

DNA chip과 proteomics 기술을 이용한 탄저 발병
관련 유전자의 규명 및 이를 이용한 백신 개발

Characterization of Genes which related to Anthrax
Infected Macrophages using DNA Chips and Proteomics
Techniques

연구기관

한양대학교

농림부 도서실



0001414

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “DNA chip과 proteomics 기술을 이용한 탄저 발병 관련 유전자의 규명 및 이를 이용한 백신 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004 년 8 월 19 일

주관연구기관명 : 한양대학교

총괄연구책임자 : 채 영 규

세부연구책임자 : 채 영 규

세부연구책임자 : 윤 문 영

협동연구기관명 : (주) 셀엔젠

협동연구책임자 : 오 광 근

요 약 문

I. 제 목

DNA chip과 proteomics 기술을 이용한 탄저 발병 관련 유전자의 규명 및 이를 이용한 백신 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

탄저에 대한 적절한 방제를 하기 위해서는, 우수한 탄저 백신, 새로운 약물, 혹은 면역 치료제의 개발이 필수적이다. 탄저 방제에 가장 중요한 치사독소의 병원성과 병원성에 관련된 일련의 생화학적 경로와 숙주세포의 반응에 따른 저항성/감수성에 관련된 유전자나 단백질들을 규명하고 그 특성을 분석하는 과정이 필요하다. 이를 위해 새로운 치사독소의 병원성 관련 유전자나 단백질을 확인 및 분리할 수 있는 기술로 대식세포에 이들 균주나 독소를 주입한 후 실질적으로 대식세포에 일어나는 일련의 유전자 발현양상의 변화(DNA microarray chip 분석 기술)와 단백질 양상의 변화(proteomics 분석 기술)를 분석하여 치사독소 관련 유전자나 단백질을 규명하고자 하였으며, 얻어진 유전자나 단백질을 이용 백신이나 치료제 개발후보 물질을 확보하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구는 DNA chip과 proteomics 기술을 이용하여 탄저 발병 관련 유전자의 규명 및 이를 이용한 백신 개발을 위해서 DNA chip과 proteomics 기술을 이용하여 초기 탄저균이 감염 되었을 시 숙주의 대식세포에서 반응하는 유전자와 단백질들을 선별하고, 병원성 단백질인 치사요소의 특성을 조사하였다. 이를 위하여 2차 전기영동기술과 cDNA microarray chip을 이용하여 단백질과 유전자의 발현 양상과 특정 유전자나 단백질을 확보하여 동정하였으며, 치사요소를 확보하고, 저해제를 탐색하고자 하였으며 또한 효소활성 측정법등을 이용하여 치사요소의 특성을 규명하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

사람 및 마우스 대식세포를 이용하여 탄저균의 아포 및 치사독소에 의한 proteomics

및 cDNA microarray chip 결과는 phagocytosis, apoptosis, 및 signal transduction 등에 대한 유전자와 단백질들이 확인되었다.

이들은 프로테오믹 데이터에서 탄저균 아포와 마우스 대식세포에서 서로 상호작용에 관여하는 단백질 5종을 얻었으며, 치사독소를 마우스 대식세포에 처리하였을 시에 반응하는 단백질 15종을 얻었다. 또한 사람대식세포에 탄저균 아포를 처리하였을 시에는 21종의 단백질을 얻었다.

cDNA microarray에서는 마우스 대식세포에 치사독소를 처리하였을 시에 전체 226개의 유전자가 차이를 보였는데 32개의 유전자가 저해되었으며, 194개의 유전자가 발현이 증가 되었다. 또한 사람 대식세포에 치사독소를 처리하였을 시는 전체 202개의 유전자의 차이를 보였는데 122개가 저해되었으며, 80개가 발현이 증가됨을 확인 할 수 있었다. 특히, 이들 중에 외부 물질의 침입에 대한 방어 역할을 하는 proteasome (26S)와 ubiquitin enzyme들의 유전자와 단백질의 발현은 탄저균 아포와 치사독소를 처리했을 시에도 확인할 수 있었다. 또한, apoptosis에 관련한 coronin 1B는 공통적으로 아포와 치사독소를 처리했을 시에 발현을 확인 할 수 있었다. 탄저균 아포를 대식세포에 처리하였을 시는 phagocytosis 과정에서 발현되는 단백질인 RhoGAP와 RabGDI등의 단백질이 발현되었다. 이들은 탄저균 아포가 대식세포내로 이동하는 것을 억제하는 기능을 가지는 것으로 보인다. Proteomics 기술을 이용한 결과와 DNA chip을 이용한 결과에서 차이를 볼 수 있는데, 이는 대식세포의 종류도 다르고, 탄저 치사독소의 양이나, 탄저균 아포의 처리 양 혹은 처리 시간 등이 다르기 때문에 서로 다른 유전자나 단백질이 나온 것으로 추정된다.

치사요소의 특성을 규명하기 위하여 치사요소 발현 시스템을 구축하기 위하여 치사독소 유전자를 클로닝 하였으며, 여기에서 얻어진 치사요소를 통해서 치사요소에 대한 금속이온에 대한 반응성을 확인하였으며, 새로운 기질을 찾아내기 위하여 2-DE를 수행하여 기질을 찾고자 하였다. pH에 의한 치사요소의 활성도를 측정하는 방법을 구축하였으며, 효소활성 측정법을 개발 하였다. 본 연구 결과 궁극적으로 사람 및 마우스에 대한 단백질 및 유전자의 확보를 통하여 백신 및 치료제에 대한 후보물질 역할을 수행하는 유전자나 단백질을 확보하였으며, 한편으로는 치사요소에 대한 효소 활성법 등으로 치사요소에 대한 저해제 개발 등을 시도하였다.

본 연구에서는 탄저 치사독소와 탄저균 아포가 숙주에 들어 왔을 때 초기에 접하는 대식세포에서 어떤 반응이 일어나는지를 유전자 및 단백질 발현으로 분석하였고, 여기서 얻어진 유전자와 단백질은 탄저 감염에 대한 바이오마커로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 백신 후보나 치료제 후보로 사용 가능성을 타진하였다.

SUMMARY

(영문 요약문)

Bacillus anthracis, a gram-positive, endospore-forming, aerobic rod-shaped bacterium, interacts with macrophages at various stages of the disease. Spore germination and the outgrowth of vegetative bacilli are crucial steps enabling the bacteria to proliferate actively and to synthesize the virulence factors leading to a massive septicemia.

In this study, we performed a proteomic analysis and MALDI-TOF-MS were carried out to identify proteins using the infected human macrophages with the spores of *Bacillus anthracis* live-Sterne or inactivated-Sterne. We identified 21 proteins which are related to the infection of *Bacillus anthracis* spores on human macrophages at the early stage events. These proteins function in processes such as cytoskeleton regulation, apoptosis, cell division and protein degradation. Proteins such as PAK 2 revealed a relationship to apoptosis in human macrophages. These proteins play an important role in the macrophages survival and death on human macrophages with infected *Bacillus anthracis* spores.

The anthrax lethal factor (LF) is a Zn(2+)-endopeptidase specific for mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs), which are cleaved within their N-terminal region. Much line of effort was carried out to elucidate the catalytic activity of LF for designing the inhibitor and to understand the cellular mechanism of its cytotoxicity. Current assay methods to analyze the LF activity have been based on a synthetic peptide, consisting of 15-20 residues around being cleaved. However, there are accumulating reports that the region distal to cleavage site is required for the LF-mediated proteolysis of substrate. In this study, we demonstrate the catalytic properties of LF, using the full-length native substrate, MEK. We described the catalytic properties of LF focused on the effects of the pH alteration, which was encountered during the endocytosis of lethal toxin, and of the requirement for metal ions. We present the first evidence that additional metal ions are required for the LF catalyzed hydrolysis of native substrate, and that the pH alteration causes a significant

change of catalytic properties of LF.

To provide insight into mechanisms of the cellular interaction of murine macrophage with lethal toxin. We have used cDNA microarray to explore the responses of RAW 264.7 cells to defend against a death level of lethal toxin (LeTx). It was found that host gene responses which protein bio-synthesis, inter-cellular signaling cascade, transport, proteolysis, cell growth were differently expressed. We found that gene expressions that inhibit making macromolecules were suppressed, whereas, genes that regulate cell growth and proteolysis were induced. We already know about that LeTx provoke cell death activating the programmed cell death and acquire new information from our gene expression profiles which LeTx inhibited cell survival. And we need to further study about genes that have specific functions to be utilize a bio-marker. Proteomics, cDNA microarray chip and enzyme assay techniques offer materials of inhibitors and vaccine candidates for LeTx and spores of *B. anthracis*.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	9
Chapter 2. Literature background	12
Chapter 3. Methods, results	14
Chapter 4. Objectives	116
Chapter 5. Application	120
Chapter 6. Technical support	123
Chapter 6. References	125

목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요	9
제 2 장	국내외 기술개발 현황	12
제 3 장	연구개발 수행 내용 및 결과	14
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	116
제 5 장	연구개발결과의 활용계획	120
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보...	123
제 7 장	참고문헌	125

제 1 장 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 가. 탄저(anthrax)는 그람 양성 간균인 탄저균(*Bacillus anthracis*)에 의하여 주로 가축에게 감염되거나 사람에게도 발병하는 인수 공통 감염성 질환임.
- 나. 탄저는 전 세계적으로 발병이 확인되며, 아프리카, 중동, 중국, 러시아 등의 지역에서 다발하고 있으며, 미국, 유럽 및 그 외 지역에서는 산발적으로 발병하고 있음.
- 다. 국내에서는 1994년 경주, 1995년 홍성, 및 2000년 창녕에서 발생하였으며, 폐사우의 식육을 섭취함으로써 사람에게도 발병하였음. 특히, 2000년 창녕의 경우, 폐사우를 취급하던 사람에 피부탄저가 발생하였음. 이는, 탄저에 의한 위험이 가축을 사육하는 농가에서 사람의 생명까지 위협할 수 있는 수준임을 입증하며, 탄저에 대한 방제의 필요성이 대두됨.
- 라. 탄저균의 병원성은 주로 독소 생성 능력과 협막 형성에 의해 결정되는 것으로 알려져 있음. 이러한 독소와 협막을 결정짓는 유전자는 탄저균의 플라스미드인 pXO1과 pXO2에 암호화되어 있음. 탄저 독소로 총칭되는 독소 구성 단백질은 방어항원(protective antigen; PA), 부종요소(edema factor; EF), 치사요소(lethal factor; LF)이며, 이들 각각은 독성을 나타내지 못하나, 방어항원과 부종요소가 결합하여 부종독소(edema toxin; EdTx)를 방어항원과 치사요소가 결합하여 치사독소(lethal toxin; LeTx)를 형성함. 그러나 치사독소가 어떻게 대식세포(macrophage)를 사멸하게 하는지에 대한 기전은 아직 명확하게 밝혀진 바가 없음.
- 마. 국내에서는 탄저가 산발적으로 일어나기 때문에 많은 가축을 대상으로 예방 접종을 실시하는 것은 비경제적이므로 탄저 다발 지역에 주로 예방 접종을 시도함. 또한, 지금 사용 중인 백신은 병원성이 높아 감수성이 높은 가축이나 사람에게는 사용하기가 곤란함. 이러한 이유로 탄저가 다시 발생할 가능성이 높음.
- 바. 미국이나 영국에서는 방어항원을 분리한 정제 항원을 사용하고 있으나, 백신으로서 역가가 낮아 동물에서 이용되지 못하고 있는 실정임.
- 사. 탄저에 대한 방제를 하기 위해서는, 우수한 탄저 백신, 새로운 약물, 혹은 면역치료제의 개발이 필수적임. 즉, 치사독소의 병인성과 병원성에 관련된 일련의 생화학적 경로와 숙주세포의 반응에 따른 저항성/감수성에 관련된 유전자나 단백질 들을 규명하고 그 특성을 분석하는 과정이 필수적임.
- 아. 국내외에서 이들 기전을 이해하기 위하여 개개의 단백질을 연구하는 방법을 사용하여 어느 정도 연구의 진전은 있었으나, 아직 확실한 기전을 이해하지 못하고 있는 실

정으로 탄저 관련 백신개발에 큰 장애 요인으로 작용하고 있음.

- 자. 치사독소의 기전을 규명하고 새로운 백신 개발을 하기 위해서는 그 기능이 확인된 유전자나 단백질을 분리하는 새로운 접근 방법이 요구됨. 이는 최근 게놈 프로젝트가 끝남과 동시에 기능적 유전체학 (functional genomics)의 단계로 연구 추세가 변화가 있는 것으로도 증명됨.
- 차. 따라서 이러한 한계를 극복하면서 새로운 치사독소의 병원성 관련 유전자나 단백질을 확인 및 분리할 수 있는 기술로 대식세포에 이들 균주나 독소를 주입한 후 실질적으로 대식세포에 일어나는 일련의 유전자 발현양상의 변화 (DNA microarray chip 분석기술)와 단백질 양상의 변화 (proteomics 분석 기술)를 사용하여 치사독소 관련 유전자나 단백질을 규명하고자 하였으며, 확보되는 유전자나 단백질을 이용하여 진단, 치료제 개발, 및 백신 개발 등의 가능성을 타진하고자 하였음.

2. 경제 · 산업적 측면

- 가. 탄저의 방제에 DNA microarray chip 분석 기술과 proteomics 분석 기술의 사용은 탄저균의 치사독소의 기전 연구에 국한된 것이 아니라, 여러 동물/사람의 새로운 백신 개발이나 약품 개발에 응용될 수 있는 원천기술임.
- 나. 현재까지 국내에서 개발된 DNA microarray chip 분석 기술이나 proteomics 분석 기술로 얻어진 유전자나 단백질에 대한 자원은 많지 않은 실정으로 게놈 프로젝트를 대개의 선진국에 맡겨 둔 국내의 상황에서는, 정보와 기술에서 선진국의 종속관계를 벗어나기 힘들 것으로 보임. 특히, 현재의 국내 기술 수준과 선진국의 유전자 자원의 상업화 추세는 자체 유전자 자원이나 단백질 자원의 개발 노력이 많지 않은 한국의 농업생명공학의 미래나 경쟁력은 궁극적으로 경쟁적인 열세에 놓이게 될 것으로 사료됨.
- 다. 이를 극복하기 위해서는, 유전자/단백질 상업화 추세에 대비해야 할 필요성이 대두됨. 미국 TIGR에서는 탄저균의 플라스미드인 pXO1과 pXO2에 대한 염기서열 결정과 탄저균 염색체에 대한 염기서열 결정을 끝내었으며, Compugene의 LabOnWeb.com은 Genome Theapeutics' PathoGenome database를 통하여 약 30여종의 병원 미생물 염기서열을 확보한 상태에 있음. 특히, TIGR는 이 분야의 연구를 대대적으로 확장하고 있음.
- 라. 이러한 국외의 추세에 능동적으로 대처하기 위하여, 국내 탄저균의 치사 독소 병원성 유발에 관련된 유전자/단백질을 규명하고 분석하는 일이 필수적임.

3. 사회·문화적 측면

- 가. 탄저는 국내에서 산발적으로 일어나나, 종종 폐사한 가축을 밀도살하여 나누어 먹는 습관을 가지고 있는 우리나라에서는 언제든지 탄저에 노출될 가능성을 갖고 있음. 2000년 창녕의 경우, 한국에서는 흔치 않은 피부탄저가 발병됨.
- 나. 외국의 경우, 탄저를 바이오테러리즘에 가장 많이 사용할 것으로 간주하고 있음. 특히, 탄저에 의한 생물학 작용제의 경우는 쉽게 전염되고, 적은 양으로도 치명적이며, 토양에 잔류하여 오랫동안 탄저를 유발할 수 있기 때문에, 효과적인 치료 방법의 강구는 국내 축산 산업에서의 문제뿐만 아니라, 국가안보와 국민들의 인명 보호적인 측면에서 매우 중요함.
- 다. 최근 국가간의 경쟁력은 원천 기술이 기반이 되어 있는 국가가 경쟁 우위를 점하게 됨. 따라서 유전자 자원을 산업화하는 국외의 추세에 능동적으로 대처하기 위하여, 탄저의 경우, 치사 독소의 병원성 유발에 관련된 새로운 기능의 유전자/단백질을 규명 및 분석하고, 이를 이용하여 방제하는 연구의 필요성이 대두됨.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1 절. 국내·외 관련기술의 현황과 문제점

1. 국외 기관의 DNA chip과 proteomics 연구동향

- 가. DNA chip 기술은 오늘날 생명공학분야에서 가장 주목받는 새로운 기술이며, 본 기술은 21 세기 생명공학관련 산업과 의료 및 기타 사회전반에 걸쳐 혁명을 가져오리라 예측됨.
- 나. 90년대 까지만 하더라도 세포기능연구에 대한 분자생물학적인 접근은 대부분 단일 유전자나 그 유전자가 발현하는 mRNA의 발현조절을 중심으로 이루어진 반면에, 최근에는 유전체나 단백질체 중심으로 이른바 총체적생물학 (holistic biology)의 개념으로 바뀌고 있는 추세임.
- 다. 최근 하버드 의과대학의 Elkahoun 팀(1999, 2000)은 사람의 유방암 세포에서 laser capture microdissection 기술과 cDNA array chip 기술을 동원하여 한 사람의 환자에서 정상적인 조직, invasive한 조직, metastatic breast cell population 등을 사용하여, *in vivo* gene expression profile을 관찰하였음.
- 라. 플로리다 대학의 Reed 연구팀(2000)은 cDNA subtractive hybridization과 microarray technique을 사용하여 이전 보고 되지 않은 9 종의 새로운 유전자를 확인함.
- 마. Jungblut 등 (1999)에 의해 암조직의 일부를 2-DE 분석을 통해 암의 진전에 따라 발현이 증가되는 13/56 단백질을 식별하였고, 이것이 calgranulin B (calprotectin)임을 밝혀냄바 있음.
- 바. Proteomics 분석 기술을 사용하여, 최근에는 결핵의 주요 원인인 mycobacterium의 2D map 분석과 이들 균주들에 대한 proteome 연구용 dBase가 구축되었음 (Mollenkopf 등, 1999). 이러한 전염성 균주들을 내성과 비내성 등으로 구분하여 각각의 proteome 분석을 실시한 결과 700여종의 특정 단백질들의 존재가 확인되었고, 이들 중 일부는 TB (결핵)의 진단과 치료에 중요한 단서가 될 것으로 기대됨.
- 사. Edvardsson 등 (1999)은 obese mice 들의 PPAR (peroxisome proliferation activator regulator) 전사인자들의 isoform에 대한 proteome 분석을 항비만 약물 (예, WY14,643) 투여 전후를 통해 실시하여, 최소한 16개 spot의 단백질 군이 발현 증가 됨을 확인하였음. 이들 중 14개 spots들이 peroxisomal fatty acid 대사에 관여하는 단백질임을 확인한 바 있으며, 이로 인해 이 항 비만제의 작용기전이 peroxisome에서 지방산 산화 (β -oxidation)를 촉진함을 규명하였음.

2. 국내 기관의 DNA chip, proteomics 연구동향

가. 국내에서도 DNA chip에 대한 관심은 상당히 높아 한양대의 이용성 박사를 필두로 매크로젠의 서정선 박사, 경북대의 김정철 박사, myGene의 한인권 박사 등이 임상적 진단과 연구를 목적으로 한 DNA chip을 제작하고 있는 상황이며, 서울대 의대 박웅양 박사를 비롯한 많은 연구원들이 DNA chip을 사용하여 연구를 수행하고 있는 실정임. 21세기 프론티어 사업단에서도 한국인 위암 및 간암에 대한 원인 유전자를 규명하고자 하는 일에 몰두하고 있는 상황임. 더욱이, 인간 유전체의 염기서열이 전부 밝혀진 작금의 상황에서 이러한 추세는 더 늘어날 것으로 사료됨.

나. 이에 반해 proteomics 분석기술에 대한 관심도는 DNA chip에 비하면 그리 높다고 할 수 있는 상황은 아니지만, 프로테아제의 한문희 박사, 연세대의 백용기 박사, 이화여대의 이공주 박사, 한림대의 최의열 박사, 서울대의 김선영 박사, 강원대의 하건수 박사, 육사의 이남택 박사 등이 진단 등의 사업화와 연구 목적으로 연구하고 있는 추세임. 특히, 유전체 사업에 한국이 소외되면서 일본과 함께 아직 많은 선행연구가 되어 있지 않은 proteomics 기술에 연구력이 집중하고 있는 상태임.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1 절 탄저균의 병원성 차이에 의한 proteomics 분석

1. 연구 방법

가. 세포의 배양

생쥐 대식세포는 한국 세포주 은행 (KCLB, Seoul, Korea)에서 분양받은 RAW 264.7 (ATCC TIB-71)를 10 % FBS와 1 % Penicillin/Streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 세포를 배양하여 사용하였다. 사람 대식 세포는 혈액으로부터 단핵구 (monocyte)를 Histopaque (Sigma co.)를 이용하여 분리한 다음 인산완충액 (PBS buffer, pH 7.2)로 3회 세척한 후 DMEM 배지에 현탁 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에 배양한 다음 플레이트에 결합한 세포만을 배양하여 실험에 사용하였다.

나. 탄저균 아포의 분리

탄저균의 아포의 분리는 Dragon과 Rennie의 방법(2001)을 변형하여 추출 및 정제하여 사용하였다. 탄저균의 영양세포를 brain heart infusion (BHI) 배지에 접종한 후 24 시간 동안 배양하여 어느 정도 콜로니가 형성된 것을 다시 변형된 Tarr's 고체배지 (2001)에 접종하여 14일 동안 37 °C에서 배양하여 아포를 형성시켰다. 아포 형성 확인은 포자염색을 이용하여 확인하였고, 고체 배지 상에 형성된 아포를 회수하여 수크로즈 밀도구배원심분리를 이용하여 아포층만을 회수하였다. 얻어진 아포 층에서 0.01 % Triton X-100을 이용하여 수크로스를 제거한 다음 65 °C에서 30 분간 처리한 후 발아를 억제하기 위하여 PBS buffer (pH 7.2)에 넣어 -20 °C에 보관한 후 사용하였다.

다. 대식세포에 탄저균(스턴, 델타스턴) 아포의 감염

생쥐 대식세포 (RAW264.7)에 탄저균의 아포를 감염시키는 것은 Dixon (2001)등이 사용한 방법을 이용하였다. 즉, 마우스 대식세포(RAW264.7)를 1.34×10^6 세포가 되도록 6 well plate (Corning co.)에 나누고, 37 °C, 5 % CO₂ 농도로 2 일간 배양하였다. 이들 배양된 대식세포에 탄저균 (Sterne과 Δ Sterne 균주) 아포를 1.36×10^7 아포 수에 이르도록 처리한 후, 37 °C에서 30 분간 감염시켰다. 감염된 대식세포는 antibiotics-free DMEM 배지를 이용하여 3 회 세척하여 감염되지 않은 아포를 제거한 후 gentamycin (2.5 μ g/ml)의 농도로 처리한 후 대식세포에 DMEM 배지를 첨가하고 배양한 다음, 0 hr, 0.5 hr, 1 hr, 2 hrs, 3hrs, 및 5 hrs 등의 시간에 따라 순차적으로

대식세포의 반응을 분석하였고, 경우에 따라서 total RNA (DNA chip 용)와 단백질 추출 (2-DE 용)에 이용하였다. 사람 대식세포는 사람 대식세포를 플레이트에 1.34×10^7 세포를 배양하고 여기에 사멸된 Sterne (Dead)과 살아있는 Sterne (Live)아포를 1.36×10^8 만큼 처리를 한 다음 30 분간 감염을 시켰다. 감염된 대식세포는 antibiotics-free DMEM 배지를 이용하여 3 회 세척하여 감염되지 않은 아포를 제거한 후 gentamycin ($2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 처리한 후 대식세포에 DMEM 배지를 첨가하고 배양한 다음 단백질 샘플 회수에 이용하였다.

라. 치사독소의 처리

탄저균 치사독소는 Papov (2002)등의 방법에 의하여 농도를 결정하여 처리를 하였으며, 생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포를 플레이트에 6×10^6 개 되도록 분주한 후 37°C , 5 % CO_2 배양기에서 2 시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 세포가 플레이트 바닥에 잘 붙었는지 확인하고 PBS (pH 7.2) 완충액으로 2 회 세척 후 방어항원 $100 \text{ ng}/\text{ml}$, 치사요소 $16 \text{ ng}/\text{ml}$ 을 첨가하였다. 다시 37°C , 5 % CO_2 배양기에서 10 에서 40 분 동안 배양 후 플레이트를 PBS (pH 7.2) 완충액으로 2 회 세척하였다. 그런 후, 다음 과정을 수행하였다.

마. 2-DE 샘플의 준비

탄저균에 따라 생쥐 대식세포에서 발현이 증감되는 단백질을 proteomics 기술로 확인 (병원성에 따라 반응하는 단백질을 2-DE 방법으로 스크리닝)하기 위해서 대식세포에 아포를 처리하여 37°C , 5 % CO_2 농도로 배양하면서 1 hr, 3 hr, 및 5 hr 동안 배양되어진 세포를 $2,500 \text{ rpm}$, 4°C 에서 원심 분리하여 회수하였다. 회수된 세포에 2 % SDS가 포함된 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 넣은 다음, proteinase inhibitor cocktail (Roche Co.)과 DNase (Roche Co.)를 처리한 후 1 ml syringe를 이용하여 세포를 완전히 파쇄한 후 실온에서 한 시간 동안 방치 후 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 실온에서 $14,000 \text{ rpm}$, 30min 원심 분리하여 상등 액을 회수하였다. 회수된 단백질을 -80°C 에 보관한 후 사용하였다. 사람 대식세포는 차가운 인산완충액 (PBS buffer, pH 7.2)을 이용하여 세척한 후 7 M Urea, 2 M Thio-urea, 4 % CHAPS, 1 % DTT, 2 % pharmalyte가 포함된 용액을 첨가하고 homogenizer (Powergen 125, Fisher Scientific)를 이용하여 용해 시켰다. 그런 다음 $15,000 \times g$ 에서 1시간동안 원심 분리하고 상등 액을 회수하여 2 차원 전기영동 샘플로 이용하였다. 단백질의 정량은 Bradford assay에 의하여 정량하여 사용하였다.

