을 얻었으며, SDS-PAGE등의 결과 예전의 보고¹⁹와 같은 재조합 Nfa-1 단백질을 확인하였다. 또한 이런 재조합 Nfa1 단백질을 마우스에

면역시켜 항-Nfa1 다클론 항체를 생산하였으며, 면역효소흡착법으로 항체 역가를 측정하였고 또한, western blotting을 수행하여 13.1 kDa의 반응대를 확인 할 수 있어 이후 실험을 진행하였다.

두 번째로, 병원성 *N. fowleri*의 배양에 있어서 항-Nfa1 항체를 투여할 경우 어떠한 영향이 있는지를 관찰하고자 하였는데, 본 실험 결과 *N. fowleri*의 증식률은 항-Nfa1 항체의 투여에 의해 현저히 감소함이 관찰되었으며 그런 현상은 항체의 희석농도 즉, 투여량에 의존적이었다. 이 결과는 항-Nfa1 항체가 아메바의 위축 활동에 영향을 줌으로써 증식률이 억제 된 것으로 *nfa1* 유전자가 아메바의 증식에 관여하는 유전자의 하나라는 증거이기도 하다. 그 기전에 대하여는 항체의 응집반응 (agglutination)을 중심으로 연구가 진행되어야 할 것이며, 그런 결과는 앞으로 이어질 아메바의 성장과 연관된 세포주기 연구 또는 생리 연구에 중요한 정보라고 사려된다.

세 번째로, *N. fowleri*의 표적세포 즉, CHO 세포들에 대해 세포독성을 나타냄에 있어서 항-Nfa1 항체를 투여할 경우 어떠한 영향이 있는지를 관찰하고자 하였는데, 본 실험 결과 항-Nfa1 항체의 투여가 *N. fowleri*의 표적세포에 대한 세포독성을 22~37%로 크게 감소 시켰음이 관찰되었고 그런 현상은 항체의 투여량과 배양 시간에 의존적이었다. Brown의 보고³¹에 의하면 마우스의 배아세포에 *N. fowleri*를 넣어 주면 세포병변효과 (cytopathogenicity)를 보이는데, 아메바에 특이성을 갖는 항체를 넣어주면 그 효과가 감소한다고 하였다. 본 연구의 예비실험에서 건강한 마우스의 혈청은 *N. fowleri*의 표적세포에 대한 세포독성을 감소시키지 못하였으며 ($p > 0.05$), 반면 아메바의 전체 단백질 (whole lysate)로 면역시킨 혈청은 세포독성을 크게 감소시켰다 ($p < 0.01$) (Table 6). 다른 한편으로 재조합 Nfa1 단백질을 표적세포 즉, CHO 세포들과 배양할 경우에 직접적인 세포독성을 보여주지는 못하여 효소로써 작용하는 단백질은 아니었다 (Fig. 5; 3-A,B,C).

Table 6. Cytotoxicity of *Naegleria fowleri* against CHO cells in the presence of the healthy and immunized mice sera (1:100 dilution*)

Groups	Cultivation time	
	24 hr	48 hr
CHO cells + trophozoites	48.8±2.95	59.5±5.42
CHO cells + trophozoites + healthy serum	54.9±0.74	61.8±1.08
CHO cells + trophozoites + immune serum**	17.7±1.10	17.4±4.16

* (v/v) ratio of anti-Nfa1 antibody in 200 μ l of medium

** obtained from mouse immunized with amoeba lysate

예전의 연구에서 보면, 병원성이 강한 아메바가 병원성이 약한 아메바에 비해 in vitro 세포독성이 강하다고 보고되었으며,³² 병원성이 강한 아메바가 병원성이 약한 아메바보다 빠른 운동성 (movement)을 보여준다고 하였다.²⁵ 한편, Myohemerythrin과 같은 단백질들은 iron을 갖고 있는데, 병원체의 감염력 (infectivity), 숙주 세포로의 침입 (invasion)과 숙주세포의 파괴 (destruction) 그리고 항-세균성 기능 (anti-bacterial function)에 필수적이라고 보고되었다.^{33,34}

이런 결과들을 종합하면 *nfa1* 유전자가 *N. fowleri*의 병원성과도 관련이 있다는 것을 입증하는 것으로 자유생활아메바의 병인과 관련된 주요 유전자의 하나로 생각되어진다. 앞으로 *nfa1* 유전자의 in vivo eukaryotic transfection 및 anti-sense 또는 RNAi등을 이용한 유전자 knock-out등의 실험을 통해 그 기능과 특성에 대한 집중적인 연구가 필요하겠다고 사려된다. 그러한 시도는, 향후 지속될 백신, 신약제 개발과 진단 등을 위한 연구의 기초 자료로 활용 될 수 있을 것으로 기대된다.