마. 2-dimensional electrophoresis 및 MALDI-TOF 시료 확보

샘플에서부터 추출된 단백질 10 μ l를 rehydration buffer (8 M urea, 2 % CHAPS, 2 mM DTT, carrier ampholyte (pH 3-10), 0.001 % bromophenol blue) 180 μ l와 잘 혼합한 후 IPG strip (Bio-rad, pH 3-10)에 올린 다음 50 v, 14 시간 동안 rehydration을 수행하였다. 그런 후 250 v (15 min), 250-4,000 v (2 hrs), 및 4,000 v (5 hrs) 동안 등전점 전기영동을 수행하였다. 2-dimensional SDS-PAGE를 수행하기 전에 IPG gel은 equilibration buffer I (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 6 M urea, 2% w/v SDS, 30 % w/v glycerol, 1 % w/v DTT)에서 10 분 간 세척한 다음, equilibration buffer II(50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 6 M urea, 2 % w/v SDS, 30 % w/v glycerol, 5 % w/v iodoacetamide)에서 10 분 간 세척하였다. 이 IPG strip을 slab gel 위에 올린 다음 SDS-PAGE electro buffer를 첨가한 0.5 % agarose을 녹여서 IPG strip을 고정시켰다. Second-dimensional SDS-PAGE는 Mini-protean II system (Bio-rad Co.)을 이용하여 수행하였으며, 12 % acrylamide gel을 이용해 10 mA (1 hr), 15 mA (3 hr), 20 mA (30 min)에 의하여 분리하였다. 분리된 겔은 Coomassie brilliant G-250을 이용하여 염색을 한 다음 scanner를 이용하여 이미지를 얻고, 이미지 분석에 이용하였다. SDS-PAGE gel image의 spot의 분석은 PDQuest Ver 6.0 (Bio-rad Co.)를 이용하여 분석하였다. Spot의 image분석에 의하여 up-regulation 또는 down-regulation 되는 spot 만을 분리하였다. 확정된 spot은 트립신으로 in-gel digestion 처리하여 MALDI-TOF 시료로 사용하였다. 사람 대식세포의 경우는 7 M Urea, 2 M thio-urea, 4 % CHAPS, 1 % DTT, 2 % pharmalyte가 포함되어 있는 용액에 단백질 200 μ g을 주입하고 등전점 전기영동은 초기 150에서 3,500 V까지 올린다음 3,500 V에서 3 시간동안 분리하였다. 그런 후 equilibration 과정을 거쳐서 SDS-PAGE를 수행하여 단백질을 분리하였다.

사. SELDI-TOF를 이용한 탄저균 치사독소에 반응하는 단백질 분석

Protein-chip array로부터 탄저균 치사독소에 반응하는 단백질을 찾아내기 위하여 생쥐대식세포에 치사독소를 처리한 후에 2 % ampholyte (Bio-Rad Co.), 7 M urea, 2 % CHAPS, 40 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 처리한 다음, 세포를 완전히 용해한 후 proteinase inhibitor cocktail (Roche Co.)과 DNase (Roche Co.)를 처리한 후 1ml syringe를 이용하여 세포를 완전히 파쇄한 후 실온에서 한 시간 동안 방치 후 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 실온에서 14,000 rpm, 30 min 원심 분리하여 상등 액을 회수하였다. 회수된 단백질을 -80 $^{\circ}$ C에 보관한 후 사용하였다. Protein-chip array는 reverse-phase chip에 100 μ l의 치사독소가 시간별로 처리된 lysate를 올린 후 단백질

을 칩 표면에 올렸다. 그런 후, binding buffer를 첨가한 후에 vigorous하게 혼합을 한 다음 binding buffer로 다시 한번 처리를 해주었다. EAM을 첨가해준 다음, 건조시킨 다음 protein-chip을 한 spot당 5번씩 읽어서 결과를 확인하였다.

2. 연구 결과

가. 대식세포에 탄저균 스테인 및 델타스테인 아포의 감염

1) 대식세포에 탄저균 스테인 및 델타스테인 아포의 감염

Dixon 등의 방법(2001)에 의하여 탄저균 Sterne 및 Δ Sterne 아포를 각각 RAW 264.7 세포에 처리하면 Fig. 1-1과 같이 감염된 아포를 관찰 할 수 있었다. 또한 약 10 분 정도 경과하면 대식세포와 상호작용을 하는 아포를 관찰할 수 있었다. 본 실험의 결과 감염이 안 된 아포도 관찰할 수 있었으며, 감염이 안 된 아포는 gentamycin (2.5 mg/ml)을 처리하여 제거를 한 다음, 후속 실험을 수행하였다. 감염된 아포는 본 실험의 결과에 따르면, RAW 264.7 세포에 감염이 된 후에 검출할 수 있었으며 (Fig. 1-1), 또한 감염 후 약 2 시간이 경과 되면서 대식세포의 형태가 약간씩 변화하기 시작하는 것을 확인하였다.

2) 생쥐 대식세포에 감염된 탄저균 아포의 2차원 전기영동 및 웨스턴 블랏

탄저균 아포의 감염초기에 있어서 대식세포와의 어떤 상호작용이 발생하는지 확인하기 위하여 2차원 전기영동기술을 이용하여 확인하였다. 생쥐 대식세포에 탄저균 Sterne과 Δ Sterne 아포를 감염시킨 후 감염초기의 대식 세포를 회수한 후에 2-DE를 이용하여 탄저균 Sterne과 Δ Sterne 아포의 병원성에 따라서 감염초기에 대식세포에서 증감되는 단백질을 관찰하였다 (Fig. 1-2). 탄저균 델타 스테인과 스테인 아포를 감염시키고 난 후 생쥐 대식세포의 단백질 발현을 비교해본 결과 감염을 시킨 후에 1시간되었을 때 대략 200 ± 20 spot이 관찰되었다. 하지만 본 연구에서는 Coomassie brilliant G-250 염색을 수행하여서 많은 수의 spot을 관찰할 수는 없었으나 각각의 샘플에 따라 발현양의 차이를 보이는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 2-DE 분석 후에 얻어진 단백질을 동정하기 위하여 MALDI-TOF 분석을 수행하였다. 여기에선 탄저균의 Sterne과 Δ Sterne 아포를 마우스 대식세포에 감염을 시킨 후에 병원성에 의하여 차이가 나는 단백질 들을 동정하였다. 얻어진 결과를 Table 1-1에 나타내었다.

3) MALDI-TOF/MS분석

이미지 분석이 끝난 샘플은 MALDI-TOF에 의하여 분석을 수행하였다. Chromatogram을 분석한 후에 MALDI-TOF (<http://www.matrixscience.com/>) 데이터베이스에 의하여 구분 하였으며, 구분이 확인된 단백질은 Table 1-1에 나타내었다. △Sterne과 Sterne의 아포감염 2-DE 실험에서 스테인 아포를 감염시킨 생쥐 대식세포에서 단백질이 30 분경과 후에 감소되었다가 90-120 분 사이에서 증가되는 것을 관찰 되었다. 그 중에서도 탄저균 아포와 생쥐 대식세포의 초기 상호작용에 관여하여 증감되는 대표적인 단백질은 ITBG-2, HSPA5, GNA-13, syndapin 1, 및 CDC-46 등이 확인 되었다 (Table 1-1).

4) Western blot

질량 분석기를 이용하여 분석을 수행한 다음, 그 중에서 대표적인 발현 양상을 보이는 ITBG-2에 대한 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다. 웨스턴 블랏에 의한 ITBG-2은 델타스테인 아포를 감염 시에는 뚜렷한 변화를 보이지 못하였으나, 스테인 아포를 감염 시에는 60분과 120에서 많은 발현 량의 차이를 확인할 수 있었다(Fig. 1-3).

나. 탄저 병원성 단백질 확인

1) 대식세포에 대한 탄저균 치사독소의 농도결정

대식세포에 대하여 탄저균의 치사독소를 서로 다른 농도로 처리하여 대식세포가 급사하는 농도를 찾고자 MTT assay를 수행하였다, MTT assay로부터 얻어진 결과로부터 치사요소 농도가 8 ng/ml이 넘어서면서 90 분을 기준으로 세포사멸을 일어남을 관찰하였다. 탄저균의 치사요소농도가 8 ng/ml 이상은 급사수준의 농도인 것으로 확인되었다.

2) 탄저 병원성 단백질에 대한 2-DE 수행

대식세포에 대하여 급사수준인 방어항원 100 ng/ml, 치사독소 16 ng/ml을 생쥐대식세포에 처리하여 생쥐대식세포 단백질의 발현양상을 시간별 (10, 20, 30, 40 분)로 2-DE를 수행하여 관찰하였다. 생쥐 대식세포로부터 단백질의 추출은 전체 단백질을 추출하여 수행하였으며, pH의 기울기가 3-10인 스트립을 이용하여 2-DE를 행하였다. 이미지분석은 Densitometer로 스캐닝하고 Melanie 2를 이용하여 분석하였다. 생쥐대식세포의 단백질 양상 발현을 비교해 본 결과 (Fig. 1-4), 방어항원만을 처리한 대조군의 경우와는 달리 처리시간에 따라서 단백질 변화양상을 관찰할 수 있었다. 특히, 탄저균 치

사독소를 처리하고 시간별로 2-DE를 수행하였을 시 spot의 변화를 관찰할 수 있었다. 20분 처리샘플의 결과 동일한 염색시간과 탈색시간을 주고 실험하였을 경우, 이미지 분석을 하는데 있어서 약간의 차이를 나타내었다. 2-DE 수행 후의 이미지 분석은 Fig. 1-5에 대조군과 10분 처리를 했을 때의 이미지 분석을 나타내었다. 아래의 Fig. 1-6에서 8까지는 탄저균 치사독소에 의하여 발현의 증감되는 단백질의 양상을 보여주고 있으며 또한 coverage map과 error map을 같이 보여주고 있다. Fig. 1-6의 hypoxia up-regulated 1은 치사독소를 처리한 후 10 분에서 가장 많은 발현 양상을 보여 주었으며, PP2A는 시간 변화에 따라서 점점 감소하는 것으로 보였다. Heat shock protein HSP 60은 치사독소 처리 후 30 분경과 시에 많은 양이 발현 되는 것을 확인 하였다.

3) 탄저 병원성 단백질의 LC-MS/MS의 분석

탄저균의 방어항원과 치사요소를 처리하여 2-DE를 수행하고 시간별로 처리되어진 치사독소에 의하여 차이를 나타내는 단백질을 LC-MS/MS를 이용하여 동정하였다 (Table1-2). 전체 17개의 단백질을 선택을 하여 동정을 하였으며, 각 기능별로 보면 다음과 같다. Stress에 관여하는 calcium binding protein으로서 HSP 70을 가지고 있는 CAB140, NUCB 1, HSP 60등의 단백질 발현의 차이가 있었으며, 대사작용에 관련된 단백질은 ACN A, ECO 1, Adolase 3-C등과 glycolysis에 관여하는 PKM 2, PKM 3등이 발현에 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 또한, intermediate filament에 관여하는 lamin A, lymphocyte cytosolic protein 1, VIM등이 차이가 보였으며, neurexin 2A와 같은 cell recognition adhesion, PPP2R1A같은 scaffolding molecules 등이 치사독소처리를 하였을 시에 발현의 차이를 확인할 수 있었다. 신호전달과 수용체에 관련된 CAP 1과 LOC 116177등의 단백질 발현의 변화 패턴을 확인할 수 있었다.

다. SELDI-TOF에 의한 탄저 병원성 단백질 분석

Protein-chip array에 의한 SELDI-TOF 분석은 생쥐대식세포에 탄저균 치사독소를 처리하여 reverse-phase chip에 올려서 고정 시킨 다음, SELDI-TOF에서 분자량 10 kDa-50 kDa 까지의 변화된 단백질을 분석하였다. 치사독소에 의하여 영향을 받는 것으로 확인되는 것은 분자량 12 kDa, 13 kDa, 14 kDa, 15 kDa, 17 kDa 부근에서 치사독소에 의하여 영향을 받는 것으로 사료되는 단백질들의 변화가 있었다. 또한, 분자량 22 kDa 부근에서도 치사독소의 영향을 받는 것으로 보이는 단백질들을 확인할 수 있었다. 이 단백질들은 탄저균 치사독소에 의해서 영향을 받는 단백질로서 중요한 의미를 가질 것으로 보이며, 탄저균 감염에 대한 중요한 생체 마커로서도 활용이 가능하리라 사료된다.

라. 사람 대식세포에 탄저균 아포의 감염에 대한 프로테옴 분석

1) 사람 대식세포의 2-DE분석

사람 대식세포에 탄저균 아포를 감염을 시켜 2-DE를 이용하여 변화되는 단백질을 관찰 하였다. 샘플은 탄저균 살아있는 Sterne과 죽은 Sterne 아포를 이용하였다. 2-DE분석을 위하여 전체 단백질 200 μ g을 pH 4-10의 기울기를 가지고 있는 strip에 주입한 후 수행하였다. 염색은 alkaline silver staining을 이용하여 수행하였으며 보통 1600 \pm 200 /gel의 spot이 검출되었으며 본 실험은 같은 조건으로 3 회 반복수행을 하였다. Fig. 1-12는 2-DE의 부분 이미지를 보여주고 있다. 여기에 동정된 단백질을 표기하였으며 본 이미지는 가장 단백질 발현의 차이가 많이 나는 90분의 이미지를 보여주었다. 본 연구에서는 2-DE 분석에서 90분과 120분이 가장 많은 차이를 나타내었다 (Fig. 1-12).

2) MALDI-TOF 분석과 단백질 동정

2-DE분석 후에 이미지 분석은 PdQuest 7.0을 이용하여 분석을 실시하였으며, 그것들 중에서 155 개를 선별한 다음 21 개의 단백질을 동정하였다 (Table 1-3). Fig. 1-13은 동정된 단백질들의 발현 양상을 보여주고 있다. Fig. 1-14는 PAK2로 동정된 단백질의 chromatogram을 보여주고 있으며, 이는 0.1 kDa까지 동정할 수 있는 MALDI-TOF를 이용하여 분석하였으며, Fig. 1-14와 같이 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 얻어진 단백질들은 ProFound(http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe)

데이터베이스를 이용하여 동정하였다. 하지만 2 개의 단백질은 분석하지 못하였다.

3) 사람 대식세포에 탄저균 아포 감염에 의한 단백질 발현

사람 대식세포에 탄저균 아포를 감염 시에 가장 대표적으로 발현이 차이가 나는 것은 감염 후 90분이었다. 이것들에서 가장 대표적으로 증감되는 단백질을 특징별로 분류를 하였다. 즉, 신호전달 (PAK2, RhoGAP, RabGD1-beta), Chaperones (HSPA8, TLP-19), Actin binding (Coronin1B), Translation (RRP41), Hypothetical protein (LOC145710), PAPLOA, CFL1, Proteasome (26S), Ubiquitin-conjugating E2N, Thimet oligopeptidase 등 이었으며 이들 특징은 Table 1-3에 자세히 표기하였다. Fig. 1-15에서 볼 수 있는 것처럼 90분에서 차이를 보였다. Proteasome 같은 경우는 전체적으로 살아있는 아포에서 더욱 많이 발현 되었으며, 감염 후 90분에서도 3배 이상 발현 차이를 보였다. PAK2는 죽어있는 아포에서 발현이 많이 되었으며, 살아있는 아포에서는 발현이 많이 되지는 않았다. 감염 후 90분 경과에서도 살아있는 아포보다도 3배

가량 증가되어 발현이 되었다. 여기에서는 대표적인 단백질 발현 양상만을 보여주었다.

4) PAK2의 발현 분석

세포의 사멸 (apoptosis)와 관련 있는 단백질인 PAK2는 본 연구에서 죽은 아포를 처리하였을 시에 많이 발현됨을 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하였다 (Fig. 1-16). 마찬가지로 약 90분과 120분에서 발현이 많음을 관찰할 수 있었다. PAK2는 세포 사멸 시에 두개의 단편으로 나누어지는데, regulatory domain (28 kDa)과 catalytic domain (34 kDa)으로 나누어진다. 이들 중 세포 사멸과 직접 관계가 있는 catalytic domain의 발현을 핵 (nuclear)에서 확인을 하였다 (Fig. 1-17). 이들은 죽은 아포를 처리 시에 핵에서 아주 작은 양만이 확인 되었으나, 살아있는 아포를 처리하였을 시에는 90분에서 가장 많은 양을 확인 할 수 있었다 (Fig. 1-17). 이는 탄저균 아포가 사람 대식세포에 감염 되었을 시에 세포 사멸에 관여하는 하나의 요인으로 추측된다.

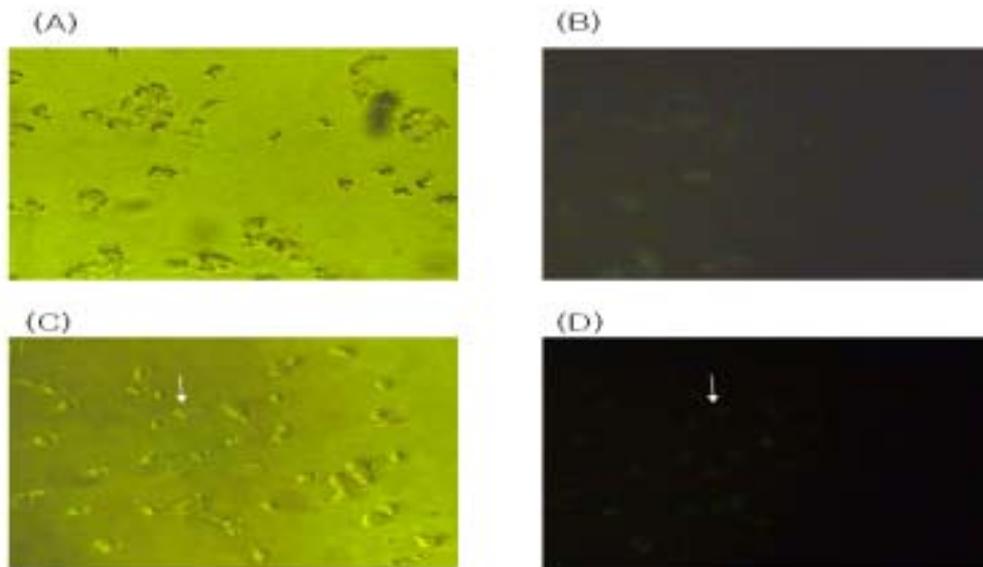


Fig. 1-1. Detection of *Bacillus anthracis* vegetative forms after germination in murine macrophage RAW264.7 using *B. anthracis* BA antibody (Arrow head indicates *Bacillus anthracis* vegetative cell). A, no infection; B, no infection using immunofluorescence with BA antibody; C, infection; D, infection using immunofluorescence with BA antibody

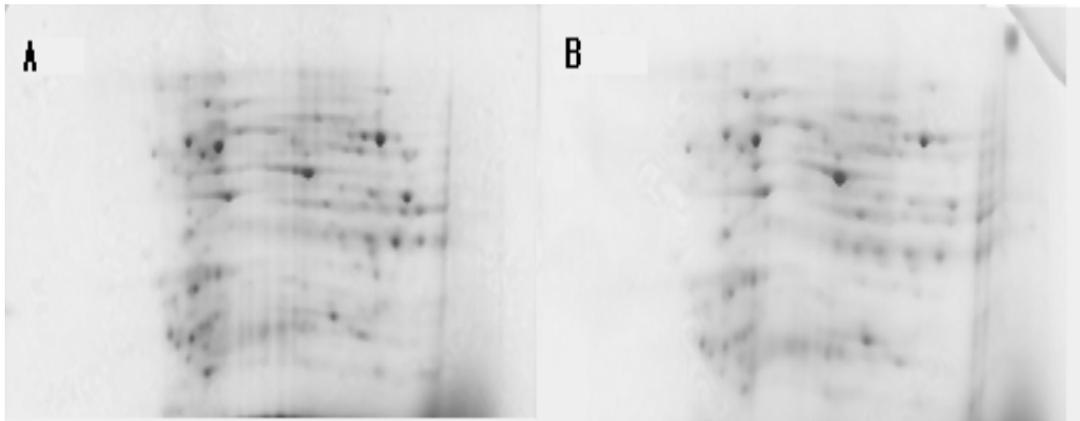


Fig. 1-2. Two-dimensional gels of murine macrophage RAW264.7 cells after infection by *Bacillus anthracis* ΔSterne (A) and by *Bacillus anthracis* Sterne (B) strain for 1 hour incubation.

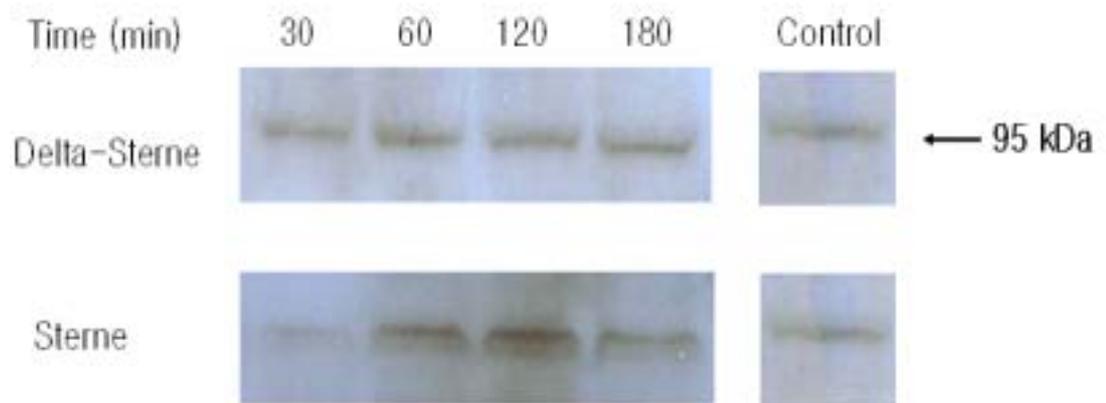
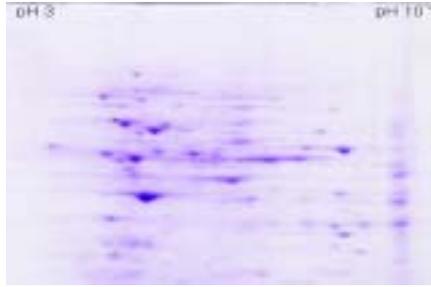
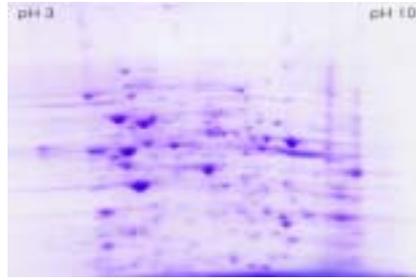


Fig. 1-3. Western blot analysis of ITBG-2 expression. Arrow head indicates ITBG-2 molecular weight

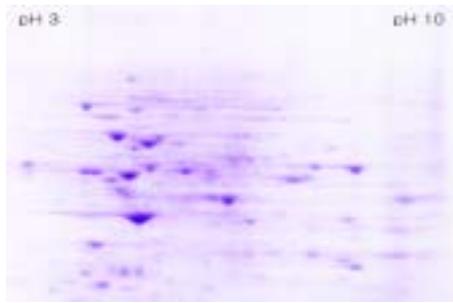
(A)



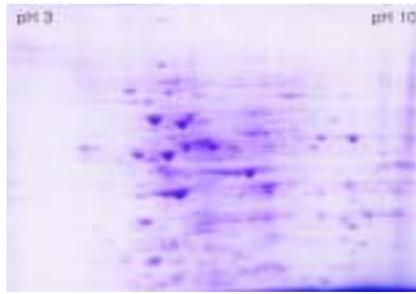
(B)



(C)



(D)



(E)

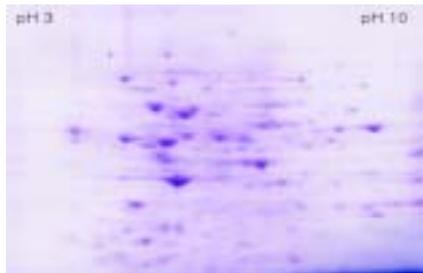


Fig. 1-4. Protein expression patterns of murine macrophage cells(RAW264.7) with treated-lethal toxin (A, ;control (only PA), B, ;10, C, ;20, D, ;30, E, ;40 mim).

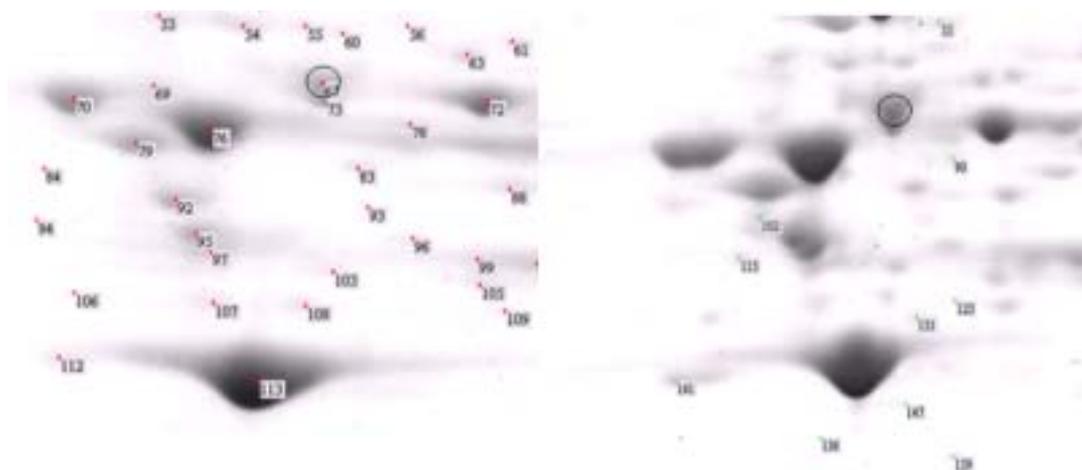


Fig. 1-5. Zoomed-in regions of 2-DE gel images for HSP 60 gel regions (at 0 and 30 min). Depicted gel areas correspond to circles. Arrowheads point to protein spot of interests. Spot: Heat shock protein 60.

(a)



(b)



Fig. 1-6. Comparison of the protein expression patterns of hypoxia up-regulated 1. (a) Protein expression pattern; (b) coverage map and error map

(a)



(b)

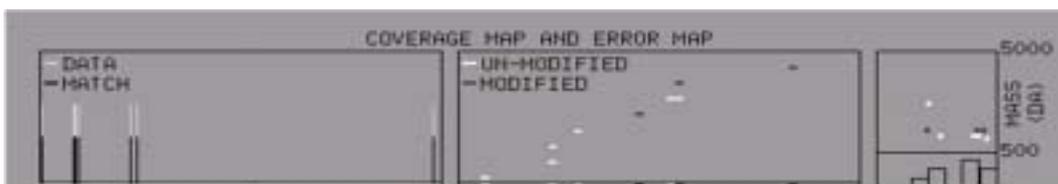


Fig. 1-7. Comparison of the protein expression patterns of PP2A.

(a) Protein expression pattern; (b) coverage map and error map.



Fig. 1-8. Comparison of the protein expression patterns of HSP 60.

(a) Protein expression pattern; (b) coverage map and error map.

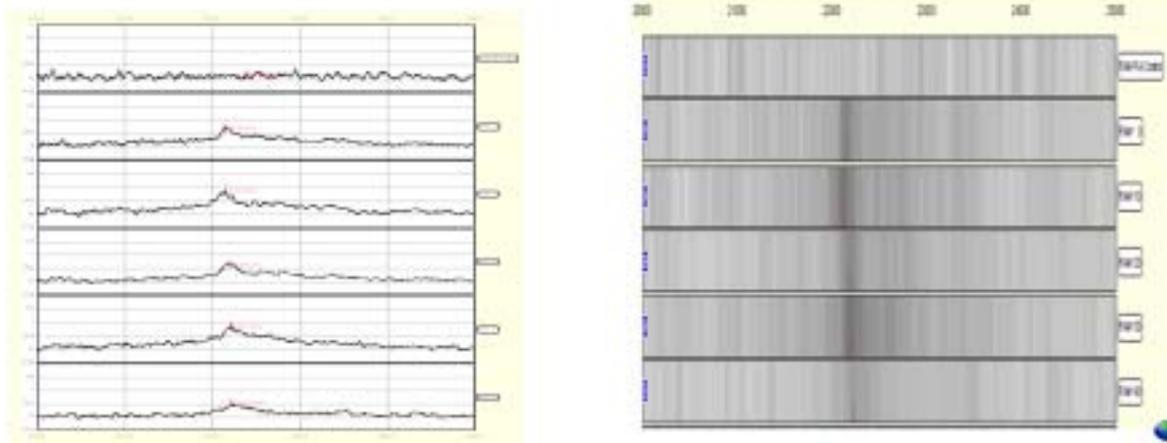


Fig. 1-9. Protein expression profiling of lysates from murine macrophage cells (RAW 264.7) with the treated LeTx (MW 20kDa~35kDa)

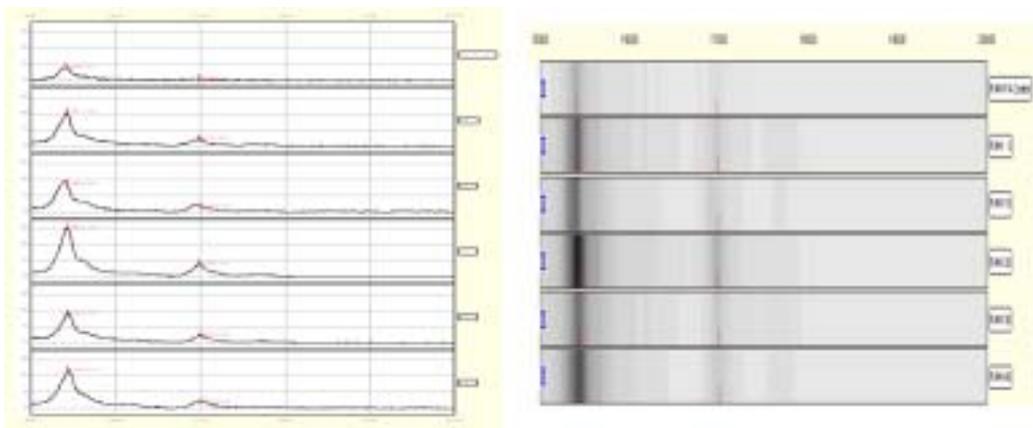


Fig. 1-10. Protein expression profiling of lysates from murine macrophage cells (RAW 264.7) with the treated LeTx (MW 15kDa~20kDa)

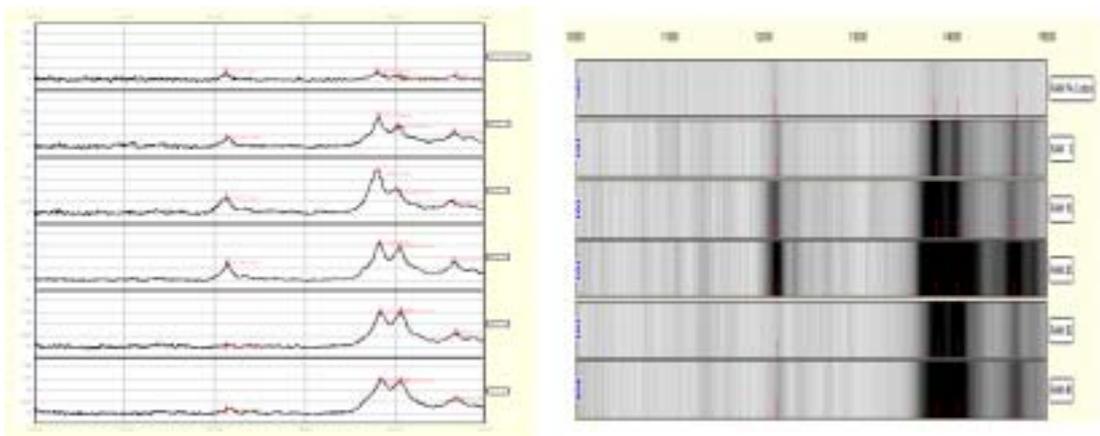


Fig. 1-11. Protein expression profiling of lysates from murine macrophage cells (RAW 264.7) with the treated LeTx (MW 10kDa~15kDa)

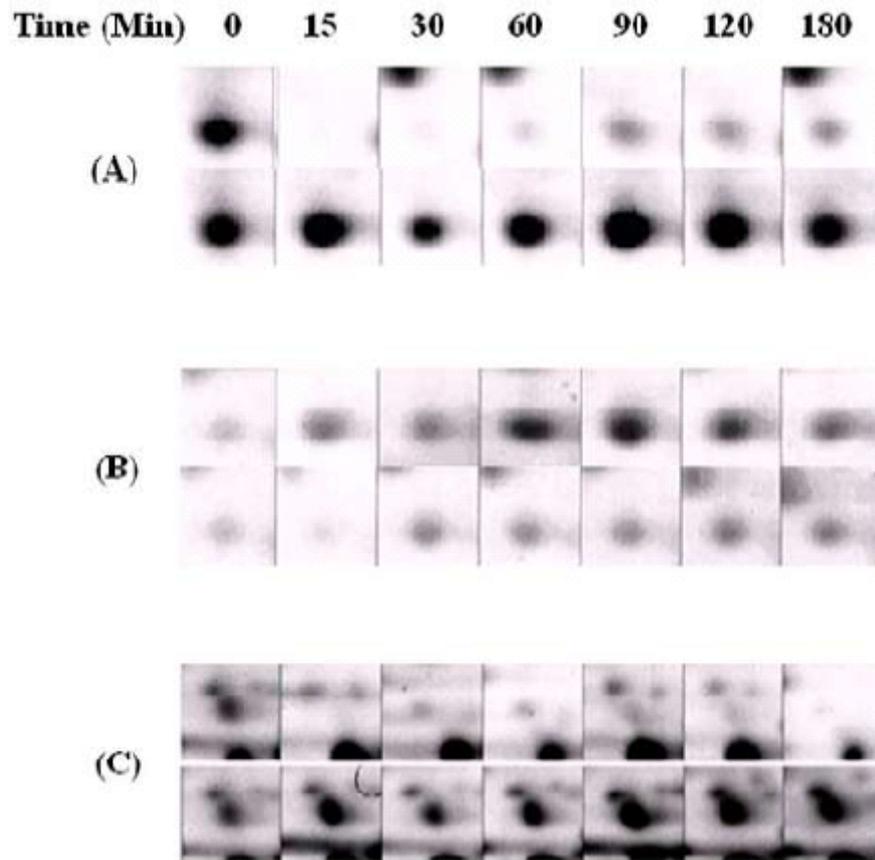
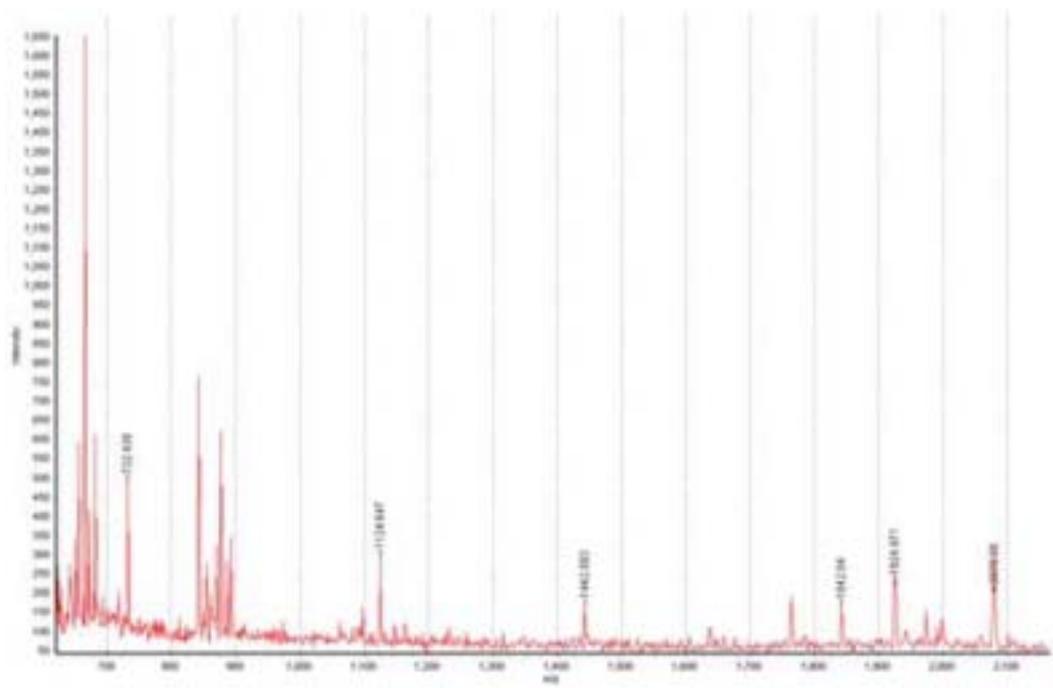


Fig. 1-13. Comparison of the protein expression pattern of infected *Bacillus anthracis* spores on human macrophage cells from 0 to 3hrs. Inactivated-Sterne (upper) and live-Sterne spore (lower). The figure displays sectors of interest of pH 4-10, 2-DE. A, proteasome (26S) B, PAK2 C, RabGDI-beta.



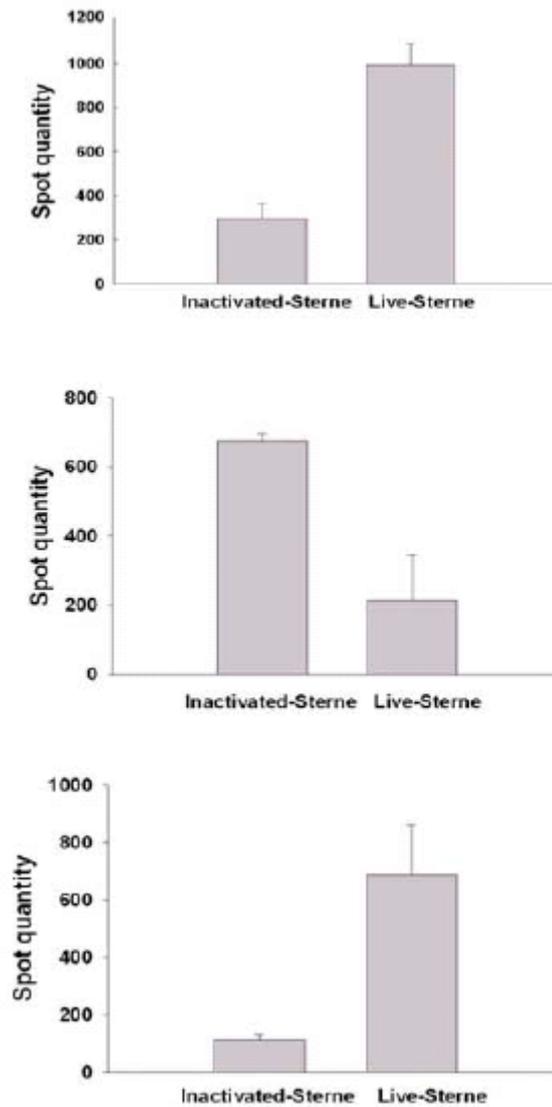


Fig. 1-15. Quantities of proteins by Inactivated-Sterne and live-Sterne spore at 90 min. The protein spots that appeared in 2-DE gels were quantitatively analyzed with PdQuest analysis program. (A), Proteasome; (B), PAK 2 (C), RabGDI-beta. Three independent experiments of 2-DE analysis of each time points gave the SD value depicted as an error bar.

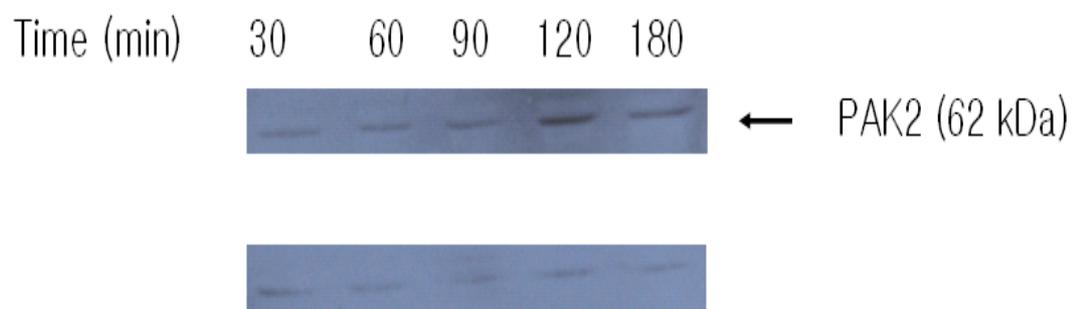


Fig. 1-16. Expression of full-length PAK2 in human macrophage cells. Arrow indicate full-length PAK2 expression pattern. Inactivated-Sterne (upper) and live-Sterne spore (lower).



Fig. 1-17. Expression of PAK2-p34 in human macrophage cells. Arrow indicate molecular weight. Inactivated-Sterne (upper) and live-Sterne spore (lower).

Table 1-1. Peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF

Gene names	Descriptions	Acession no.	Mr ^a	pI ^a	Origin
ITBG-2	Intergrin beta-2	P11835	950006.84		<i>Mus musculus</i>
GNA-13	Guanine nucleotide binding protein alpha-13 subunit	P27601	440278.41		<i>Mus musculus</i>
HSPA5	Glucose-regulated protein precursor(GRP-78)	P20029	723195.09		<i>Mus musculus</i>
Syndapin 1 (or Pacsin 1)	PKC and casein kinase substrate in neuron protein 1	Q9ZOW5	504185.15		<i>Mus musculus</i>
CDC-46	DNA replication licensing factor MCM5	P49718	822908.70		<i>Mus musculus</i>

a) Theoretical Mr and pI value are listed

Protein analysis method was peptide mass fingerprinting using MALDI-TOF analysis.

Table 1-2. Peptide mass fingerprinting using LC-MS/MS analysis

Spot No.	Protein information	NCBI	pI	Molecular Weight (kDa)
C-2	Hypoxia up-regulated 1	NP_067370	5.1	111.45
C-26	Aconitase 2	NP_542364	8.4	86.37
C-37	Lamin A	S27267	6.3	74.23
C-43	Similar to plastin 2	AAH22943	5.2	70.91
C-53	Serine/threonine phosphatase 2A	P54612	5	65.3
C-59	Pyruvate kinase M2	P52480	7.2	57.87
C-63	Neurexin 2	NP_446298	5.7	187.9
C-67	HSP 60 protein	CAA37654	5.3	58.12
C-69	Nucleobindin I (CALNUC)	Q02819	5	53.39
C-71	Pyruvate kinase 3	NP_035229	7.2	57.9
C-77	Vimentin	NP_003371	5.1	53.67
C-82	Adenylyl cyclase-associated CAP protein	NP_031624	7.2	51.98
C-112	Similar to laminin receptor I	XP_053454	9.8	19.77
C-135	Apolipoprotein A	AAB58429	5.5	29.9
C-203	Regulating synaptic membrane exocytosis 2	NP_444501	9.5	173.98

Table 1-3. List of identified proteins on 2-D gels, pH 4-10

Spot numbers	Proteins	Accession No.	Description	MW (KDa)	pI
2017	ERP 19	<u>NP_056997</u>	Electron transporter	19.36	5.2
3312	Proteasome (26S)	<u>XP_043220</u>	Protein degradation	43.19	5.5
3507	PAP	<u>NP_116021.2</u>	mRNA polyadenylation	83.28	7
3612	Coronin 2	<u>NM_020441</u>	Actin-binding protein	54.9	5.6
3614	PAK 2	<u>U25975</u>	Serine/threonine kinase	55.18	6
3716	HSP 73	<u>XM_050982</u>	Chaperone	53.61	5.6
4110	RRP 41	<u>Q9NPD3</u>	Exonuclease activity, RNA binding	26.65	6.31
4509	Pyruvate kinase	<u>S64635</u>	Kinase	58.49	8.4
4518	RabGDI-beta	<u>AAD34558</u>	Phagosome-lysosome inhibitor	41.42	8.3
4718	Similar to thimet oligopeptidase	<u>AAH13878</u>	Protein degradation	79.72	5.7
5002	Ubiquitin conjugating E2N	<u>NM_003348</u>	Covalent attachment of ubiquitin	17.18	6.1
5302	Protein phosphatase 1	<u>NM_002709</u>	Cell division	37.97	5.8
5304	Transaldolase 1	<u>NP_006746</u>	Transport and metabolism	37.69	6.4
5718	RIKEN cDNA	<u>XP_133217</u>	Unknown	70.17	5.6
6003	Cofilin 1	<u>NP_005498.1</u>	Actin modulating activity	18.71	8.5

2 절 탄저 치사독소 기능 분석

1. 연구 방법

가. 탄저균 스톤 균주에서부터 방어항원과 치사요소의 분리정제

탄저균 스톤 균주를 RM media에서 진탕 배양한 뒤 원심 분리하여 배양액을 회수하였다. 이를 filter하여 cell-free filtrate을 얻은 뒤 hydroxyapatite (Fast flow, Calbiochem.)를 이용하여 filtrate 내의 방어항원과 치사요소를 흡착시켰다. Hydroxyapatite를 사용하여 모은 뒤 이를 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5로 2회 세척하고 1 M potassium phosphate buffer, pH 7.0 을 이용하여 elution하여 분리하였다. 얻어진 eluent를 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 용액에서 dialysis를 수행하였다. Hydroxyapatite로 일차 정제 되어진 탄저균 독소를 ion exchange column (Mono-Q, FPLC system)을 이용하여 2 차 정제하였다.

나. 방어항원과 치사요소의 대량발현 체제 구축

탄저 독소 (방어항원과 치사요소)를 대량 발현하기 위하여 PA 및 LF 유전자를 박테리아 발현 벡터(expression vector)인 pET22b, pGEX-KG에 각각 subcloning하였다. 먼저 균주에서 pXO1 plasmid를 얻기 위하여 전체 DNA를 분리 정제하였다. 얻어낸 DNA에서 PA와 LF 유전자를 얻기 위하여 이들에 대한 specific oligonucleotide를 제작하고 PCR을 통하여 target gene을 isolation/amplification하였다. 증폭된 PCR 산물을 agarose gel 전기영동을 통하여 각각의 유전자를 확인하여 확보하였다. 확보한 유전자를 bacterial expression vector (pET-22b 혹은 pGex-KG)에 삽입하였다. Recombinant protein은 분리정제를 용이하게 하기 위하여 모두 purification tag을 가진 fusion protein의 형태로 발현되어지게끔 제작하였다. Subcloning 되어진 방어항원 유전자(pET-22b/PA)과 치사요소 (pGEX-KG/LF) 유전자는 제한효소맵과 DNA 염기서열 결정으로 각각의 유전자임을 확인하였다.

다. 방어항원과 치사요소의 유전자 재조합을 이용한 대량생산 및 분리정제 확립

대량발현 체제를 구축하기 위하여 PA, LF를 박테리아 발현 벡터(expression vector)인 pET22b, pGEX-KG 에 각각 subcloning 하였다. 이를 위하여 먼저 균주에

서 pXO1 plasmid를 얻기 위하여 Total DNA를 분리 정제하였다. 얻어낸 DNA에서 PA 와 LF 유전자를 얻기 위하여 이들에 대한 specific oligonucleotide를 제작하고 PCR을 통하여 target gene을 isolation/amplification 하였다. 이를 agarose gel 전기영동을 통하여 각각의 유전자를 확인하여 이를 확보하였다. 확보한 유전자를 bacterial expression vector (pET-22b, pGEX-KG)에 삽입하였다. Recombinant protein은 분리정제를 용이하게 하기 위하여 모두 purification tag를 가진 fusion protein의 형태로 발현되어지게끔 제작하였다. Subcloning 되어진 방어항원 (pET-22b/PA)과 치사요소 (pGEX-KG/LF)는 restriction enzyme mapping과 DNA sequencing을 통하여 제대로 들어 갔는지 확인하였다. 모든 재조합 단백질은 분리과정을 용이하게 하기 위한 purification tag를 삽입하였다. 치사요소의 경우 아미노 말단 지역에 GST를 삽입하여 GSH-Sepharose를 이용한 one-step affinity purification method를 확립하였으며 방어항원의 경우는 카복시 말단에 histidine tag를 삽입하여 one-step metal affinity purification method를 이용하여 빠른 시간에 높은 정제도를 가진 단백질을 얻을 수 있었다.

라. 치사요소의 in vitro assay system 확립 및 protease 특성분석

치사요소의 기질과 효소 사이의 구조와 기능간의 심도 있는 분석을 위하여 기존의 synthetic peptide를 이용한 assay 법이 아닌 native structure 형태의 full-length MEK1을 유전자 재조합의 방식을 이용하여 생산하였다. 또한 치사요소에 의하여 절단되는 부위가 MEK1 Pro8 과 Ile9 사이임을 감안하여 절단 유무를 쉽게 판별할 수 없는 바 유전자 재조합을 할 때 MEK1 아미노 말단에 GST를 삽입시킴으로써 짧은 아미노 말단 부위의 절단여부를 쉽게 관찰하고자 하였다. 기질을 준비한 뒤 standard condition 으로 25 mM phosphate buffer, pH 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂, 0.1mM CaCl₂, 10mM MgCl₂, and 10 % glycerol 의 반응 buffer에서 치사요소 0.5-1 μ M 과 기질 0.5 μ M을 넣어 37°C에서 1시간동안 반응 시켰다. 반응물을 10% SDS/PAGE를 통하여 기질의 절단 유무를 확인하였다. 즉 재조합 기질은 MEK1(44 kDa)과 GST (28 kDa)의 fusion form이며 절단 이후에는 MEK1의 짧은 아미노말단 (1-8 amino acid)와 더불어 GST moiety가 떨어져 나감으로써 분자량의 변화로 쉽게 감지할 수 있다. 또한 high-throughput inhibitor screening을 위한 immobilized assay를 위하여 GSH-Sepharose와 resin bound form의 GST-LF를 96 well-plate 에 settle down 시킨 뒤 위와 동일한 반응 완충액을 넣어주어 활성측정 여부를 관찰하고자 하였다.

마. 치사요소의 새로운 substrate 검색

치사요소의 *in vitro* substrate screening를 위하여 immobilized assay에서 사용한 resin bound form의 GST-LF와 치사독소의 대상세포로 알려진 RAW264.7 cell의 total cell extract를 준비하여 이들을 standard buffer 조건하에서 반응시켰다. 반응 후 원심분리를 통하여 치사독소를 제거하고 상층 액을 acetone precipitation을 통하여 농축시킨 뒤 같은 양의 단백질을 2-DE gel electrophoresis를 통하여 변화가 일어난 단백질을 찾았다.

바. 치사요소의 활성 검정법 (assay method)의 확립

효소 촉매활성 특성을 규명하고자 치사요소에 의하여 절단이 일어나는 지역을 바탕으로 한 합성 펩타이드를 이용한 효소 활성측정 방법이 사용되어 왔으나 근래의 보고에 많은 보고는 이를 이용한 방법이 치사요소의 높은 기질 특이성을 감안하여 볼때 충분치 않음을 보여주었다. 또한 기질인 MAPKK의 카복시 말단 (C-terminus)이 치사요소의 단백질 가수분해 활성 및 기질 특이성 (substrate specificity)에 중요하다는 연구결과를 이를 뒷받침하는 것이라 할 수 있을 것이다. 이에 본 실험실은 합성 펩타이드가 아닌 기질 MEK1의 전체를 이용한 활성 검정법을 이용하여 치사요소의 활성의 특징을 규명하고자 하였다. 이를 위하여 기질인 MEK의 절단부위가 아미노 말단에 치우쳐 (Pro8-Ile9 of MEK1) 이를 확인하기가 어려운 점에 착안하여 아미노 말단 부위에 28 kDa의 크기를 가진 GST (glutathione-S-transferase)를 융합시킨 상태로 발현하도록 유전자 재조합 하여 기질을 준비하였다. 효소활성 검정은 준비한 기질 GST-MEK의 절단정도를 SDS/PAGE 상에서 측정하였다. 효소를 금속이온 Chelator 인 1,10-phenanthroline (10 mM)을 넣은것과 그렇지 않은 상태로 37°C에서 20 분간 반응시킨뒤 반응용액 (25 mM phosphate buffer, pH7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10 % glycerol, and 1 μM substrate)을 넣어주고 60분간 더 반응 시켰다 (이상을 표준조건으로 결정하였다). 반응 후 5X SDS/loading buffer를 넣어준뒤 95 °C에서 5분간 끓여 반응을 종결시키고 10 % SDS/PAGE를 이용하여 기질의 절단 여부를 판단하였다.