V. 결 론

본 연구는 *N. fowleri*의 위축 활동과 연관이 있는 *nfa1* 유전자가 아메바의 병원성과 관련 있는 유전자의 하나라는 것을 입증하기 위해, *nfa1* 유전자로부터 발현된 재조합 Nfa1 단백질을 얻고 그것에 대한 다클론항체를 생산하여, *N. fowleri*의 배양 및 CHO 세포와 반응시켰을 때 첨가해줌으로써 일어나는 아메바의 증식률 및 세포독성 변화를 알아보려고 하였다. *N. fowleri*의 증식률은 항-Nfa1 항체의 투여에 의해 현저히 감소함이 관찰되었으며 그런 현상은 항체의 희석농도 즉, 투여량에 의존적이었다. 또한 항-Nfa1 항체의 투여가 *N. fowleri*의 표적세포에 대한 세포독성을 22%내지 37%로 크게 감소 시켰음이 관찰되었고 그런 현상은 항체의 투여량과 배양 시간에 의존적이었다. 이런 결과들을 종합하면 항-Nfa1 항체가 *N. fowleri*의 증식률과 *in vitro* 세포독성을 크게 감소시키는데 영향을 줌으로써, *N. fowleri*로부터 새로이 클로닝된 *nfa1* 유전자가 아메바의 병원성 과도 관련이 있다는 것을 보여주는 결과라 하겠으며, 이런 *nfa1* 유전자는 자유생활아메바의 병원 연구에 중요한 대상 유전자로써 앞으로 보다 구체적인 연구가 필요하다고 생각되어진다.

참 고 문 헌

1. Marciano-Cabral F: Biology of *Naegleria* spp. Microbiol Rev 52:114-133, 1988
2. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM and Sawyer TK: *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: Review. Rev Inf Dis 12:490-513, 1990
3. Visvesvara GS and Stehr-Green JK: Epidemiology of free-living amoeba infections. J Protozool 37(suppl):25-33, 1990
4. Im KI and Kim DS: Acanthamoebiasis in Korea: Two new cases with clinical cases review. Yonse Med J 39:478-484, 1998
5. Marciano-Cabral F, Patterson M, John DT and Bradley SG: Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. J Parasitol 66:1110-1116, 1982
6. Marciano-Cabral F, Zoghby KL, Bradley SG: Cytopathic action of *Naegleria fowleri* amoeba on rat neuroblastoma target cells. J Protozool 37:138-144, 1987
7. Fuford DE and Marciano-Cabral F: Cytolytic activity of *Naegleria fowleri* cell-free extract. J Protozool 33:498-502, 1986
8. Eisen D and Franson RC: Acid-active neuraminidases in the growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and in sonicates of rabbit

- alveolar macrophages. *Biochem Biophys Acta* 924:369-372, 1987
9. Dunnebacke TH and Dixon JS: NACM, a cytopathogen from *Naegleria* ameba: purification production of monoclonal antibody, and immunoreactive material in NACM-treated vertebrate cell cultures. *J Cell Sci* 93:391-401, 1989
 10. Yong JD and Lowrey DM: Biochemical and functional characterization of membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 264:1077-1083, 1989
 11. Lowrey DM and MaLaughlin J: Activation of a heat-stable cytolytic protein associated with the surface membrane of *Naegleria fowleri*. *Infect Immun* 50:478-482, 1985
 12. North MJ: Comparative biochemistry of the proteinases of eukaryotic microorganisms. *Microbiol Rev* 46:308-340, 1982
 13. McKerrow JH: Minireviews: Parasite protease. *Exp Parasitol* 68:111-115, 1989
 14. Park H, Soh CT, Seo JH and Im KI: Proteinase activity of *Naegleria* spp. with special reference to their pathogenicity. *Yonsei R Trop Med* 24:13-29, 1993
 15. Hu WN, Band RN and Kopachik W: Virulence-related protein synthesis in *Naegleria fowleri*. *Infect Immun* 59:4278-4282, 1991

16. Hu WN, Kopachik W and Band N: Cloning and characterization of transcripts showing virulence-related gene expression in *Naegleria*. *Infect Immun* 60:2418-2424, 1992
17. Wessberg K Skolirnick S, Xu J, Marciano-Carbral F and Kemp RG: Cloning, sequencing and expression of the pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase from *Naegleria fowleri*. *Biochemistry* 307:143-149, 1995
18. Huang W and Bateman E: Cloning, expression, and characterization of the TATA-binding protein (TBP) promoter binding factor, a transcription activator of the *Acanthamoeba* TBP gene. *J Biol Chem* 270:28839-28847, 1995
19. Shin HJ, Cho MS, Jung SY, Kim HL, Park S, Kim HI et al.: Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* 48:713-717, 2001
20. Haggerty RM and John DT: Serum agglutination and immunoglobulin levels of mice infected with *Naegleria fowleri*. *J Protozool* 29:117-122, 1982
21. Cursons RTM and Brown TJ: Identification and classification of the aetiological agents of primary meningoencephalitis. *N Z J Mar Freshwater RES* 10:245-262, 1976
22. Ravi JJ and Guerrant RL: Role of adherence in cytopathogenic mechanism of *Entamoeba histolytica*. *J Clin Invest* 8:1305-1313, 1981