2. 연구 결과

가. 스티븐 균주에서부터 방어항원과 치사요소의 분리정제

1) 치사요소의 정제

탄저균의 스티븐 균주로부터 방어항원과 치사독소를 분리정제 하기 위하여 스티븐 균주를 3 L의 complex liquid medium (modified RM)에서 진탕배양 하고 이를 filter하여 cell-free filtrate을 얻은 뒤 이를 hydroxyapatite를 이용하여 흡착분리 정제한 결과 90 % 정도의 homogeneity를 관찰하였다. 흡착되어진 탄저 독소는 1 M potassium phosphate, pH 7.0을 이용하여 분리하였을 때 linear gradient elution에서 대략 0.7 M의 농도에서 탄저 독소단백질이 분리되어짐을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2-1, 2-2). 그러나 탄저 독소를 구성하는 3가지 단백질 방어항원(PA), 치사요소(LF), 부종요소(EF)의 분리 peak가 매우 근접하여 1차 정제로는 이들을 분리하기가 매우 어려움을 확인 할 수 있었다. 따라서 본 연구진은 1차적으로 이들 전체 탄저독소를 stepwise gradient 방식 (linear gradient를 이용하지 않고 resin washing 후 final concentration에 해당하는 elution buffer를 직접 넣어주는 방식)을 이용하여 탄저독소 pool을 얻어낸 뒤 이를 Mono-Q (anion exchange column chromatography)를 이용하여 각각의 단백질을 분리하고자 하였다. 1차로 분리한 방어항원과 치사독소를 FPLC system (Amersham bioscience co.)의 Mono-Q column (strong anion exchange chromatography)에 loading 하고 이를 2M NaCl linear gradient를 이용하여 세 가지의 major peak를 분리하고 이를 SDS/PAGE를 통하여 약 85-90 kDa의 단백질 band를 확인하였다 (Fig. 2-2, 2-3).

2) 방어항원과 치사요소의 대량발현 체제 구축

스티븐균주에서 Total DNA를 추출한 뒤 이를 방어항원과 치사요소에 해당하는 specific oligonucleotide를 제작하여 PCR을 통하여 해당 유전자를 증폭하였다 (Fig. 12.). 사용한 방어항원 시발체는 forward primer, PA-F (BamH I) : 5-aag gat cca gaa gtt aaa cag gag aac cgg이고, reverse primer, PA-R (Not I) : 5-aagcggccgc tcc tat ctc ata gcc ttt이었다. 치사요소 시발체는 forward primer, LF-F (Xba I) : 5-aat cta gac gcg ggc ggt cat ggt gat gta와 reverse primer, LF-R (Sal I) : 5-aagtcgac tta tga gtt aat aat gaa ctt를 사용하였다. 증폭되어진 유전자를 각각의 bacterial overexpression vector (pET-22b- PA, pGEX-KG-LF)에 삽입하고 삽입

되어진 clone을 screening 한 뒤 이를 Restriction enzyme mapping 과 DNA sequencing을 통하여 확인하여 clone을 확보하였다. 확보한 clone을 expression host strain (DH5 α)에 transformation 한 뒤 발현 여부를 확인하였다. (Fig. 2-4)

3) 치사독소의 대량생산 및 분리, 정제

치사독소의 과량발현을 위하여 박테리아 overexpression system 인 pGEX-KG vector를 사용하였다. 발현되어진 치사독소는 아미노 말단에 GST(Glutathione S-Tranferase)가 fusion 되어져 분리정제단계에서 glutathione resin을 이용한 single step purification을 통해 쉽게 분리할 수 있다. 또한 발현되어진 fusion protein의 기능 및 구조 형성에 도움이 되기 위하여 purification tag과 target protein (lethal factor) 사이에 5 glycine linker를 삽입하였다 (Fig. 2-6). 과량발현을 위하여 IPTG induction system을 사용하였으며 0.5-1 mM IPTG 농도에서 과량발현이 가장 적합하였다. 또한 1mM IPTG induction에서 시간대별 단백질의 발현양을 관찰해본결과 induction 후 2 시간 뒤부터 recombinant LF의 발현이 시작되었으며 5-6시간에서 발현양이 최대가 됨을 관찰할 수 있었으며 이는 약 16시간정도까지 지속되었다. 따라서 본 연구진은 치사독소의 과량발현을 위하여 1 mM IPTG, 5시간 induction 조건을 이용하였다. 또한 과량 발현되어진 단백질을 박테리아 내부의 단백질 가수분해효소에 의한 손상을 최소화하기 위하여 단백질 가수분해 효소 활성이 매우 낮은 박테리아 발현 균주, BL21(DE3),를 발현 숙주로 이용하였다. 분리정제과정을 위하여 먼저 세포를 위에서 결정한 조건을 이용하여 치사독소를 과량 발현 시킨 뒤 원심분리를 통하여 세포를 분리하였다. 분리되어진 세포에서부터 치사독소를 분리하기 위한 방법은 확립하기 위하여 Table 2-1의 방법을 통하여 확인하였다.

1. One-step purification method를 결정하기 위하여 먼저 classical column chromatography를 이용하여 치사독소가 결합한 resin (GSH-Sepharose)과 어느 농도범위의 glutathione에서 elution 되어지는지를 결정하였다. Linear gradient elution에서 치사독소는 약 7-8.5 mM glutathione에서 elution 되어짐을 확인하였으며 이 범위의 fraction을 대상세포 (RAW264.7 cell line)에 PA와 함께 넣어주었을 때 cytolytic activity를 가짐을 확인하였다.

2. 세포 추출물 (cell extracts)을 직접 GSH-sepharose resin과 섞어준 뒤 4에서 30분간 반응시킨 뒤 (batch mode) 10 mM glutathion을 이용한 step gradient을 이용하여 elution 하였다. 이 결과 Fig. 2-2. lane 3에서 관찰할 수 있는 것과 같이 GST-LF (대량생산 되어진 LF)와 약 60-70 kDa의 크기를 가지는 단백질이 같이 존재함을 확인하여 이를 분리하기 위한 다음 과정을 실시하였다.

3. 두 단백질의 분자량의 크기 차이에 의하여 (GST-LF : ~ 120 kDa, unexpected protein : 60-70 kDa) Size-exclusive column을 이용하여 분리를 시도하여보았으나 두 단백질의 뚜렷한 분자량의 차이에도 불구하고 분리할 수가 없었다. 이는 두 단백질이 complex의 형태로 존재하고 있음을 시사하는바 이를 분리하고자 하였다. 박테리아에서 특정단백질을 과량 발현할 경우 과량발현에 의한 박테리아 내부의 molecular chaperone의 과다 생성과 목적단백질과의 complex를 이루는 경우가 있으므로 본 연구진은 이러한 단백질일수 있다는 가능성하에 molecular chaperone에서 분리할 수 있는 buffer 조건 (2 mM ATP, 10 mM MgSO₄)에서 위의 단계에서 분리한 fraction을 반응시킨 뒤 이를 다시 첫 번째 사용하였던 GSH-Sepharose resin 과 결합시킨 뒤 같은 조건으로 분리시킨 뒤 SDS/PAGE를 시행하였을 때 이전에 관찰할 수 있었던 60-70 kDa의 단백질을 제거되었음을 확인하였다 (Fig. 2-7. lane 5)

4. 대량 생산되어진 치사독소는 분리정제과정을 용이하게 하기위하여 아미노 말단부위에 GST fusion 형태로 발현되어지게끔 제작되어짐에 따라 이를 제거하기 위한 수단으로 fusion site에 thrombine cleavage sequence가 삽입되어져 있다. 이를 이용하여 thrombine을 이용하여 purification tag를 제거한 뒤 thrombine을 제거하기 위하여 serine protease specific binding resin으로 알려진 benzamidine-Speharose column을 통과시켰다. Thrombine으로 GST가 절단되어진 치사독소와 GST fusion 형태의 치사독소의 활성을 비교해본 결과 두 가지에서 큰 차이가 없음을 관찰할 수 있었다 (cytolytic activity 참조 및 Fig. 2-8A. 참조).

5. Purification fold는 분리되어진 분획을 이용하여 같은 양의 PA와 반응시킨 뒤 이를 대상세포에 처리하여 4시간 후의 세포의 생존율을 trypan blue cell counting을 이용하여 측정한 뒤 이를 상대적으로 나타내었다.

6. 위의 purification test를 바탕으로 하여 one-step purification method를 다음과 같이 결정하였다. 세포를 modified PBST buffer (resuspension buffer with dissociation buffer, 150 mM NaCl, 16 mM Na₂HPO₄, 4 mM NaH₂PO₄, pH 7.4, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100, 0.1 % BME, 2 mM ATP and 10 mM MgSO₄)에서 현탁시켜 미리 치사독소와 결합하여 complex를 형성하는 단백질 (60-70 kDa)을 제거시킨 뒤 이를 GSH-Sepharose resin과 직접 반응(batch type purification)시켜 기존의 column chromatography 과정에서 필요한 농축의 과정을 배제함으로써 시간을 보다 단축시킬 수 있었으며 washing 과정에서 보다 다양한 종류의 washing buffer (PBST buffer containing 5 mM glutathione)를 이용함으로써 높은 정제도의 치사독소를 얻어낼 수 있었다. 1L 배양을 통하여 약 3-4 mg의 치사독소를 얻어낼 수 있었다.

3) 치사요소의 assay system 확립

치사요소 (lethal factor)는 금속 의존적 단백질 분해 효소 (Zn^{2+} -dependent protease)임이 널리 알려져 있다. 그러나 많은 수의 단백질 가수분해효소가 그러하듯 다른 효소와 달리 기질로 단백질을 이용함은 활성을 측정에 어려움이 있음은 주지의 사실이다. 치사요소의 세포내 기질로는 세포의 성장과 분열, 생존들의 세포내 신호전달에 관련된 MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway의 MAPK kinase family 임이 많은 연구를 통하여 확인되어졌으며 치사요소에 의한 절단부위가 아미노 말단부위에 위치함이 확인 되어져 있다 (MEK1 Pro8-Ile9). 지금까지의 치사요소의 활성을 측정하는 방법은 MAPK kinase (MKK) family의 치사요소에 의하여 절단되어지는 부분의 conserved amino acid 10-15 개 정도를 in vitro에서 합성한 뒤 이를 치사요소와 반응시켜 synthetic peptide의 절단 여부를 HPLC를 이용하여 확인하는 방법이 사용되어져 왔다. 근래 synthetic peptide 의 절단 부위 양 말단으로 서로 다른 fluorescence를 이용한 FRET (Fluorescence resonance energy transfer) method의 개발을 통하여 빠른 시간동안 많은 수의 치사효소 활성 검정이 가능해 졌다. 이는 치사요소를 억제할 수 있는 억제제 (inhibitor)의 개발에 있어 이들을 screening 할 수 있는 수단을 제공하는 것이라 할 수 있겠다 (High-throughput inhibitor screening). 그러나 synthetic peptide 를 이용하여 치사요소의 특성을 결정하는 것은 다소 무리가 있음이 사실이다. 실제로 치사요소는 활성에 필요한 Zn^{2+} ion 이외에 Ca^{2+} , Mg^{2+} 등의 다른 많은 divalent cation 이 첨가되었을 때 활성이나 단백질 안정성이 더 증가되어짐이 보고 되어져 있으며 근래 기질로 알려져 있는 MKK family의 절단부위인 아미노 말단 이외에 카복시 말단이 치사요소와 결합을 하는데 중요한 부분임이 제시되어지기도 하였다. 이에 본 연구진은 native substrate 형태로써 기질을 발현시켜 치사요소와 기질인 MEK1 (MKK family) structure-function relationship을 보다 면밀히 관찰할 수 있는 system을 확립하고자 하였다. 또한 기질인 MEK1의 절단 부위가 아미노 말단 부분에 위치함으로써 절단 후 이를 확인하기가 쉽지 않다는 점은 MEK1 의 아미노 말단 부위에 GST를 삽입하여 치사요소에 의해 절단되어졌을 때 기질의 분자량이 SDS/PAGE 상에서 쉽게 판별할 수 있도록 하였다 (Fig. 2-8A). Fig. 2-8A에서 관찰할 수 있듯 대량 생산되어진 치사독소는 native structure 형태의 기질인 MEK1을 절단함을 확인 할 수 있으며 이 효과는 Zn^{2+} ion 의존적임을 확인할 수 있다. 또한 기질인 MEK1의 아미노 말단 부위에 GST가 삽입되어 있음에도 절단에 아무런 영향이 없음을 치사요소가 aminopeptidase가 아닌 특정한 아미노산 서열을 인식하고 절단하는 endopeptidase임을 확인하는 것이라 하겠다. 또한 앞에서 언급했던 바와 같이 GST-LF와 purification tag 인 GST를 제거한 LF 사이에 활성의 차이가 없는 것으로 확인되어졌다. 본 연구진이 대량생산을 위하여

LF gene을 cloning할때 purification tag과 target protein (LF) 사이의 5 glycine linker가 삽입한 것이 두 단백질의 독립적인 folding과 독립적이 기능을 하는데 도움을 주는 일종의 flexible arm의 역할을 한 것으로 추정되어진다. 여기서 더 나아가 치사요소의 inhibitor screening 에 보다 신속한 assay system을 제공하기 위하여 in vitro immobilized assay를 시도하여 보았다. inhibitor screening 은 빠른 시간 내에 많은 수의 candidate을 screening 하는 것이 필수적인바 일반적으로 96 well-plate을 이용하여 ELISA reader 와 같은 multi-detector를 사용한다. 따라서 본 실험진은 96 well-plate 표면에 치사요소를 고정시킨 뒤 각각의 well에 assay condition을 갖추어 주어 기질로 사용한 GST-MEK가 tube 상에서 이루어진 Fig. 8A. 와 같은 결과를 나타내는지를 비교하였다. 이를 위하여 GST-LF를 GSH-sepharose 결합시켜 고정시킨 뒤 이를 well-plate 바닥에 가라앉게 한 뒤 반응을 진행시켰다 (Fig. 2-8B). 그림에서 보는 바와 같이 immobilized assay에서도 tube에서 시행한 assay와 차이가 없음을 관찰할 수 있었다.

4) 치사요소의 새로운 substrate 검색

치사요소는 대상세포의 죽음을 유발시키는 인자로 알려져 있다. 현재까지 세포내 치사요소의 기질로써 MKK family가 보고되고 있는데 MKK family는 MAPK pathway에서 p42/44 MAPK/EKR, p38 MAPK, JNK를 포함하는 세포내 성장, 분화 등의 다양한 작용을 조절하는 것으로 알려져 있다. 치사요소가 MAPK/ERK의 상위 단백질인 MEK1을 절단하여 이들의 작용경로를 억제함으로써 anti-apoptotic signal을 차단하여 cell death가 유발되어진다는 보고가 있으며 최근 p38 MAPK의 작용기전을 억제함으로써 NF- κ B의 작용에 의하여 대상세포의 apoptosis가 유발되어짐이 보고된 바 있다. 그러나 아직 치사요소에 의한 대상세포의 사멸에 대한 많은 부분이 연구의 대상으로 남아 있으며 지금까지 밝혀진 기질보다 훨씬 다양한 단백질이 이들을 담당할 것이라는 가설이 제시되어지고 있다. 이에 본 연구진은 치사요소가 세포사멸을 유발한다고 알려진 immune like cell line을 배양한 뒤 이들 세포내 전체 단백질을 분리하여 위에서 얻어진 치사요소를 이용하여 in vitro proteolytic assay를 실시한 뒤 2-DE gel analysis를 통하여 치사요소에 의하여 직접적으로 변화하는 단백질을 찾아 새로운 기질을 탐색하고자 하였다. Fig. 2-9에서 보는 것과 같이 치사요소를 처리한 군과 그렇지 않은 군을 비교하여 볼 때 뚜렷한 단백질 spot의 변화를 관찰할 수 있었으며 이에 대한 amino acid sequencing을 현재 수행 중에 있다. 대상세포주인 RAW 264.7 cell line을 DMEM supplemented 10 % fetal bovine serum에서 배양한 뒤 이들의 세포를 PBST containing 1 % Triton X-100를 이용하여 전체 단백질을 얻었다. Total cell extracts

(6 mg)과 치사독소 (resin bound form of GST-LF, 1.83 μ M)를 25 mM MES, pH 7.0, 37°C에서 반응 시킨 뒤 원심분리를 통하여 치사독소를 제거한 상등 액을 acetone을 이용하여 침전시킨 후 2-DE gel analysis를 하였다. 화살표는 두 group의 뚜렷한 변화가 나타난 단백질을 표시한 것이다. Gel은 Coomassie blue R-250로 염색하였다.

5) 금속이온에 대한 효소 활성의 의존도

치사요소는 Zn^{2+} 의존적 금속성 가수분해효소 (metalloprotease) 임이 널리 보고 되어진바 있다. 치사요소 686-690 지역은 잘 알려진 Zn^{2+} 결합 지역 (HEXXH) 과 상동성을 보이며 이 지역을 변화 (mutation) 시켰을 때 효소 활성이 완전히 저해되어짐이 보고 되었다. 또한 치사요소의 315-416 아미노산 서열을 살펴보면 5개의 추정적 EF-hand Ca^{2+} 결합 지역이 연속되어져 있음을 관찰할 수 있다. 더욱이 Ca^{2+} 의 경우 치사독소 (LeTx)에 의한 세포독성 메카니즘의 여러 단계에 관여함이 보고 되어진바 있다. 실제로 합성 펩타이드를 이용한 활성검정을 통하여 이들 두 가지 이온이 필요함이 증명 되어졌다. 본 실험을 통하여 전체 기질 MEK1을 사용하여 이러한 특성을 살펴보았다. 먼저 치사요소의 금속이온 의존적 실험을 진행하기 위하여 치사요소를 금속이온이 완전히 제거된 상태 (Apo-enzyme)로 준비하였다. 이를 위하여 EDTA와 1,10-phenanthroline이 포함된 buffer에서 여러 번 dialysis 시켰다. 금속이온을 완전히 제거한 상태에서 효소활성은 전혀 나타나지 않았으며 금속이온을 더해줌에 따라 효소 활성이 나타남을 관찰할 수 있었다. Fig. 2-11에서 보는바와 같이 Zn^{2+} 은 효소 활성에 반드시 필요한 이온임을 관찰할 수 있었으며 다른 금속이온의 경우는 Zn^{2+} 와 같이 존재 하였을 경우 효소 활성을 증가시킴을 알수 있었다. 흥미롭게도 이전의 보고와는 달리 Zn^{2+} , Ca^{2+} 이외 다른 2가 금속 양이온 (Mg^{2+})을 더 첨가하여 주었을 때 효소 활성이 최대로 나타남을 관찰할 수 있었다. 이는 각각의 금속이온이 서로 다른 결합 부위를 가짐을 제시하며 이는 *in vivo* 상에서 효소의 기질 특이성 및 binding/catalysis 에 관련이 되는 특징으로 추정되어진다.

라. pH에 대한 효소 활성의 의존도

치사독소 (LeTx)가 세포 독성을 나타내기 위해서는 PA pore complex를 통하여 세포내로 유입되는 과정이 필수적이다. 이러한 과정동안 PA-LF complex는 acidic compartment로 이동하게 되고 acid pH에서 pore가 열리면서 결합하고 있던 LF가 세포내로 유입되는 과정을 거침이 알려져 있다 (endocytosis). 이러한 측면을 고려해 볼

때 pH의 변화가 치사요소의 효소 활성화에 미치는 영향을 조사하는 것은 매우 중요한 일이라고 할 수 있을 것이다. pH 변화가 치사요소 활성화에 미치는 영향을 조사해 보기 위하여 먼저 치사요소 활성화의 pH (pH4.0-8.0) 의존성을 조사해 보았다. Fig. 2-3A에서 볼 수 있는 것과 같이 효소의 최대 활성화는 중성 pH 부근에서 나타났으며 pH 6.0-8.0 사이에서도 효소활성이 비슷하게 유지되어짐을 관찰할 수 있었다. 그러나 endocytosis 과정의 acidic compartment가 가진다고 알려진 pH4.0에서는 효소활성이 거의 나타나지 않았다. 이러한 결과는 differential scanning calorimeter (DSC)를 이용한 다양한 pH에서 효소활성과 thermal denaturation 사이의 결과와 일치하는 바이다. Optimum pH (pH 7.4)에서 시간에 따른 기질의 변화량을 관찰하여 본 결과 time-kinetic curve는 hyperbolic pattern을 보여주었으며 half-maximum은 약 8분 이었다. 이러한 실험은 0.5 μ M LF와 3.24 μ M GST-MEK를 사용하였다. 이를 바탕으로 endocytosis 과정의 pH 변화가 치사요소 활성화에 미치는 영향을 조사하여 보았다. 앞의 실험에서 acid pH 범위에서 효소 활성화가 거의 나타나지 않는 점을 감안할 때 pH 변화 후 치사요소의 활성을 조사하는 것은 매우 중요하다 할 수 있을 것이다. 이를 위하여 치사요소를 연속적인 buffer change를 통하여 *in vitro* pH 변화를 경험하게 한 뒤 효소의 활성을 측정하여 보았다. 치사요소를 먼저 pH 4.0 buffer에서 20분간 반응시킨 뒤 pH 7.4로 서서히 변화시켜주었다. pH 변화를 시켜주었을 때 효소 활성화는 100% 복구되었으나 흥미롭게도 기질에 대한 time-kinetic pattern이 크게 변화함을 관찰할 수 있었다. Fig. 2-13에서 보는 것과 같이 일정한 pH 변화 (pH 7.4 - pH 7.4 - pH 7.4) 속의 치사요소의 time-kinetics pattern은 Fig. 2-12의 결과와 일치하였으나 endocytosis에서 겪는 pH 변화 (pH 7.4 - pH 4.0 - pH 7.4) 후 치사요소의 time-kinetics는 이와는 크게 다름을 관찰할 수 있었다. 이러한 사실은 pH 변화에 대한 치사요소의 구조적 변이가 온도에 의한 구조적 변이와는 달리 가역적임을 의미하는 것이며 pH 변화 후 치사요소의 활성화구조는 pH 변화 이전의 그것과는 다소 차이가 있음을 의미하는 것이라 할 수 있을 것이다. 본 결과는 치사요소와 기질 사이의 세포내의 반응에 있어서 새로운 관찰점을 부여하는 것이라 할 수 있겠다.

5) 고처리량 치사요소의 효소활성 검정법 개발

효소와 기질사이의 반응은 기질 (substrate, S)과 효소 (enzyme, E)가 결합하여 생성되는 혼성체 (ES complex)에서 화학적 반응이 일어나 반응 결과물이 생기는 과정으로 볼 수 있다. 즉 효소와 기질사이의 상호작용은 효소와 기질사이의 결합과 여기서 유도되어지는 효소 활성화부위의 촉매작용의 두 가지 측면을 고려 할 수 있다. 현재 치사

효소의 활성검정과정은 효소와 기질 사이의 촉매작용에 관련되어진 기질의 부분적 합성 펩타이드를 이용함으로써 다양한 기질의 억제제를 screening 하는데 있어서는 한계를 가진다고 할 수 있다. 따라서 본 연구진은 이러한 효소와 기질사이의 두가지 측면을 모두 관찰할 수 있는 치사요소 활성 검정법을 HTS에 맞게끔 개발하고자 하였다.. 이를 위하여 문헌에 의한 치사요소의 기질로 알려진 단백질에서 효소에 의하여 절단반응이 일어나는 부위 (아미노말단)와는 별개의 부위가 치사요소와 기질사이의 결합에 중요하다는 점을 고려하여 현 방법의 절단부위만으로 구성되어진 합성 펩타이드가 아닌 기질 단백질 전체를 *in vitro* over-expression 하여 다음의 HTS 의 특성을 지닌 활성 검정법을 고안하고자 하였다.

가) 고처리량 (High-throughput) 및 적은양의 시료사용

: multiwell plate format

나) 반응물과 결과물의 손쉬운 분리

: 반응에 사용되는 기질을 고체 지지체 (solid support)에 고정시켜 반응을 시킴으로써 치사요소에 의한 절단반응이 진행된 뒤 반응용액, 효소, 절단되어진 기질의 부분을 고체 지지체에서 피펫을 이용하여 용이하게 제거할 수 있다 (Immobilization of substrate onto solid support)

다) 효소 반응성 최대화

: 기질을 고체 지지체에 고정시킬 때 특정한 방향 (a defined orientation)으로 고정시킴으로써 반응여부에 따른 결과를 보다 증폭시켰다. 이를 위하여 선택적 고정 리간드 (capture ligand)가 처리되어진 고체 지지체에 특이적 결합을 하는 수용물질 (acceptor)을 기질과 융합시켰다. 또한 수용물질과 기질 단백질 사이의 공간적 분리를 통하여 효소의 접근 및 반응이 용이하게 일어날 수 있게끔 두 물질 사이에 linker를 삽입하였다.

(1) 활성검정법의 개요 및 특징

기질 전체를 이용한 치사요소 활성검정은 치사요소에 의한 기질의 절단부위가 아미노말단 (MEK1 Ile8-Pro9)에 치우쳐 있어 반응 후 절단여부를 관찰하기가 매우 어렵다. 따라서 이러한 아미노 말단에 치우친 기질의 절단 여부를 판별하기 위하여 이들 지역 특이적 항체를 이용한 western blotting 혹은 HPLC를 이용한 분석을 이용하여야 했다. 그러나 이러한 방법은 다양한수의 시료를 조작함에 있어 많은 시간이 소요되어지며 많

은 양의 효소와 기질을 사용하는 문제점을 가진다. 또한 반응에 대한 정량적 분석이 어려움으로 효소 반응에 대한 반응 메커니즘을 분석함에 있어 한계점을 가진다. 따라서 이러한 아미노 말단에 치우친 절단 여부를 용이하게 판별하기 위하여 먼저 기질인 MEK1의 아미노 말단 지역에 일정한 크기를 지닌 특정 단백질을 융합시킨 형태로 발현을 하게 되면 이들의 절단 여부를 쉽게 판별할 수 있을 것이다. 또한 융합시키는 특정 단백질은 고처리량 활성 검정을 위한 기질의 고정화 과정에 이용 할 수 있는 특정 리간드 수용 단백질로 선택을 하게 되면 준비되어진 기질을 특정한 배향성을 가진 상태로 multiwell format plate에 고정 시킬 수 있는 장점을 가지게 될 것이다. 본 연구진은 이러한 목적을 만족시키기 위하여 glutathion (GSH)와 특이적으로 결합하는 glutathione-S-transferase (GST)를 기질인 MEK1의 아미노 말단에 융합되어진 형태로 발현되는 발현시스템을 서브 클로닝 하여 준비하였다.

(나) 고 처리량 치사요소 활성검정법 개발 및 실험적 확인

본 system의 기본이 되는 well 표면의 capture ligand의 coating 및 기질인 GST-MEK의 고정화 과정을 확인하고 여기서 얻어지는 signal이 기질 특이적임을 확인하기 위하여 MEK1의 C-terminal region을 특이적으로 인식하는 항체 (primary antibody)와 관계없는 항체 (negative control)를 각각 넣어 준 뒤 기존의 ELISA method와 동일하게 이차항체 (secondary antibody conjugated to HRP)의 색깔반응 (color development with TMB solution)을 통하여 확인하였다 (Fig. 2-15). 또한, 준비되어진 기질 (GST-MEK)를 capture ligand (glutathione)이 precoating 되어진 multiwell plate에 각각 농도별로 넣어준 뒤 이들의 양적 차이를 정성적 분석 (quantitative analysis)가 가능한지를 확인한 결과 도면에서 관찰 할 수 있듯이 실험 농도범위에서 linear increase를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 2-16)). 따라서 이를 통하여 치사요소에 의하여 효소반응이 일어나게 되면 반응 종결 후 반응용액을 제거해주게 됨에 따라 well 표면에 결합되어있는 기질의 C-terminal portion의 변화유무를 ELISA based method를 통하여 쉽게 관찰이 가능 할 것으로 판단되어 진다. Fig. 2-15. microplate에 capture ligand 처리, blocking, 치사요소의 기질 (GST-MEK) 고정과정 확인 및 본 system의 기질 specific detection 능력 검정하였다. 치사요소 활성검정을 위하여 준비하는 과정을 확인하기 위하여 assay system에서의 detection method를 이용하여 각각의 단계를 검정하였다. 이는 detection system의 specificity를 검사함과 동시에 각 단계가 정상적으로 이루어짐을 확인 할수 있다. 사용되는 plate는 일반적인 polystyrene 재질로 구성되어진 것으로 단백질과 소수성 결합 (hydrophobic

interaction)을 통한 우수한 결합력을 가지고 있다. 따라서 이러한 plate 표면에 아무런 처리도 하지 않는다면 detection system 인 항체(antibody)를 넣어 주었을 때 모두 plate에 결합하게 되어 높은 signal을 보여주게 된다. plate 표면에 단계적으로 capture ligand 와 blocking agent (1 % BSA)를 처리하여줌 따라 free 상태로 노출되어진 plate 표면이 감소하게 됨으로 기질 특이적 항체를 넣어 주었을 때 signal이 감소하게 됨을 예측 할 수 있다. 이는 본 그림에서 보는바와 같이 plate 표면에 각각의 과정이 진행됨에 따라 감소하는 signal로 확인 할 수 있으며 capture ligand coating plate (또한 non-specific binding을 억제하기 위하여 모든 well을 1% BSA로 blocking 하였음)에 기질 (GST-MEK1)을 넣어준다. 이는 위에서 설명한 바와 같이 GST와 well plate 표면에 처리되어진 capture ligand (GSH) 와의 특이적 결합으로 인하여 특정방향으로 배향되어진(a defined orientation) 기질 고정을 이룰 수 있다. 기질을 넣어준 뒤 기질 특이적 항체를 사용한 detection 과정에서 signal의 급격한 증가를 관찰 할 수 있으며 기질 비 특이적 항체를 사용 하였을 때는 이러한 signal 증가가 거의 이루어지지 않음을 관찰 할 수 있다. Fig. 2-16 기질을 특정 배향으로 결합 시킬 수 있도록 표면처리를 한 plate에 서로 다른 농도의 기질을 넣어 주었을 때 본 system 의 signal 이 이에 비례적으로 측정 할 수 있는지를 검정하여 보았다. 이는 반응 후 남아있는 기질의 양을 어느 정도 정밀하고 정확한 범위까지 검정 할 수 있는지를 나타내는 척도로써 실험결과에서 알 수 있듯이 약 2 nM에서 200 nM의 범위에서 직선형을 signal 증가를 관찰 할 수 있음을 알 수 있다. 본 결과를 통하여 넓은 측정범위를 가짐을 알 수 있다.

Scheme

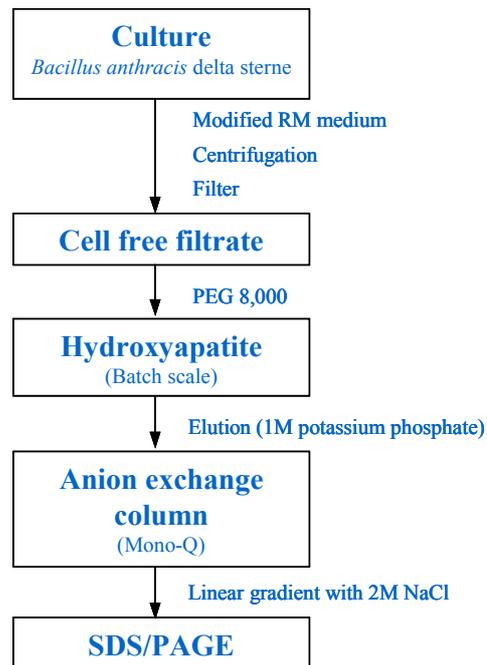


Fig. 2-1. Purification of native toxin from *Bacillus anthracis* Sterne.

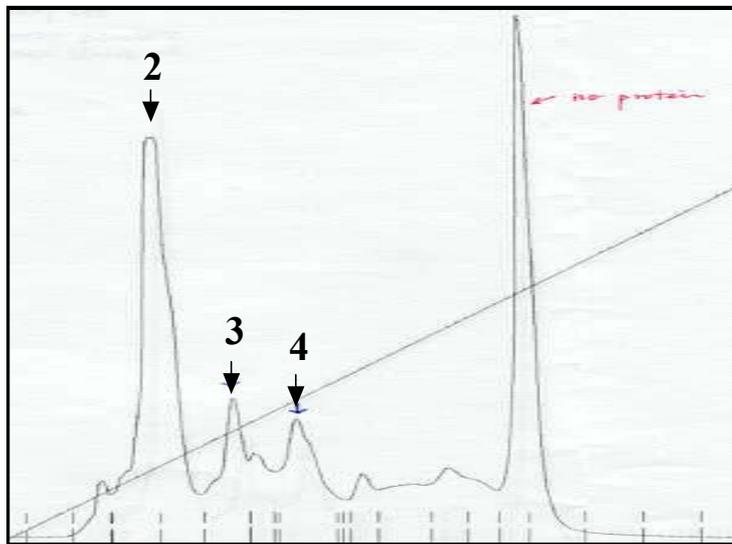


Fig. 2-2. Anion exchange(Mono-Q) FPLC chromatography of crude anthrax toxin.

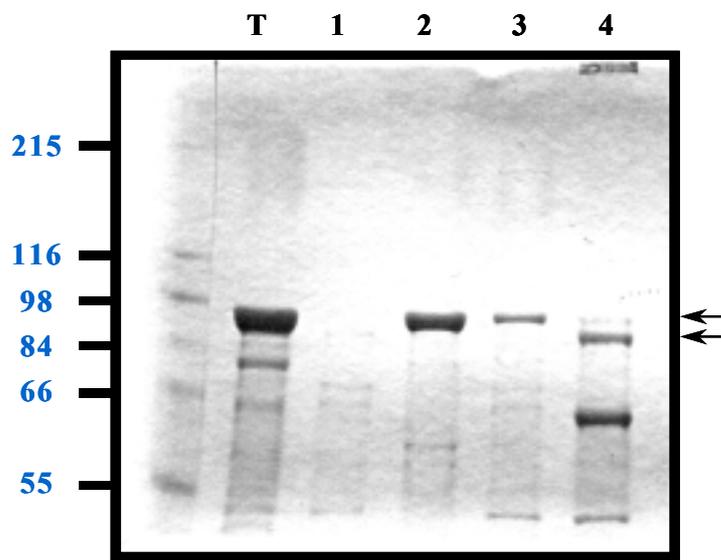


Fig. 2-3. SDS-PAGE profile of purified anthrax toxin PA and LF. Arrow indicate LF and PA.

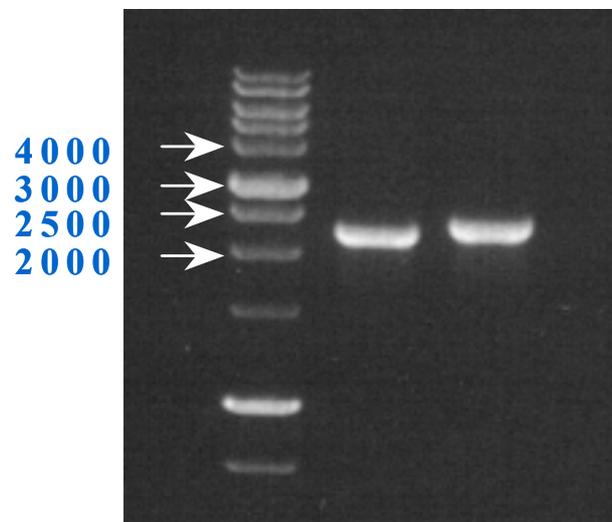


Fig. 2-4. PCR products from total DNA of *Bacillus anthracis* Sterne strain. (1. PA (60°C annealing), 2.2 kb 2. LF (53°C annealing), 2.3 kb)

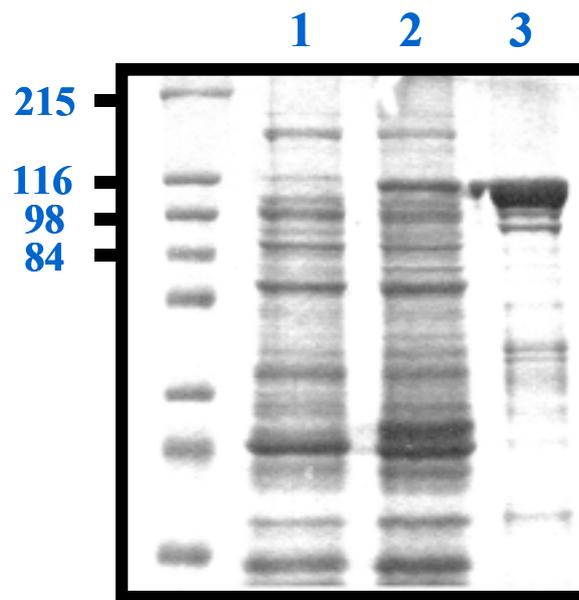


Fig. 2-5. Overexpression of lethal factor from *Escherichia coli*. 1. Cell extracts before IPTG induction, Cell extracts after IPTG induction, Recombinant LF purified by glutathione resin

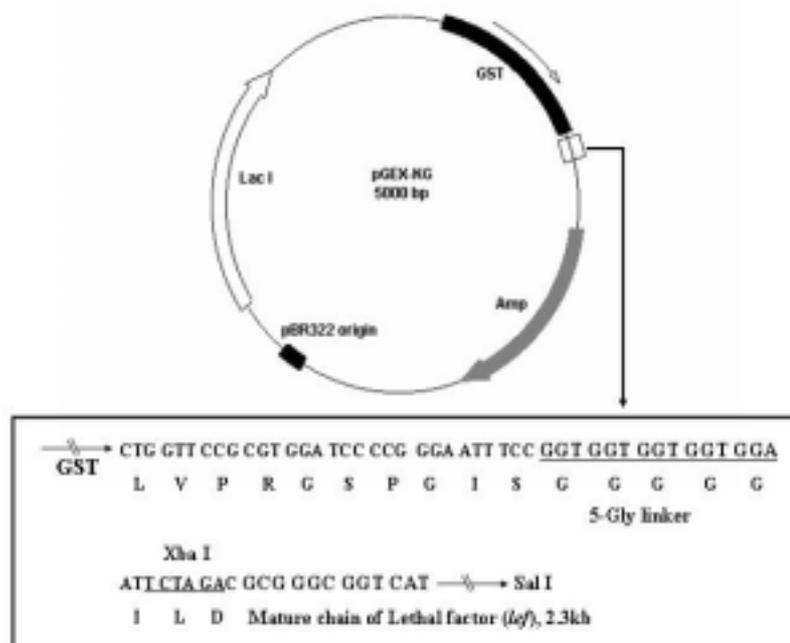


Fig. 2-6. Schematic diagram of constructed plasmid for over-expression of LF

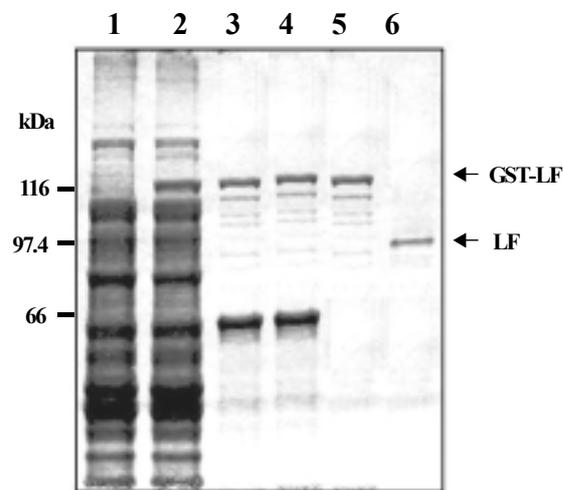


Fig. 2-7. Expression and purification of rLF. Cells were induced to overexpress the rLF with 1 mM IPTG at 30°C for 5 hours and rLF was purified as described in Materials and Methods. Samples were prepared at the indicated purification step and analyzed on 10% SDS/PAGE. 1) uninduced cell extracts; 2) induced cell extracts expressing rLF; 3) glutathione-Sepharose 6B column purified rLF; 4) Superdex-G75 size-exclusion column purified rLF; 5) glutathione-Sepharose 6B column purified rLF after incubation with dissociation buffer; and 6) thrombin-treated rLF purified by benzamidine-Sepharose.

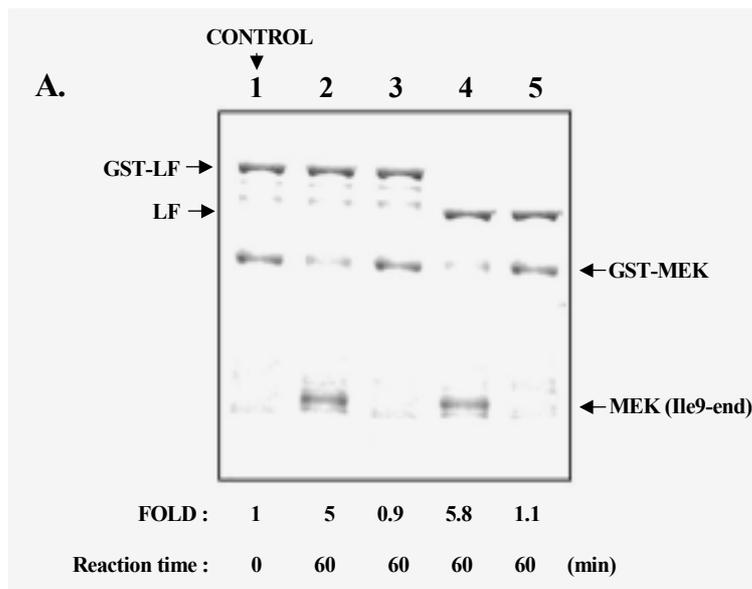


Fig. 2-8A. In vitro proteolytic assay of rLF. Prior to reaction, purified rLF was preincubated with (lanes 3, 5) or without (lanes 1, 2, 4) 1 mM *o*-phenanthroline for 30 min at 37°C. Reaction was initiated by adding of the preincubated enzyme to the reaction mixture containing 25 mM phosphate buffer, pH 7.4, 20 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.1 mM ZnCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, and 10 % glycerol and terminated by adding 5XSDS loading buffer, followed by boiling. Peptidase activity of rLF on GST-MEK was determined by the decrease of substrate band intensity, and fold activity was calculated from the intensity ratio between reference (lane 1, zero time point) and indicated samples (lanes 2-5), using a densitometer (Bio-Rad). Lanes 1 - 3 are non-thrombin treated rLF (GST-LF), and lanes 4 - 5 are purified rLF after thrombin treatment (LF).

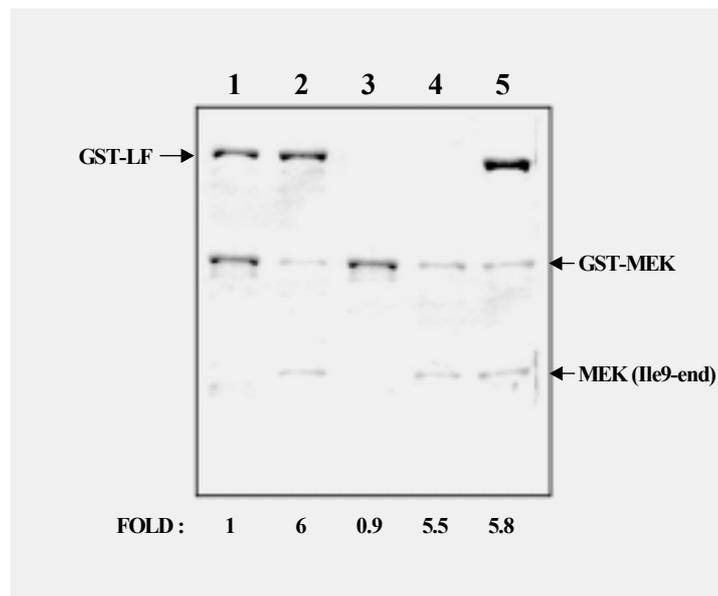


Fig. 2-8B. An immobilized LF assay. To test an immobilized enzymatic assay, rLF coupled to GSH-Sepharose resin was placed in 96-well plate, and the reaction was initiated by adding the reaction mixture to each well. After a 60-min reaction, supernatants without resin bound rLF were obtained (lane 3, zero time point; lane 4, 60 min reaction). Also, total reaction mixture containing GST-LF was recovered from the well-plate reaction by adding 5X SDS loading buffer (lane 1, zero time point, lane 2, 60 min reaction). Lane 5 was a standard reaction at 37°C for 60 min from the non-well plate based assay method using the soluble GST-LF as described in A section.

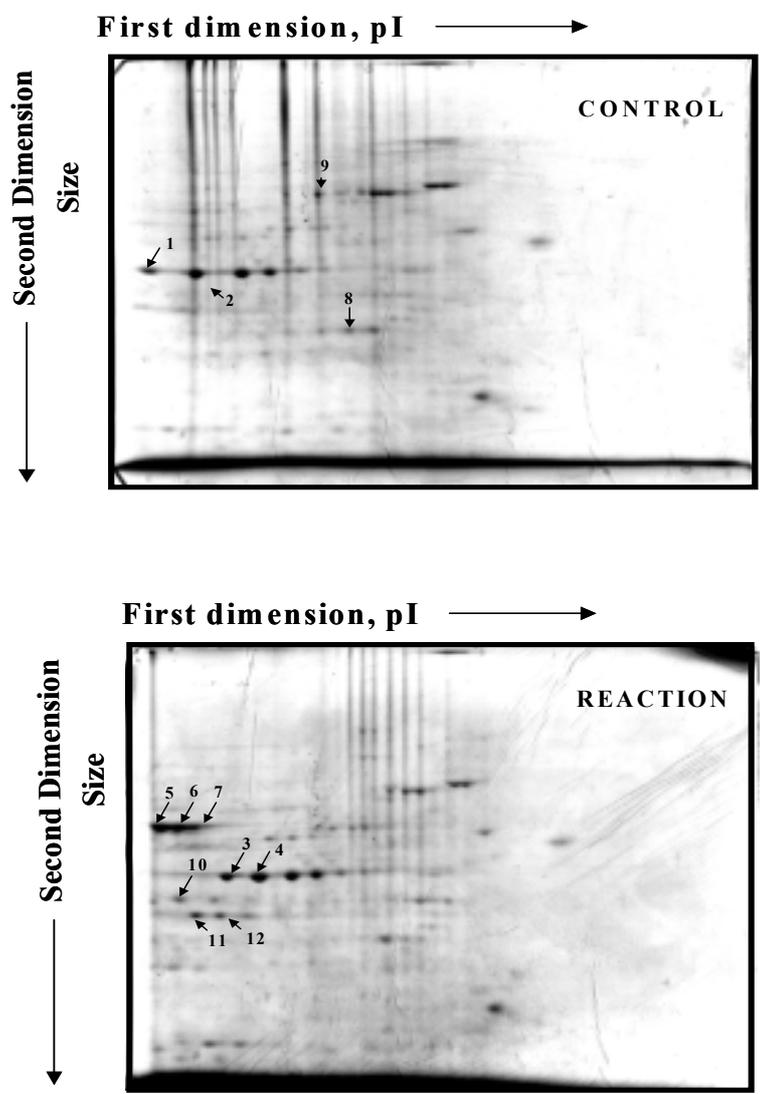


Fig. 2-9. In vitro substrate screening of lethal factor.

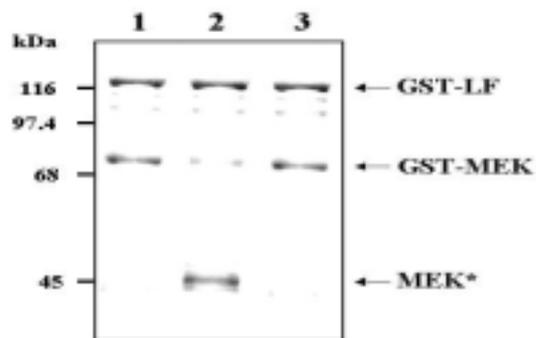


Fig. 2-10. The proteolytic activity assay using full-length GST-fusion substrate, GST-MEK. Activity of LF was determined as described in Materials and Method. 0.5 mM of rLF was preincubated with (3) or without (1, 2) 10 mM of 1, 10 phenanthroline, and the reaction was initiated by adding the reaction mixture containing full-length substrate (3.5 mM, GST-MEK). MEK* represents one of the cleaved products, MEK1 (Ile9-end). Lane1, zero time point as a reference; lane 2 and 3, reaction was carried out at 37°C for 60 min.

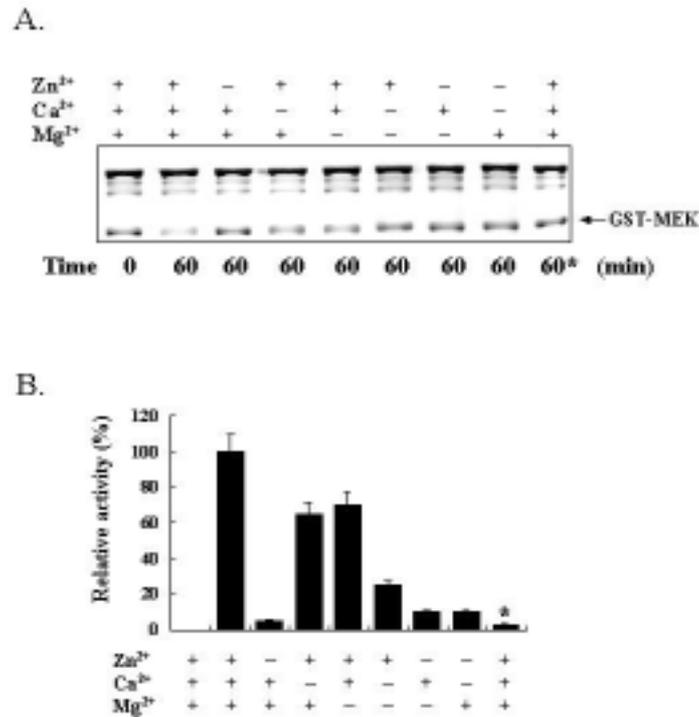


Fig. 2-11. Metal dependence on LF catalyzed substrate hydrolysis. A. apo-enzymes were prepared by dialysis against buffer containing metal chelating agents, 10 mM EDTA and 1 mM 1, 10-phenanthroline. Proteolytic activity of LF was directly assessed in the reaction mixture containing the various combinations of indicated metal ions (0.1 mM ZnCl₂, 0.1 mM CaCl₂, or 10 mM MgCl₂). Representative data was one of three independent experiments and showed similar results. B. Enzyme activity was calculated from the decrease of substrate band intensity, using densitometry (Bio-Rad). Relative activity was calculated using a reaction with three metal ions as a standard (100 %). The symbol (*) represents the reaction using the enzyme preincubated in 10 mM 1, 10-phenanthroline at 37°C for 20 min.