23. Ravdin JL, Murphy CF, Guerrant RL and Long-Krug SA: Effect of antagonists of calcium and phospholipase A on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. J Infect Dis 152:542-549, 1985
24. Ravdin JL: Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins, and contact-dependent cytolysis. Rev Infect Dis 8:247-260, 1986
25. Cline M, Carchma R and Marciano-Cabral F: Movement of *Naegleria fowleri* simulated by mammalian cell in vitro. J Protozool 33:10-13, 1986
26. Shin HJ, Cho MS, Jung SY, Kim HI and Im KI: In vitro cytotoxicity of *Acanthamoeba* spp. isolated from contact lens containers in Korea by crystal violet staining and LDH release assay. Korean J Parasitol 38:99-102, 2000
27. Willaert E: Isolement et culture in vitro des amibes de genre *Naegleria*. Ann Soc Belg Med Trop 51:701-708. 1997
28. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72:248-254, 1976
29. Shin HJ, Im KI: Analysis of antigenic specificities of *Naegleria fowleri* using BITB. Yonsei R Trop Med 23:9-13, 1992
30. Cho MS, Jung SY, Park S, Kim KH, Kim HL, Sohn S, KI Im, HJ Shin: Immunological characterizations of a cloned 13.1 kDa protein from

pathogenic *Naegleria fowleri*. Clin Diagn Lab Immunol 10:00-00, 2003

31. Brown T: Inhibition by amoeba-specific antiserum and by cytochalasin B of the cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo-cell cultures. J Med microbiol 12:355-362, 1979
32. Shin HJ, La MS and Im KI: Cytotoxicity of *Acanthamoeba* sp. YM-4 (Korean isolate). Yonsei R Trop Med 24:27-31, 1993
33. Negri A, Tedeschi G, Bonomi F, Zhang JH and Kurtz DM Jr.: Amino-acid sequences of the alpha- and beta-subunits of hemerythrin from *Lingula reevii*. Biochim Biophys Acta 1208:277-85, 1994
34. Raner GM, Martins LJ and Ellis WR Jr.: Functional role of leucine-103 in myohemerythrin. Biochemistry 36:7037-43, 1997

Effect of an anti-Nfa1 polyclonal antibody on the proliferation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*

Sang-Chul Lee

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Ho-Joon Shin)

Naegleria fowleri, a free-living amoeba widespread in moist soil, water and sediment, exists as a virulent pathogen causing fatal primary amoebic meningoencephalitis in experimental animals and humans. During the ensuing years, numerous cases are diagnosed retrospectively from autopsy material. To obtain antigenic molecules to be useful as diagnostic agents in the pathogenic free-living amoeba infection, an antigenic gene (named as *nfa1*) was cloned from cDNA library of *Naegleria fowleri* by immunoscreening. The *nfa1* gene had the coding nucleotide sequence consisted of 357 bases and produced a recombinant 13.1 kDa protein (Nfa1) that showed the pseudopodia-specific localization on a trophozoite by immunocytochemistry. On the basis of an idea that the pseudopodia-specific Nfa1 protein may be concerned with a pathogen of *N. fowleri*, we estimated the proliferation of *N. fowleri* trophozoites and their in vitro cytotoxicity against CHO cells, as treating an anti-Nfa1 polyclonal antibody on their cultivating system. The proliferation of *N. fowleri* trophozoites treated with an anti-Nfa1 polyclonal antibody was

inhibited in a dose-dependent manner at 48 hr post incubation. By a light microscope, CHO cells cocultured with *N. fowleri* trophozoites (group I) for 48 hr showed morphologically severe destruction. On the contrary, CHO cells cocultured with *N. fowleri* trophozoites and an anti-NfaI polyclonal antibody (1:100 dilution) (group II) showed less destruction. As the results of LDH release assay, group I showed 50.6% cytotoxicity and group II 39.3%, respectively. The cytotoxicity of *N. fowleri* against CHO cells was inhibited by adding an anti-NfaI polyclonal antibody in a dose-dependent manner at 48 hr post incubation. Thus, an anti-NfaI polyclonal antibody had an effect on decreasing the in vitro cytotoxicity of *N. fowleri*, as neutralizing the NfaI protein concerned with amoeba pseudopodia. Finally, a newly cloned *nfaI* gene may be a pathogenic gene of *N. fowleri*.

Key words: Free-living amoeba, *Naegleria fowleri*, PAME, gene cloning, recombinant protein, cytotoxicity