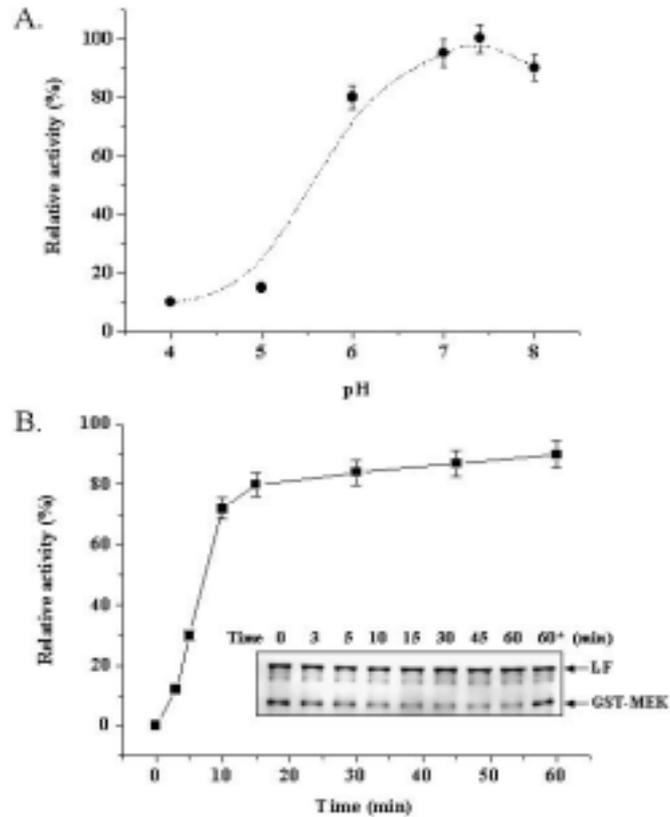


Fig. 2-12. The determination of catalytic properties of LF. A. Optimum pH of LF. To determine the optimum pH of LF activity, the proteolytic activity of LF was measured in the pH ranged from 4.0 to 8.0 (pH 4.0–5.0, 25 mM acetate buffer, pH 5.0–7.0, 25 mM MES buffer, pH 7.0–7.4, 25 mM phosphate buffer, and pH 7.4–8.0, 25 mM HEPES buffer). B. Time-kinetics on substrate. LF catalyzed substrate hydrolysis was monitored in a time-dependent manner. The proteolytic assay was performed in standard conditions containing all three metal ions, 0.1 mM Zn^{2+} , 0.1 mM Ca^{2+} , and 10 mM Mg^{2+} . At the indicated time point, aliquots were withdrawn and the reaction was terminated by adding 5X SDS/PAGE loading buffer, followed by boiling. The symbol (*) represents the reaction using the enzyme preincubated in 10 mM 1, 10-phenanthroline at 37°C for 20 min.

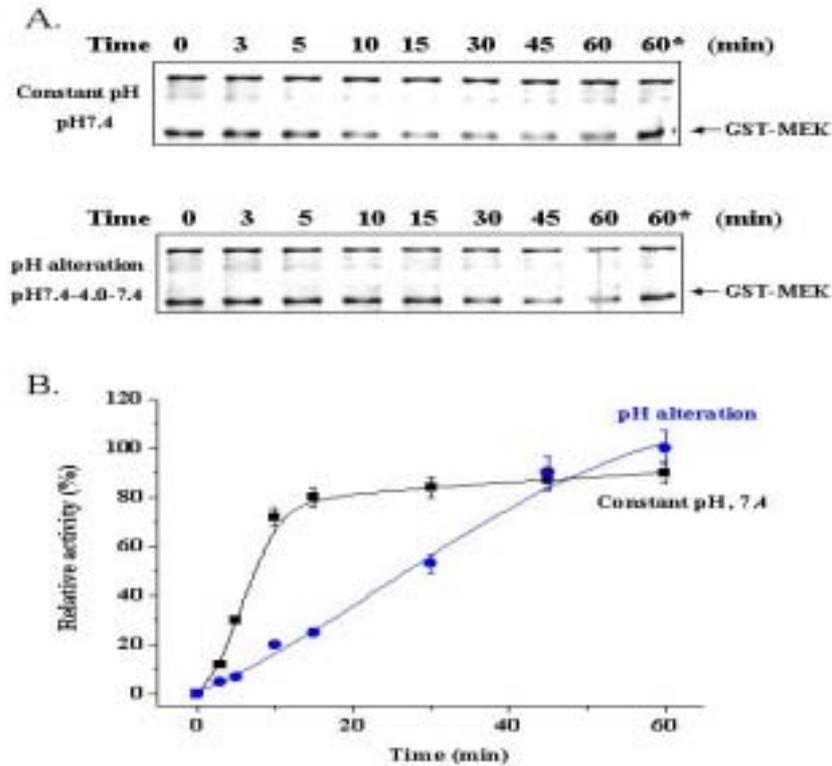


Fig. 2-13. The effect of pH alteration on LF activity.

A. To resolve the effect of pH change on LF activity, enzymes were incubated in the serial buffer system (pH 7.4 4.0 7.4, lower panel), which was changed to the indicated pH by the method described in Materials and Method. Enzyme assays were carried out according to the above procedures. Reactions were also performed in a constant pH buffer system (pH 7.4- 7.4 7.4, upper panel) as an internal control. B. Relative activity was estimated from the decrease of substrate band intensity, using densitometry (Bio-Rad) and each activity was compared to the reaction performed in constant pH for 60 min as a reference (100 %). The symbol (*) represents the reaction using the enzyme preincubated in 10 mM 1, 10-phenanthroline at 37°C for 20 min. Represented data was from at least three independent experiments.

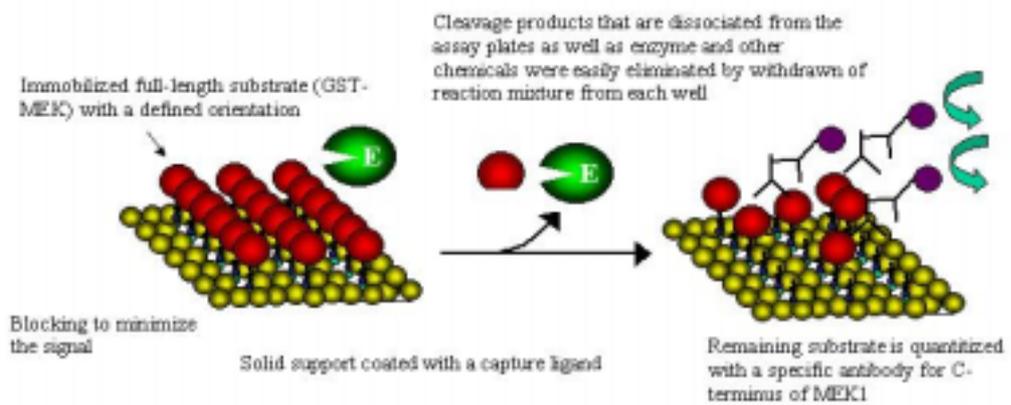
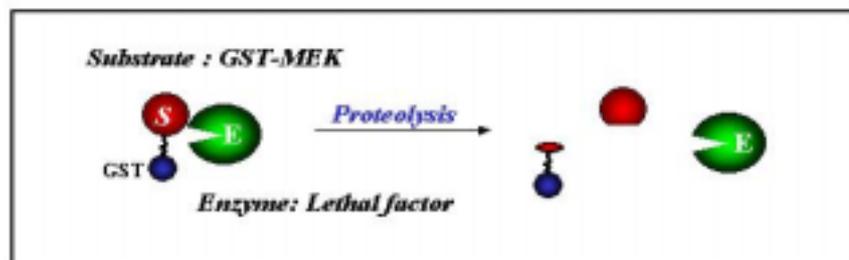


Fig. 2-14. Schematic diagram of High-throughput assay system for lethal factor activity

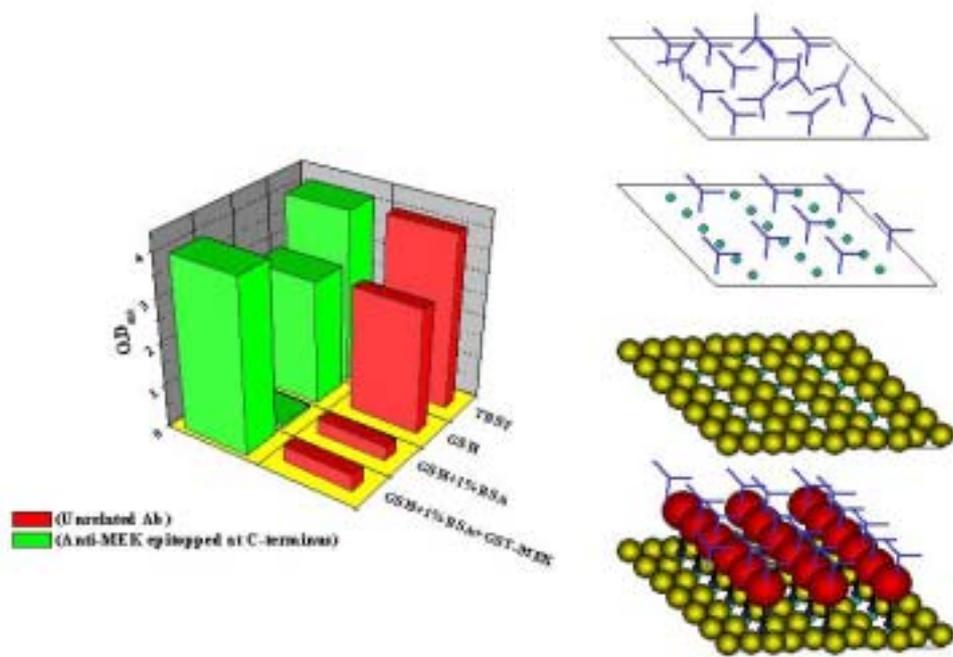


Fig. 2-15. microplate 에 capture ligand 처리, blocking, 치사요소의 기질 (GST-MEK) 고정과정 확인 및 본 system 의 기질 specific detection 능력 검증하였다.

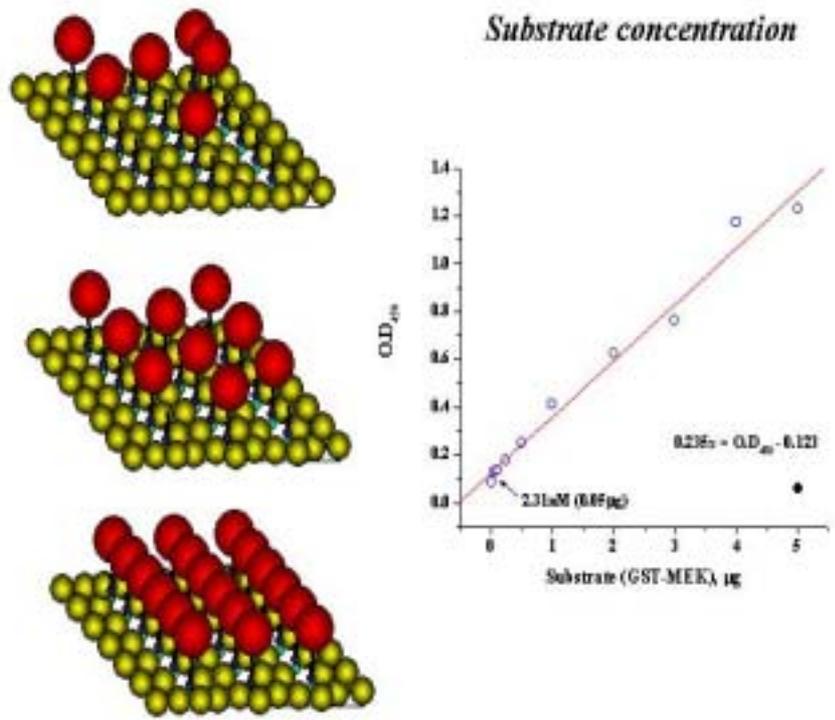


Fig. 2-16 기질을 특정 배향으로 결합 시킬 수 있도록 표면처리를 한 plate에 서로 다른 농도의 기질을 넣어 주었을 때 본 system 의 signal 이 이에 비례적으로 측정 할 수 있는지를 검증하여 보았다.

Table 2-1. Purification Table

	Volume	Amount of Protein (mg/ml)	Purification Fold ⁵
Purification Test¹			
1. Total cell extracts	40	2.37	1
2. First-affinity column (GSH-Sepharose) ²	5	1.45	1806
3. Size-exclusion column (Superdex-G75) ³	6	1.13	N/D
4. Second-affinity column (GSH-Sepharose)	5	0.98	3037
One-step purification (Batch mode)⁶			
1. Total cell extracts	40	2.48	1
2. Affinity resin (glutathione-Sepharose)	5	1.02	3042
[In the case of thrombin treatment]			
3. Thrombin treatment			
4. Benzamidine-Sepharose	4	1.13	3123

3 절 탄저 치사독소 병인성 유발 유전자 분석

1. 연구 방법

가. 탄저균 경주 균주에서 치사독소 (방어항원과 치사요소)의 정제

강독 균주인 한국산 탄저균 경주 균주를 RM 배지에서 진탕 배양한 뒤 원심 분리하여 배양액을 회수하였다. 회수된 배양액에 존재하는 독소 성분을 hydroxyapatite로 흡착시켰다. 흡착된 hydroxyapatite를 buchner funnel을 이용하여 분리하고, 분리된 독소 성분을 재차 hydroxyapatite에 흡착시켰다. 이를 Mono-Q를 사용하여 정제하여 방어항원과 치사요소를 분리 정제하였고, 정제된 치사독소 (방어항원과 치사요소)를 생쥐 대식세포 RAW264.7 세포에 처리하여 세포가 죽는 것을 확인하였다.

나. 대식세포의 배양과 치사독소의 처리

생쥐 대식세포는 세포주 은행에 있는 RAW264.7을 주로 사용하였고, 조건을 확인하기 위하여 J774A.1 등 감수성 세포와 저항성 세포를 같이 사용하였다. 대식세포는 20 % FCS 및 10 % human serum이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 $2 \times 10^7/10$ ml이 되도록 5 일 동안 37 °C, 5 % CO₂에서 배양하였고, 치사독소 등을 처리하기 전에는 1% human serum이 포함된 5 ml DMEM에서 배양한 후, 치사독소 등을 처리한 후 같은 조건으로 배양하였다. 치사독소의 처리는 방어항원과 치사독소의 비를 5:1이 기준이 되는 농도로 처리하여 세포의 생사여부를 MTT assay 방법으로 분석하였으며, 시간 역시 치사독소를 처리하고 나서 10분, 20분, 30분 등의 시간에 관찰하였다.

다. cRNA 준비와 array hybridization

처리된 대식세포는 주어진 시간에 따라 회수되어 확보되었으며, 확보된 대식세포는 TriZol 회사의 용액에 3:1의 비율로 넣어 -80°C에 넣어 보관하여 두었다가 DNA chip 실험을 위하여 cRNA를 회사의 지침대로 정제하였다. 각각 얻어진 전체 RNA에 대조군은 Cy3, 실험군 (치사독소 처리군)에는 Cy5를 라벨하여 hybridization 하였으며, 얻어진 결과는 Axon scanner로 관독하였다.

다. Western blotting assay

정제한 방어항원과 치사요소를 확인하기 위하여 Bollag(1996)의 방법으로 Western blotting assay를 수행하였다. 즉, SDS-PAGE 겔은 10 %로 제조하고 겔을 탱크에 완충액과 함께 넣은 후 시료를 부하하여 60 V에서 전기 영동하였다. 시료가 겔 밑바닥까지 내려가면 전기영동을 멈추고 겔을 분리한 후 nitrocellulose 막에 transfer 시켰다. Transfer는 60 V에서 3시간 수행하였다. 실험을 수행할 때 열이 발생하므로 저온실에서 수행하였다. Transfer가 끝난 후 nitrocellulose 막을 조심스럽게 핀셋으로 분리하고 nitrocellulose 막을 차단 완충액에 담근 후 상온에서 1시간 동안 방치했다. 후에 교반기 위에서 TBS 완충액으로 10분 동안 세척하는 과정을 3회 반복했다. TBS 완충액에 nitrocellulose 막을 담그고 monoclonal mouse anti-PA, monoclonal mouse anti-LF(RDI사)를 1:1000배 희석하여 첨가한 후 교반기에서 상온으로 1시간 30분 방치하였다. 후에 교반기 위에서 TBS 완충액으로 10분 동안 세척하는 과정을 3회 반복했다. Peroxidase labelled anti-mouse antibody를 1:5000배로 희석하여 TBS 완충액과 함께 nitrocellulose 막에 첨가했다. ECL kit 시약을 1:1로 섞어 준 후 nitrocellulose 막에 부어주었고 1분 동안 방치한 후 암실에서 film으로 시간대별로 감광하였다.

마. 단백질 정량

방어항원과 치사요소 각각의 단백질을 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량하였다. BCA 표준 시약을 미리 희석하여 준비하였다. 각각의 시료를 각각 1:40, 1:100, 1:200으로 희석했다. 각각의 표준 시약과 시료를 96-웰 플레이트에 25 μ l씩 부하하였다. 블랭크 웰에는 희석액을 25 μ l 부하하였다. 시료가 부하된 각각의 웰에 반응시약을 200 μ l 첨가하고 플레이트 교반기에 30 초 동안 방치하여 시약을 섞어주었다. 플레이트 뚜껑을 덮고 37 °C에서 30분 정도 방치하였다. 후에 실온으로 식히고 wavelength 562 nm에서 ELISA reader로 측정하였다. 표준 곡선을 그려 단백질 양을 계산하였다.

바. 세포 배양

생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포는 10 % fetal bovine serum과 1 % penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 배양하였다(Popov 등, 2002). 본 논문에서 실험한 cell passage는 19-25 사이를 사용하였다.

사. MTT assay

MTT assay는 미토콘드리아의 dehydrogenase와 반응하여 세포 생존율을 측정하는 방법이다(Park 등, 2000). 보유하고 있는 방어항원, 치사요소의 생리학적 활성을 확인하기 위하여 Park 등(2000)의 방법대로 MTT assay를 수행하였다. 생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포를 96-웰 플레이트에 각각 6×10^4 개 분주하여 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 하루 밤 배양하였다. 방어항원 농도는 100 ng/ml로 고정하였고, 치사요소는 농도 별로(2, 4, 8, 16, 32, 64 및 100 ng/ml) 플레이트에 처리하였다. 시간별(0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 및 240분)로 플레이트를 CO₂ 배양기에서 꺼내어 PBS(pH 7.2) 완충액으로 5회 세척하였다. DMEM 배지(10 % FBS, 1X PS) 100 μ l을 첨가하고 25 μ l MTT(5 mg/ml in PBS)를 가한 후 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 3시간 배양하였다. 배양이 끝난 플레이트에 정지 용액(20 % SDS, 50 % dimethyl formamide, pH 4.7) 100 μ l를 첨가하고 상온에서 천천히 교반하였다. 3시간 후 wavelength 570 nm에서 ELISA reader로 측정하여 그래프를 작성하였다.

마. Total RNA 분리

RNA 분리는 GibcoBRL사가 제공하는 방법으로 수행하였다. DMEM 배지 (10 % FBS, 1x PS)를 사용하여 생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포를 플레이트에 6×10^6 개 되도록 분주한 후 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 2시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 세포가 플레이트 바닥에 잘 붙었는지 확인하고 PBS (pH 7.2) 완충액으로 2회 세척 후 방어항원 100 ng/ml, 치사요소 16 ng/ml을 첨가하였다. 다시 37 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 30분 동안 배양 후 플레이트를 PBS(pH 7.2) 완충액으로 2회 세척하였다. 세척 후에는 Trizol 시약 2 ml를 첨가하고 pipeting 50-70 회하여 세포를 파괴하였다. 세포 파괴가 끝난 시료를 튜브에 1 ml씩 분주 후 200 μ l chloroform을 첨가하였다. 튜브 뚜껑을 닫고 15초 정도 와류(vortexing)하고 얼음에 15분 정도 방치하였다. 후에 12,000 x g, 15분, 4 °C에서 원심분리 하였다. 이 후 tip 끝으로 조심스럽게 상층액을 수거한 후 새로운 튜브에 옮기고 동량의 isopropyl alcohol을 넣어주어 얼음에 1시간동안 방치하였다. 후에 12,000 g, 15분, 4 °C에서 원심분리 하였다. 젤 같은 응집체 형성을 확인하고 상층액을 제거하였다. Ethanol 75 %(DEPC 처리 증류수) 1 ml를 첨가한 후 교반하고 12,000 g, 15분, 4 °C에서 원심분리 하여 상층액을 제거하였다. 다시 12,000 x g, 5분, 4 °C에서 원심분리 하여 남아있는 상층액을 모두 제거하였다. 응집체를 5분에서 10분 동안 상온에서 건조하고 DEPC 처리된 3차 증류수 30 μ l를 가하여 녹였다. 분광편광계

(Spectrophotometer)에서 wavelength 260 nm와 280 nm로 시료를 측정하여 A260/A280의 값이 1.7 이상인지 확인하였다. 전기영동으로 RNA가 잘 분리되었는지도 확인하였다.

바. cDNA microarray 실험

1) Probe preparation

Labeling kit는 Macrogen사의 것을 구입하여 Macrogen사에서 제공하는 방법으로 수행하였다. PCR 튜브에 대조군 total RNA와 실험군 total RNA로 각각 annealing 반응 혼합물(total RNA 18 μ l, control mRNA(1 ng) 1 μ l, oligo dT 시말체 3 μ l)을 준비한 후 70 °C에서 5분간 방치하고 즉시 튜브를 얼음으로 옮겼다. 새 0.2 ml PCR 튜브를 실험군과 대조군 반응으로 구분한 후 표지 혼합물(5x AMV RT buffer 8 μ l, low dT dNTP 4 μ l, 1 mM Cy3, Cy5-dUTP 3 μ l, RNase inhibitor(40 u/ μ l) 1 μ l, AMV RT 2 μ l(50 units))을 준비하였다. Annealing 반응 혼합물을 표지 혼합물에 각각 첨가하고 PCR 기기에서 42 °C, 1시간 동안 방치하였다. 후에 0.5 M EDTA 5 μ l를 첨가하여 반응을 중단시켰다. 각 튜브에 1 N NaOH 10 μ l를 첨가하여 37 °C에서 10분간 방치하였다. 후에 튜브에 1 M Tris-Hcl (pH 7.5) 완충액 25 μ l를 첨가하였다. Chromaspin column(Macrogen사)을 2 ml 튜브에 넣은 후 1,300 x g, 3분, 실온에서 원심분리 하여 column 안의 완충액을 제거하였다. 완충액이 제거된 spin column을 새 튜브에 넣고, 준비된 대조군과 실험군 반응 시료를 각각 column의 중앙에 넣은 후 1,300 x g, 5분, 실온에서 원심분리 하였다. 각각의 시료에 100 % ethanol 300 μ l와 3 M NaOAc 10 μ l를 첨가하고 -70 °C에 30분 동안 방치하였다. 후에 12,000 x g, 20분, 실온에서 원심분리를 수행하여 ethanol을 제거하였다. 그 후에 70 % ethanol 1 ml를 첨가하고 12,000 x g, 5분, 실온에서 원심분리 하여 ethanol을 제거하였다. 응집체를 빗을 차단하여 공기 중에서 건조하였다. 건조한 응집체를 각각 45 μ l의 3차 증류수에 녹이고 12,000 x g, 2분간 원심분리 하였다. Cy3(대조군)와 Cy5(실험군) 혼합물에서 각각 5 μ l을 취한 후 1/20 희석하여 분광편광계(Spectrophotometer)로 OD 값을 측정하였다. 측정된 값을 기준으로 각각의 cDNA 양을 계산하여 실험군과 대조군의 cDNA가 동량이 되면서 부피가 80 μ l되도록 하여 하나의 튜브에 첨가하였다. 후에 5x 분절화 용액 20 μ l를 첨가하여 전체 부피 100 μ l가 되도록 하였다. 그 후에 95 °C에서 15분간 방치하여 얼음으로 옮기고 진공가속건조기(Speed-Vac)로 분절된 cDNA 혼합물을 건조하여 응집체를 생성하였다.

2) Microarray pre-hybridization

cDNA microarray pre-hybridization 방법은 Digital Genomics사에서 제공하는 방법으로 수행하였다. Pre-hybridization 완충액(25 % formamide, 5X SSC, 0.1 % SDS, 10 mg/ml BSA)을 미리 42 °C로 가열하였다. Slide를 pre-hybridization 완충액이 채워진 50 ml 튜브에 넣고 42 °C에서 45분간 방치하였다. 후에 slide를 꺼내어 3차 증류수로 5회 정도 세척하고 60 g, 5분, 실온에서 원심분리 하여 microarray 위의 수분을 제거하였다.

3) Microarray hybridization

Probe preparation 과정에서 만든 시료 응집체를 15 μ l hybridization 완충액(25 % formamide, 5 x SSC, 0.1 % SDS)에 녹이고 95 °C에서 5분간 가열하였다. 그 후 2분 동안 가볍게 원심분리 하였다. Slide를 chamber에 옮기고 준비된 시료를 slide 표면에 부하한 후 커버 글라스를 덮어주었다. 이 후 42 °C에서 16-20시간 동안 방치하였다.

4) Microarray washing

세척 완충액 I(2 x SSC, 0.1 % SDS)를 42 °C로 가열한 후 slide를 넣고 흔들어서 커버 글라스를 제거하였다. 세척 완충액 I(2 x SSC, 0.1 % SDS)에 슬라이드를 넣고 42 °C에서 5분간 방치하였다. 세척 완충액 II(0.1 x SSC, 0.1 x SDS)에 slide를 넣고 실온에서 1분간 방치하고 이 과정을 4회 반복하였다. 이 후 60 x g, 5 분, 실온에서 원심분리 하여 microarray를 건조시켰다.

5) Microarray scanning

Axon GenePix scan array 4000(Axon 4000, USA) 프로그램을 실행해서 slide를 hybridization된 부분이 아래로 가게 하여 스테이지에 밀어 넣었다. Scan parameter, slide, wavelength 532 nm(Cy5), 및 635 nm(Cy3) 등의 값을 기입하였다. 2개의 형광 이미지(Cy3, Cy5)를 각각 wavelength 532 nm, 635 nm로 스캐닝하고, 각각 background 값이 올라가지 않고 signal이 최대로 취해질 수 있는 레이저 강도(laser intensity)와 PMT 감도를 설정하였다. Cy3와 Cy5의 normalization 대조군 유전자의

값을 살펴본 후 scanning하였다. 이미지를 저장하고 취한 화상으로 지정된 각 spot 위치의 형광 signal 강도와 background 강도를 취하여 엑셀 파일로 전환하였다.

6) Normalization of cDNA microarray data

Cy3와 Cy5의 signal 강도를 비교해 보면 Cy3가 Cy5보다 병합(incorporation)되는 정도가 크기 때문에 이를 비슷하게 조절해 주는 normalization을 해주었다. 이 경우 여러 번의 실험을 통하여 데이터를 비교, 분석하고 normalization 하였다. 이번 실험에서는 동일한 조건 하에서 4회 실험을 반복하였다. 그 후에 대조군 유전자의 Cy3와 Cy5의 형광비가 1로 보고 그것과 비교해서 Cy3와 Cy5의 형광비가 2배 이상이면 유전자 발현이 저해되는 유전자로 보고, 0.5 이하이면 유전자 발현이 유도되는 유전자로 보았다.

7) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Reverse transcription-polymerase chain reaction은 Invitrogen사가 제공하는 방법으로 수행하였다. 방어항원 농도 100 ng/ml, 치사요소 농도 16 ng/ml로 30분간 처리해 준 생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포의 total RNA를 분리하였다. PCR 튜브에 total RNA 2 μ l, oligo dT 시발체 1 μ l, 10 mM dNTP 1 μ l, DEPC 처리된 3차 증류수 9 μ l를 첨가하고 PCR 기기에서 65 $^{\circ}$ C, 5분간 방치하였다. 후에 5x first-strand 완충액 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, recombinant ribonuclease inhibitor 1 μ l를 가하고 42 $^{\circ}$ C에서 2분간 방치하였다. 그 후 SuperScript II RNase H-reverse transcriptase 1 μ l를 첨가하고 42 $^{\circ}$ C에서 50분간 방치하여 cDNA를 합성했다. 후에 70 $^{\circ}$ C, 15분간 가열하여 잔류 단백질들을 불활성화 시켰다. 튜브에 3차 증류수 30 μ l를 넣어 다음 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

8) Polymerase chain reaction(PCR)

선택한 유전자의 시발체를 고안하여 Sambrook과 Russell(2001)의 방법으로 PCR을 수행하였다. 생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포에 방어항원 100 ng/ml과 치사요소 16 ng/ml를 처리하고 30분 경과한 세포에서 total RNA를 분리하였다. Total RNA로 합성한 cDNA 2 μ l, 10x PCR 완충액 5 μ l, 50 mM MgCl₂ 1.5 μ l, 전 시발체 1 μ l, 후 시발체 1 μ l, Taq DNA polymerase(5 U/ μ l, Biotool사) 1 μ l, 3차 증류수 37.5 μ l를 0.2

ml PCR 튜브에 첨가하여 전체 부피가 50 μ l 되도록 하였다. 그 후 94 °C에서 5분간 사전 변성하고, 94 °C에서 1분간 변성, 각각의 시발체에 맞는 용해 온도에서 1분간 annealing, 72 °C에서 1분간 신장 과정을 30주기 수행하였다. 그 후에 72 °C에서 10분간 신장시키고 결과를 2 % TAE 아가로스 젤에서 확인하였다. 다음은 각 유전자의 시발체 서열이다.

NEK6: 5'-TTCTGAAGGGGTGACAG-3', 5'-CTGTCTTCCAGATGGCT-3'. RPL10A: 5'-GCTCATCATCGGTCATC-3', 5'-AAGTTGGTCAAGAAAGCT-3'. JAK1: 5'-GCGAGACACAGTTTGACG-3', 5'-CGGACAGTGGCGTAAACAG-3'. ATP1B1: 5'-GGAAAAGCCAAGGAGGAAGG-3', 5'-TTGGATGGTCCCGATGAAG-3'. BACE: 5'-GAATAGGGGAAAAAGCCAG-3', 5'-ATTTGCCTCTGCCTGGATT-3'

9) Real-time PCR

Microarray 분석결과 유의성 있게 발현을 나타내는 유전자를 선별하여 SYBR green을 바탕을 둔 real-time PCR을 수행하였다. PCR 용액은 총 25 μ l에 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)와 10 nM forward와 10 nM reverse primers, 100 ng of cDNA를 함께 혼합하여 사용하였다. PCR 기계는 ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems)을 이용하였다. PCR 조건은 50°C에서 2 min분간 반응시키고, 95°C에서 10 min 반응시킨 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 15초 그리고 72°C에서 15초의 조건에서 50회 반복해서 반응시켰다.

2. 연구 결과

가. 탄저균 경주 균주에서 치사독소 (방어항원과 치사요소)의 정제

탄저 독소 관련 유전자 연구에는 강독 균주를 사용하였다. 이는 한국산 강독 균주의 강독성을 이해하기 위한 조치이며, 탄저균 스텐이 갖는 약독성을 사용하였을 경우에는 실질적인 유전자 발현 양상을 보기 어렵기 때문이다. 따라서 강독 균주인 한국산 탄저균 경주 균주에서 치사독소 (방어항원과 치사요소)를 정제하였다. 강독 균주인 한국산 경주 균주를 RM 배지에서 진탕 배양한 뒤 원심 분리하여 배양액을 회수하였다. 회수된 배양액에 존재하는 독소 성분을 hydroxyapatite로 흡착시켰다. 흡착된 hydroxyapatite를 buchner funnel을 이용하여 분리하고, 분리된 독소 성분을 재차 hydroxyapatite에 흡착시켰다. 이를 BioScale Q (BioRad) 칼럼을 사용하여 정제하였다 (Fig. 3-1, 3-2).

생쥐 대식세포는 세포주은행에 있는 RAW264.7을 주로 사용하였고, 조건을 확인하기 위하여 J774A.1 등 감수성 세포와 저항성 세포를 같이 사용하였다. 치사독소의 처리는 방어항원과 치사독소의 비를 5:1이 기준이 되는 농도로 처리하여 세포의 생사여부를 MTT assay 방법으로 분석하였으며, 시간 역시 처리하고 나서 10분, 20분, 30분 등의 시간에 관찰하였다.

나. cRNA 준비와 array hybridization

처리된 대식세포는 주어진 시간마다 회수되어 확보되었으며, 확보된 대식세포는 TriZol회사의 용액에 3:1의 비율로 넣어 -80 °C에 넣어 보관하여 두었다가 DNA chip 실험을 위하여 cRNA를 회사의 지침대로 정제하였다. 각각 얻어진 전체 RNA에 대조군은 Cy3, 실험군 (치사독소 처리군)에는 Cy5를 라벨하여 hybridization 하였으며, 얻어진 결과는 Axon scanner로 판독하였다. 얻어진 형광 강도를 house keeping 유전자로 알려진 *GADPH* 등을 기준으로 각각의 실험마다 같은 형광 강도가 되게 normalization 한 후, 2배 이상 증가/감소된 유전자를 식별하여 판독하였다 (Fig. 3-3; Table 3-1). 생쥐 대식세포와 치사독소 처리에 주로 관련되는 유전자 중에서 주로 사이토카인과 케모카인에 해당하는 *GCSF*, *IL6*, *IL8*, *TNFA*, *MIP1A*, *MIP1B*, *MIP2B* 등의 유전자가 주로 발현 유도되었으며, 그 외에도 *CD44*, *ICAM1*, *LAMB3*, *FNFAIP6* 등의 세포 부착관련 유전자, *CCR6*, *CCR7*, *CCRL2*, *IL7* 등의 사이토카인이나 케모카인의 수용체, *CNK*, *DUSP1*, *DUSP2*, *EBI2*, *GBP1*, *TRAF1* 등의 신호전달 과정에 관련된 유전자, *ELF4*, *JUNB* 등의 전사관련, *COX2*, *PTX3* 등의 감염관련, *BTG1*, *BTG3* 등의 세포 증폭관련 등등의 유전자가 발현 유도되었다 (Table 3-1). 이와 반대로 *GCHFR*, *CAT* 등의 anti-inflammatory에 관련된 유전자들, *RARA*, *ENG* 등의 수용체들, *SF3A3*, *EGF2* 등의 전사 관련 유전자 등이 발현되었다 (Table 3-1).

다. Western blotting assay에 의한 치사독소 분석

정제된 방어항원과 치사요소를 확인하기 위하여 monoclonal mouse anti-PA, monoclonal mouse anti-LF(RDI사)를 사용하여 Western blotting assay를 수행하였다(Fig. 3-3). 방어항원의 분자량은 83 kDa이고 치사요소의 분자량은 90 kDa이다. BCA kit를 사용한 protein 정량 결과 방어항원과 치사요소의 농도는 각각 4.26 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 와 9.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다.

다. 치사독소 생리 활성 확인

생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포에 방어항원 농도를 100 ng/ml로 고정하고, 치사요소 농도를 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 및 100 ng/ml로 가한 후 시간대별(0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180 및 240분)로 MTT assay를 수행하였다. MTT assay 결과(Fig. 3-4) 방어항원 100 ng/ml만 가하거나 치사요소 농도 1, 2 및 4 ng/ml를 가할 때 세포 사멸이 일어나지 않음을 확인하였다. 치사요소 농도가 8 ng/ml를 넘어서면서 90분을 기준으로 세포 사멸이 일어났다. 치사요소 농도 8 ng/ml를 기준으로 그 이상은 세포 급사 농도임을 확인하였다.

마. cDNA microarray 실험

MTT assay 결과를 바탕으로 방어항원 농도 100 ng/ml, 치사요소 농도 16 ng/ml에 30분으로 실험 조건을 결정하였다. 생쥐 대식세포 RAW 264.7 세포 6×10^6 개에 방어항원 농도 100 ng/ml와 치사요소 16 ng/ml를 가하고 30분 후에 total RNA를 분리했다(Fig. 3-5). cDNA microarray에 시료를 하이브리드 한 후에 스캐닝 했다(Fig. 3-6). Fig. 3-7은 scatter plot으로 본 실험이 정상적으로 수행되었음을 알 수 있다. Microarray 실험은 4회 수행하여 data를 분석하여 실험에 오차를 줄일 수 있도록 하였다. Data는 대조군 유전자의 값을 1로 보았을 때 비교하여 ratio가 2배 이상이면 발현이 저해되는 되는 유전자로, 0.5배 이하이면 발현이 유도되는 유전자로 결정하였다. Data 분석 결과 226개의 유전자 발현 변화를 확인하였다. 그 중 32개의 유전자의 발현이 저해되었고, 194개의 유전자 발현이 유발되었다.

바. Down-regulated genes

분석 결과 단백질 생합성(protein biosynthesis)에 관여하는 RPL10A, ARBP, RPL30, RPS3, RPL3, RPS16 및 MPRS17 유전자와 세포 유사 분열 개시를 조절하는 NEK6 유전자의 발현이 저해되는 것으로 판명되었다(Table 3-1).

사. Up-regulated genes

발현이 유도되는 유전자 중에는 signaling에 관여하는 STAT4, STAT5A, JAK1 및

CNIH 유전자, proliferating에 관여하는 BTG1 유전자, tissue remodeling/clotting에 관여하는 SERPINB2 유전자, proteolysis에 관여하는 CTSW1, BACE 및 MCPT5 유전자, cell cycle arrest하는 GAS1 유전자, apoptosis에 관여하는 BIRC1E와 CAP8AP2 유전자, electron transport에 관여하는 GLRX1, CYP7B1, AOX1 및 CYP4A10 유전자, transport에 관여하는 AQP3, FXC1, ATP1A1, SLC16A1, APOM 및 KCNE4 유전자, immune response 에 관여하는 SCYB9과 PSMB9 유전자가 있다 (Table 3-2).

아. RT-PCR 결과

실험 결과를 biological process로 분류하였을 때(Table 3-3) 세포 성장에 관여하는 NEK6 유전자, 단백질 생합성에 관여하는 RPL10A 유전자, 세포내 signaling에 관여하는 JAK1 유전자, transport에 관여하는 ATP1A1 유전자, proteolysis에 관여하는 BACE 유전자의 시발체를 구상하여 RT-PCR를 수행하였다(Figure 3-8).

자. 인간 단핵 세포 유래의 대식세포에 대한 치사독소 생리 활성 확인

인간 단핵세포 유래 대식세포 (Human monocyte-derived macrophage cells)에 방어항원 농도를 100 ng/ml로 고정한 후 치사요소 농도는 농도별로 (5, 25, 50, 100, 500 ng/ml)로 처리하고 시간대별(1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 및 36시간)로 MTT assay를 수행하였다. Fig. 3-9에서 보듯이 MTT assay 결과 처리 후 16시간이 넘어서면서 세포 사멸이 일어남을 확인하였다.

차. cDNA microarray 실험

MTT assay 결과를 바탕으로 방어항원 농도 100 ng/ml, 치사요소 농도 100 ng/ml에 처리 후 2시간과 12시간으로 실험 조건을 결정하였다. 감염 초기 유전자 반응을 보기 위해 감염 후 2시간대에 샘플링을 하였고 세포 사멸이 일어나기 전 시간대인 감염 12시간 후에 샘플링을 하였다. 간단히 살펴보면, $5-7 \times 10^6$ 개의 인간 단핵세포 유래 대식세포 (human monocyte-derived macrophage cells)에 방어항원 농도 100 ng/ml와 치사요소 100 ng/ml를 가하고 2시간과 12시간 후에 total RNA를 분리했다. Microarray chip 실험에 있어서 결과에 영향을 주는 여러 가지 요소들 중 가장 중요한 것이 RNA로써,

이 RNA상태를 확인하기 위해 Agilent사의 Bioanalyzer2100를 사용하여 rRNA ratio (28S/18S ribosomal RNA)를 확인하였다 (Fig. 3-10). rRNA ratio가 2.0일 때 RNA가 가장 좋은 상태이며 cell line의 경우 이 비율이 1.6 이상일때 array 실험에 적절하였다. Fig. 3-10에서 보듯이 28S rRNA와 18S rRNA를 확인 하여 microarray 실험이 가능한 였고, rRNA ratio가 비율 이상으로 나옴을 확인하였다. Fig. 3-11은 Signal intensity와 R/G의 분포를 보여주는 scatter plot으로 가로축은 A, 세로축은 M값을 나타내며, A와 M 값은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$M = \log_2(R/G)$$

$$A = \{\log_2(R \times G)\} / 2$$

R = Cy5 signal background

G = Cy3 signal background

MA plot은 scaled block normalization의 결과로써, 하늘색 점선으로 M=0 (R=G) 선이 표시되어 있으며, 주황색 선은 LOWESS 적합선을 나타내었다. Microarray 실험은 4회 반복 수행하여 데이터를 분석하여 실험의 오차를 줄일 수 있도록 하였다. Fig. 3-11에서 보듯이 전체적인 유전자 발현 변화는 큰 차이를 보이지 않았으나 감염 후 2시간 보다는 12시간 후에 큰 폭으로 변화하는 유전자의 발현을 볼 수 있었다. 그리고 발현이 증가하는 유전자의 수는 적은 반면 감소하는 유전자의 수는 상대적으로 많은 것을 알 수 있었다. Microarray 데이터를 분석하여 202개의 유전자를 선별하였다. 그 중 122개의 유전자의 발현이 저해 되었고, 80개의 유전자 발현이 유발되었다.

차. 유전자 발현양상 분석

Microarray 데이터 분석 결과 유전자 발현변화는 세포내 기능에 따라 크게 5가지로 분류하였다. 즉 세포사멸/세포 죽음, 면역반응/스트레스에 대한 반응, 세포 성장, 신호 전달 그리고 전사로 분류하였다. Fig. 3-12에서는 5개의 카테고리 중 세포사멸/세포 죽음과 면역반응/스트레스에 대한 반응에 관련된 유전자들을 clustering과 visaulization (TreeView) program을 이용하여 분류하였다. 관련 프로그램은 <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm> (Michael Eisen's lab at the University of California at Berkeley)것을 사용하였다.

1) 유전자 발현 분석

세포사멸에 관련된 유전자들의 발현 양상을 시간대별로 분석하면, 감염 2시간 후에는 caspase 관련 유전자와 *BCL2* 유전자등의 발현이 증가, 감소함을 볼 수 있는 반면 감염 12시간 후에는 TNF (tumor necrosis factor) 관련 유전자의 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다. 그리고 세포사멸유도를 방해하는 유전자로 알려진 *BAG-4* (*BCL2*-associated athanogene 4) 유전자의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다. 또한 *BAD* (*BCL2*-antagonist of cell death) 유전자의 발현은 감염 12시간 후 샘플에서 발현이 증가됨을 확인하였고 real-time PCR를 통해 발현을 확인한 결과 microarray를 결과와 같은 발현 패턴을 보였다. 또한, *NF- κ B1* (nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)) 유전자의 경우 감염 12시간 후 샘플에서 감소하는 것으로 나타났는데 이는 세포의 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 유전자의 발현을 통해 세포가 세포사멸로 진행되고 있다는 예측할 수 있을 것이다. 면역반응 관련 유전자의 발현의 경우, 예측했듯이 세포 방어에 관련된 유전자의 예상대로 감소하는 발현 패턴을 보이고 세포 방어에 억제 기능을 하는 유전자의 발현은 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 세포성장 관련된 유전자의 발현 패턴의 경우 감염 12시간대가 2시간대에 비해 전체적으로 감소하는 발현 패턴을 보였다. *MAD* (*MAX* dimerization protein 1) 유전자의 경우 암 억제 후보 유전자로써 치사독소 처리한 감소하는 패턴을 보이는 것으로 나타났다. 또한, *SVIL* (supervillin), *CORO2B* (coronin, actin binding protein, 2B) 유전자의 경우 actin-binding protein을 암호화 하는 유전자로써 세포사멸을 나타내는 세포의 경우에 나타나는 특징을 가지고 있다. 치사독소를 처리한 후 12시간대에 이들 유전자의 발현이 증가하는 것으로 보아 대식세포가 세포사멸의 특징을 보인다고 추측할 수 있었다. 신호전달과 관련 있는 유전자군에서는 *DDAH2* (dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2) 유전자의 발현이 감염 2시간에서는 감소하다가 감염 12시간 후에는 증가하는 패턴을 보였다. *DDAH2* 유전자는 *NOS* (nitric oxide synthase)의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. 즉 감염 12시간 후에는 외부 독소에 세포가 방어하기 위해 내는 물질인 NO 생산이 줄어들 것으로 예측된다. *PPARA*(peroxisome proliferative activated receptor, alpha) 유전자의 경우 iNOS(inducible nitric oxide synthase)의 발현을 억제하는 것으로 알려져 있다. Microarray 분석결과 이 유전자는 감염 12시간 후에는 발현이 증가하는 것으로 보아 앞서 언급한 *DDAH2* 유전자와 더불어 NO 생산을 줄여 세포의 죽음을 유도하는 것으로 예측된다.

카. Real Time-PCR 결과

Fig. 3-13에서는 NF-kB1 유전자에 대한 real-time PCR 수행하는 과정에 관한 것으로 A-C와 G-I는 2시간 동안 처리한 샘플을 주형으로 하여 real-time PCR을 수행한 것이고, D-F와 J-L은 12시간 동안 처리한 샘플을 주형으로 한 실험이다. 그리고 A와 D는 방어항원 (PA)만을 처리한 샘플을, B와 E는 치사독소 (LeTx)를 처리한 샘플을 주형으로 하여 NF-kB1 유전자의 발현 차이를 real-time PCR를 확인한 결과이다. G와 J는 방어항원 (PA)만을 처리한 샘플을, H와 K는 치사독소를 처리한 샘플을 주형으로 대조 유전자로 GAPDH 유전자를 증폭한 그림이다. 그리고 C는 A와 B를, F는 D와 E를, I는 G와 H를 그리고 L은 J와 K의 그림을 함께 보여준 그림이다. Fig. 3-13의 각각은 3번의 반복실험을 나타내고 있다. Table 3-5는 PCR 반응 끝난 후 각각의 웰에서 나온 ΔCt 값을 보여준다. 한 유전자에 대해 3번의 반복 실험을 실시한 ΔCt 값이 유사한 값을 나온 것으로 보아 실험의 데이터가 유의성이 있다는 걸 알 수 있다. Fig. 14의 경우 real-time PCR을 3번 반복하여 얻은 값을 바탕으로 ANOVA analysis를 통해 통계학적 유의성을 가지는 값을 막대 그래프로 나타낸 것이다. NF-kB1 유전자의 경우 독소처리 2시간에서는 대조군에 비해 1.5~2배 정도 증가한 값을 보였고 독소처리 12시간에서는 대조군에 비해 1.5~2배 정도 감소한 값을 보였다. 위에서 언급한 방법으로 microarray 결과 유의성 있게 나온 유전자에 대해 real-time PCR를 실시하였다. Table 5에서 보듯이 real-time PCR 반응이 끝난 후 나온 값들을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 이용하여 각각의 유전자에 발현정도를 비교 분석하였다. Real-time PCR를 통해 발현 변화를 확인한 유전자는 BAD, STK17A, BAG-4, DAP, MEK2 그리고 DAPK1이다. 발현 변화의 차이는 보였지만 microarray 데이터와 유사한 발현 패턴을 보였다 (Fig. 15). 이는 microarray 데이터와 유의성 있는 결과를 보였다. 또한, Fig. 3-16에서는 IL-6, IFNG, TNF, IL-18 그리고 NF-kb 유전자에 대해서 real-time PCR 한 결과이다. NF-kb 유전자의 경우 세포의 세포사멸을 억제하는데 중요한 요소로 알려져 있는데 치사독소를 처리한 경우 세포사멸이 일어나기 전 시간대인 12시간에 발현양이 감소함을 확인하였다. 그리고 IFNG 유전자의 경우 감염 2시간 후에는 발현양이 증가한 반면, 감염 12시간 후에는 발현양이 급격히 감소하는 것을 확인하였다. Real-time PCR을 통해 microarray 실험에서의 발현을 다시 한번 검증함으로써 microarray 실험 데이터의 유의성을 다시 한번 확인하였고, 이들 유전자들은 탄저의 병인성 메카니즘 규명에 중요한 역할을 할 것이다. IFNG 유전자의 경우, 박테리아 병원체에 대해 자가 면역 반응에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 즉 탄저 치사독소를 인간 단핵세포 유래 대식세포에 처리하였을 때 다른 여러 사이토카인에 비해 급격한 감소를 나타내는 것을 확인함으로써 탄저 치사독소에 대한 바이오 마커의 후보 유전자가 될 수 있음을 확인하였다.

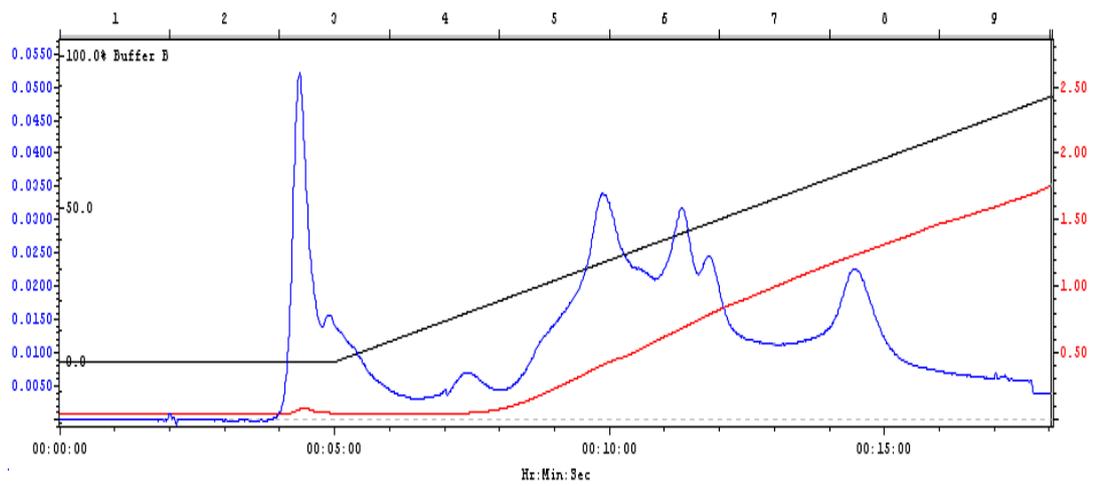


Fig. 3-1. Anion exchange (BioScale-Q2) FPLC chromatography of pooled from second hydroxyapatite column chromatography from *Bacillus anthracis* BAK strain.

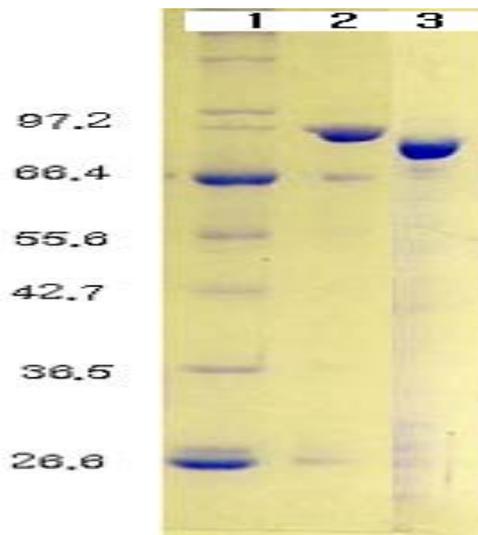


Fig. 3-2. SDS-PAGE of purified lethal toxin from *Bacillus anthracis* BAK. 1, Molecular standards, 2, LF, 3. PA.

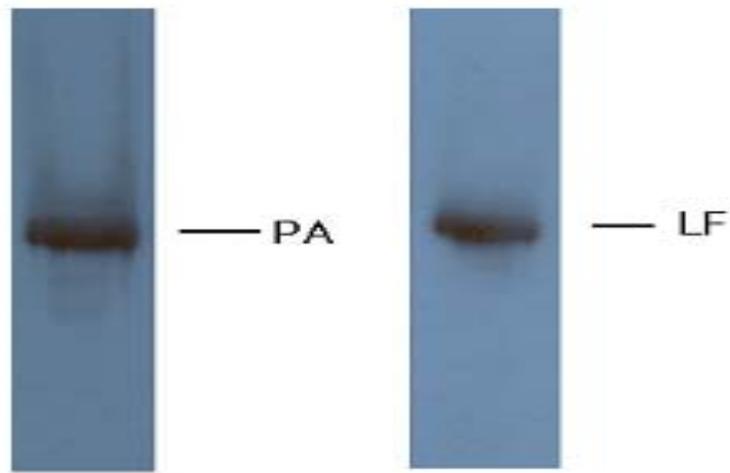


Fig. 3-3. The results of Western blotting assay using monoclonal mouse anti-PA, monoclonal mouse anti-LF, respectively. PA's molecular weight is 83 kDa. LF's molecular weight is 90 kDa.

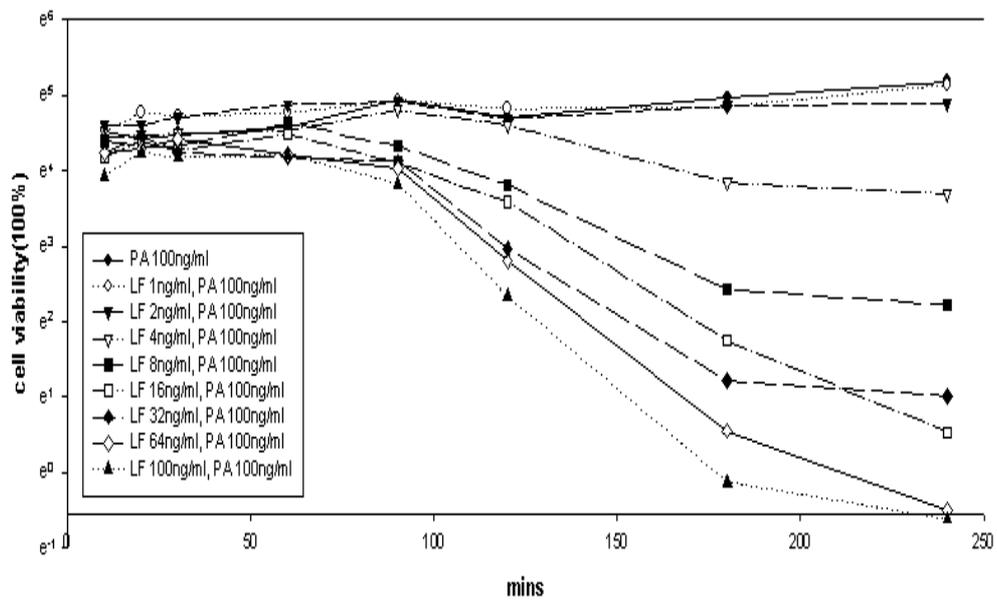


Fig. 3-4. MTT assay of RAW 264.7 cell treated with PA 100 ng/ml, LF 16 ng/ml. Cell cytolysis started after 90 mins. But only PA(100 ng/ml), LF 1, 2 and 4 ng/ml did not show cell death.

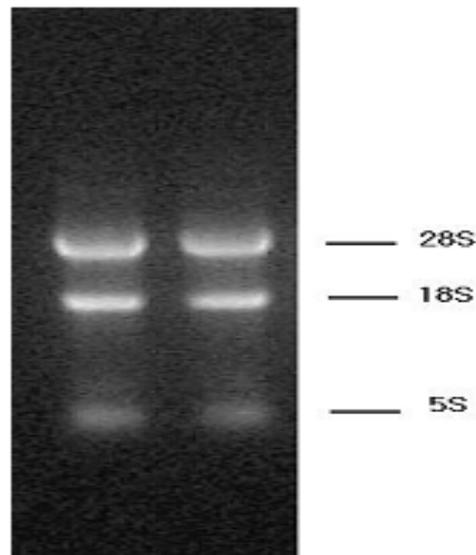


Fig. 3-5. Isolation of total RNA from RAW 264.7 cell treated with PA 100 ng/ml, LF 16 ng/ml. Lane 1; treated PA 100 ng/ml, ratio of A260/A280 is 1.72. Lane 2; treated PA 100 ng/ml, LF 16 ng/ml, ratio of A260/A280 is 1.83.

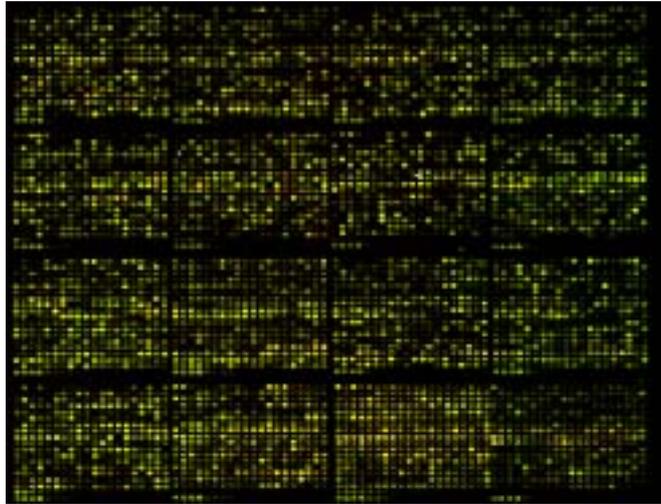


Fig. 3-6. cDNA microarray image of RAW 264.7 cell treated with PA 100 ng/ml, LF 16 ng/ml.

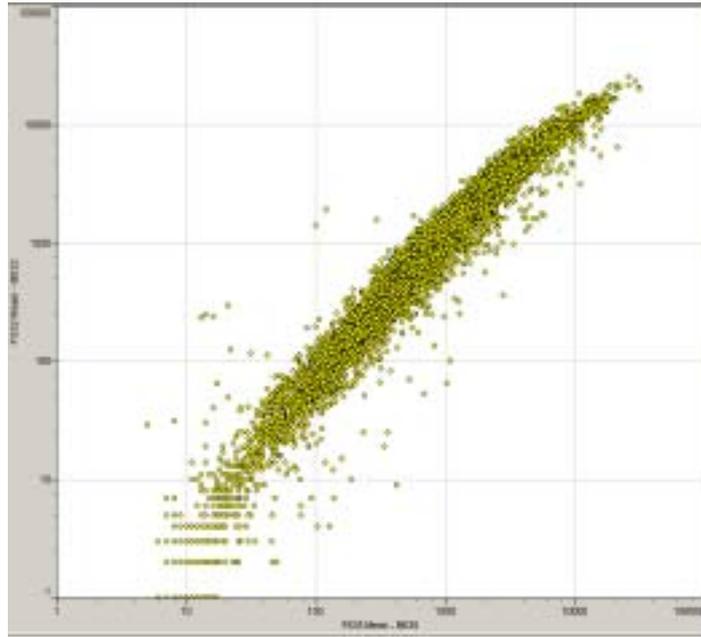


Fig. 3-7. The scatter plot of cDNA microarray using RAW 264.7 cell treated with PA 100 ng/ml, LF 16 ng/ml.

X axis is Cy3 value(F635 value-B635 value). Y axis is Cy5 value(F532 value-B532 value).

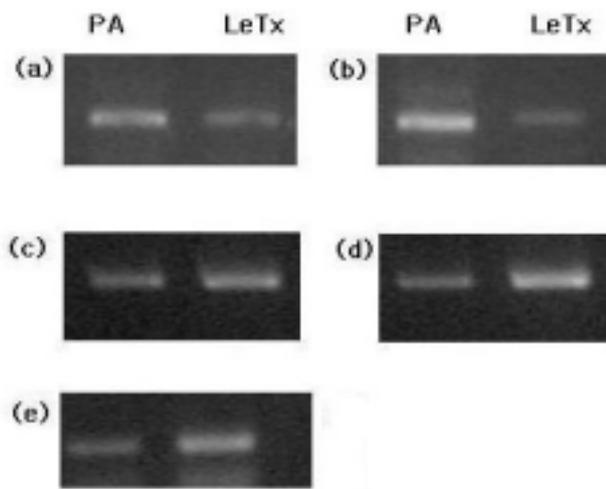


Fig. 3-8. The agarose gel electrophoresis of RT-PCR.

(a)NEK6, (b)RPL10A, (c)JAK1, (d)ATP1B1, (e)BACE. PA means sample treated only PA 100 ng/ml. LeTx means sample treated PA 100 ng/ml, LF 16 ng/ml.

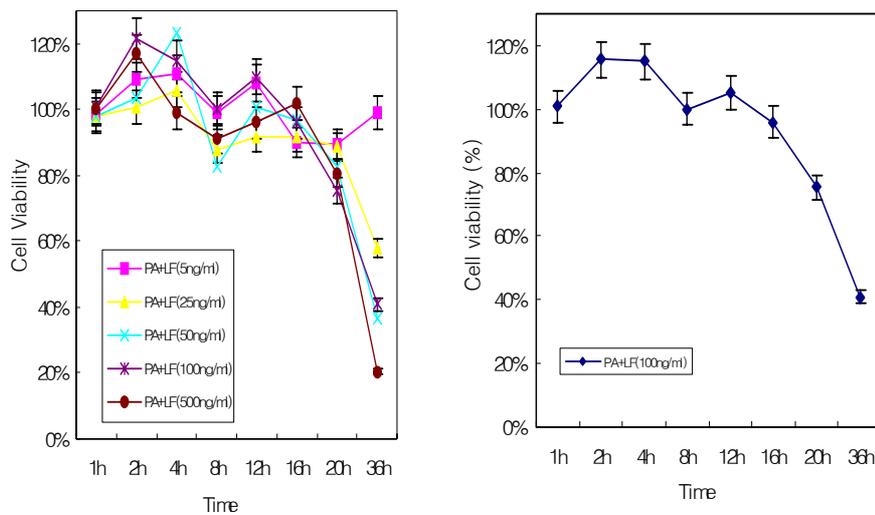
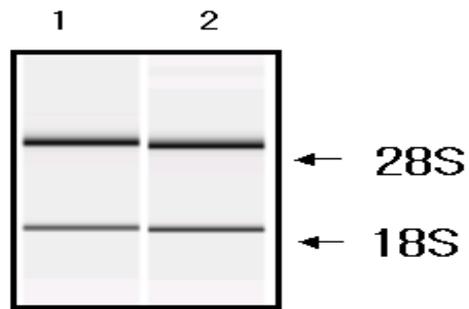


Fig. 3-9. MTT assay of Human monocyte-derived macrophage cells treated with PA 100 ng/ml, LF 100 ng/ml. (a) Cells were treated with anthrax lethal toxin (LeTx) with different concentration and time. Cell cytolysis started after 16h. However, PA (100 ng/ml), LF (100 ng/ml) did not show cell death until 36h infections. Cell cytolysis started after 16h. But only PA(100 ng/ml), LF 5 ng/ml did not show cell death until 36h treatment.



RNA sample QC

	sample	rRNA ratio [28S/18S]
1	PA 2h	1.67
2	LeTx 2h	1.68

Fig. 3-10. Isolation of total RNA from Human monocyte-derived macrohage cells treated with PA 100 ng/ml, LF 100 ng/ml. Lane 1; treated PA 100 ng/ml, ratio of A260/A280 is 1.67. Lane 2; treated PA 100 ng/ml, LF 100 ng/ml, ratio of A260/A280 is 1.68.

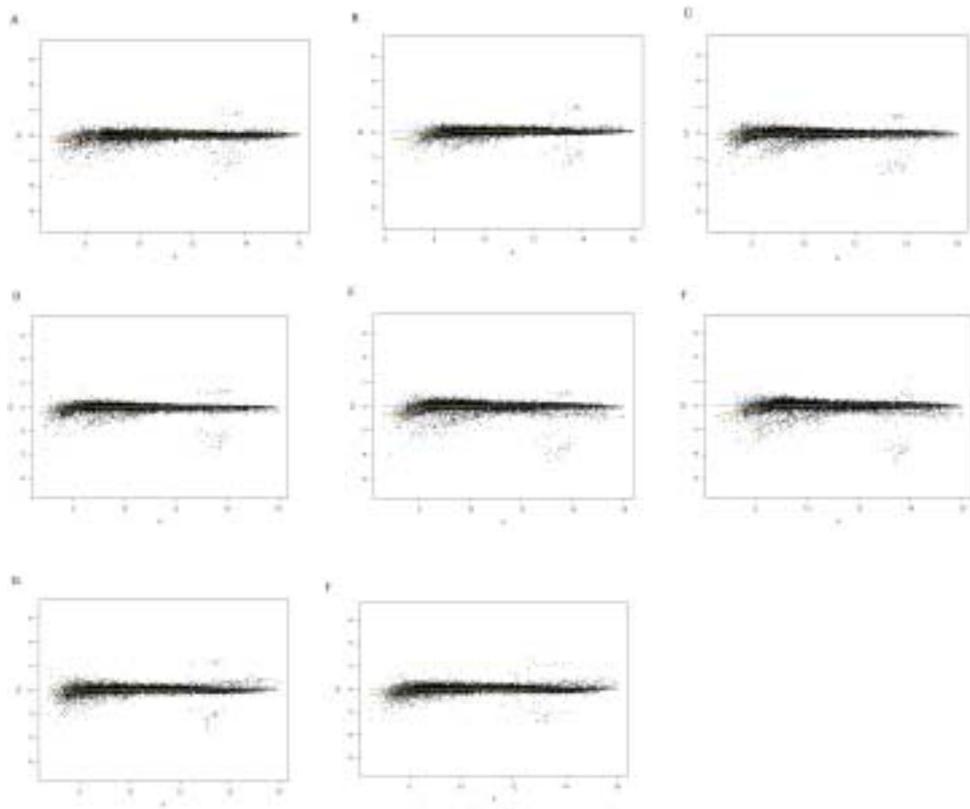


Fig. 3-11. The MA plot of cDNA microarray using human monocyte-derived macrophage cells treated with PA 100 ng/ml, LF 100 ng/ml. A-D are MA plots of 2h infection with lethal toxin, E-F are MA plots of 12h infection with lethal toxin.

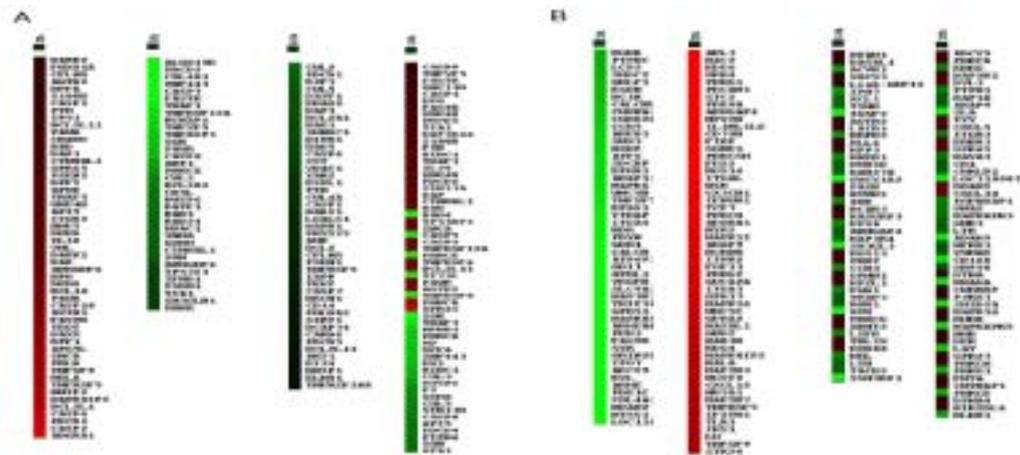


Fig. 3-12. The clustering of cDNA microarray using human monocyte-derived macrophage cells treated with PA 100 ng/ml, LF 100 ng/ml. (A) the category of apoptosis/cell death (B) the category of immune response/response to stress, green color indicate suppressed gene expression and red color indicate induced gene expression.

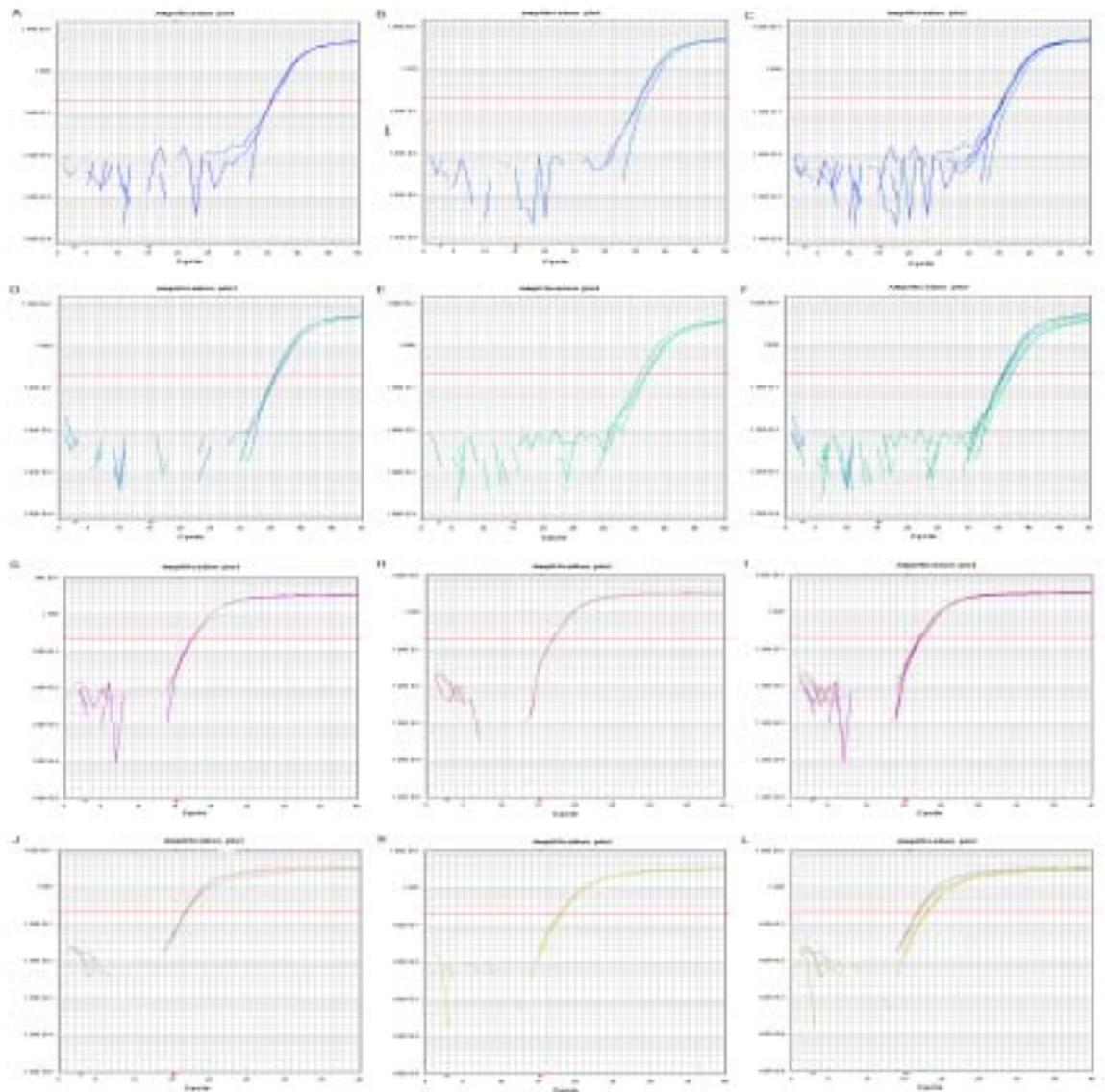


Fig. 3-13. The results of NF-kB1 gene after real-time PCR using SYBR green. Gene expression in HMDMs from only PA infection (A, D) and LeTx (100 ng/ml) infection (B, E) and 2h (A-C) and 12h (D-F) time point. RT-PCR data were analyzed by using the $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ method, with GAPDH gene expression (G-L) serving as a control for calculation of ΔCt values for gene and the mean control value for each stimulation serving as the calibrator for final calculation of mean relative expression values (ddCt)

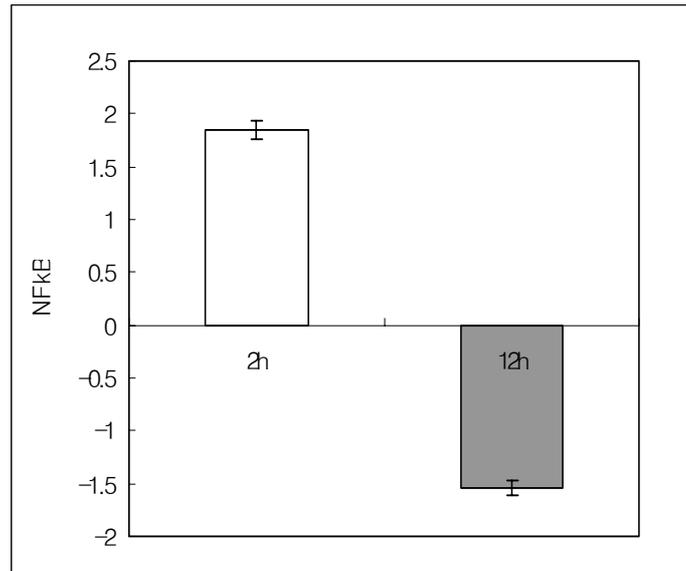


Fig. 3-14. Gene expression in HMDMs from control group (only PA infection) and LeTx (100 ng/ml) infection and different time point (2h and 12h). RT-PCR data were analyzed by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with GAPDH gene expression serving as a control for calculation of ΔCt values for NF- κ B1 gene.

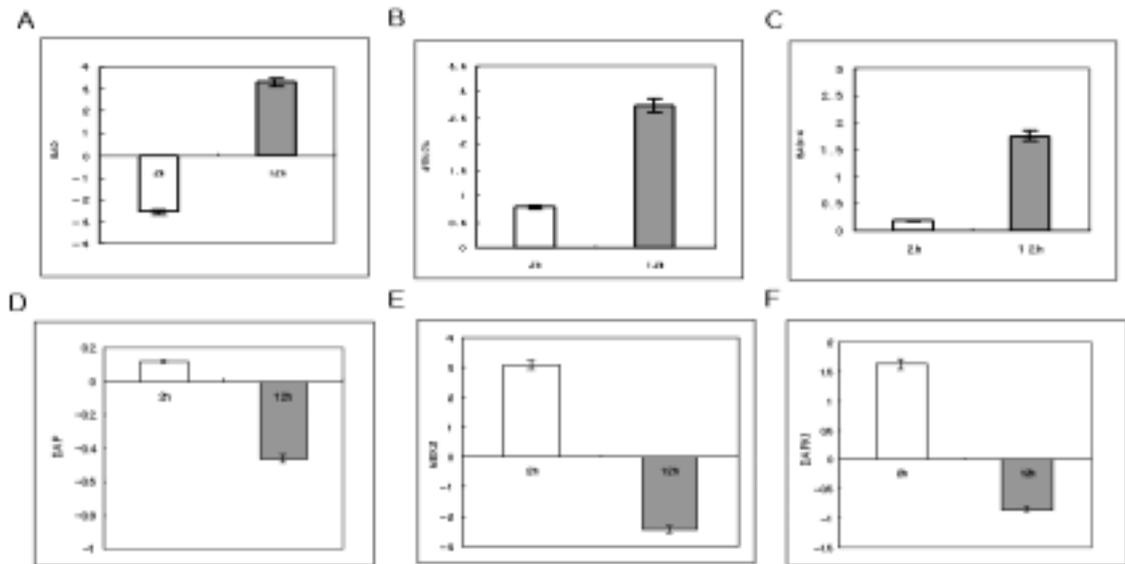


Fig. 3-15. Gene expression in HMDMs from control group (only PA infection) and LeTx (100 ng/ml) infection and different time point (2h and 12h). RT-PCR data were analyzed by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with GAPDH gene expression serving as a control for calculation of ΔCt values for each gene ((A)BAD, (B) STK17A, (C)BAG-4, (D) DAP, (E) MEK2, (F) DAPK1) and the mean control value for each stimulation serving as the calibrator for final calculation of mean relative expression values ($ddCt$). Data for the genes exhibiting differential expression in the different time point (2h and 12h) are shown.

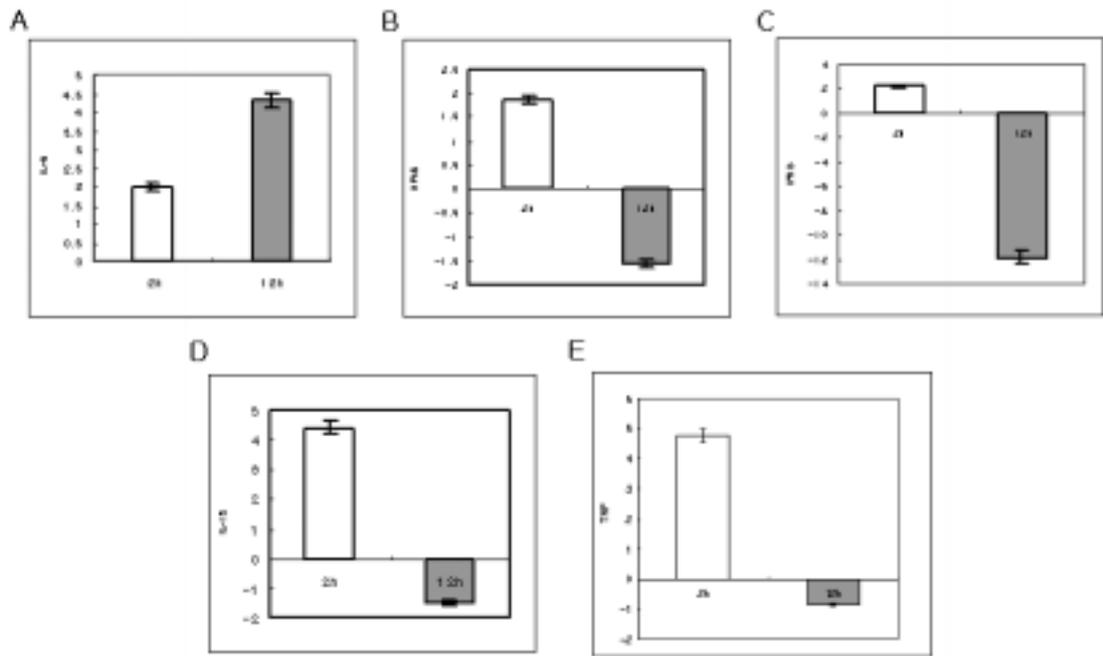


Fig. 3-16. Gene expression in HMDMs from control group (only PA infection) and LeTx (100 ng/ml) infection and different time point (2h and 12h). RT-PCR data were analyzed by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method, with GAPDH gene expression serving as a control for calculation of ΔCt values for each gene ((A) IL-6, (B) NF-kB, (C) IFNG, (D) IL-18, (E) TNF) and the mean control value for each stimulation serving as the calibrator for final calculation of mean relative expression values (ddCt). Data for the genes exhibiting differential expression in the different time point (2h and 12h) are shown.

Table 3-1. Down-regulated genes of RAW 264.7 cell treated with LeTx.

Gene	Title	Biological process	Intensity
RPL10A	Ribosomal protein L10A	Protein biosynthesis	6.61
NOC4	Neighbor of Cox4		6.5
SOX1	Sortilin 1		5.4
SERPIN1	Serine(or cysteine) proteinase inhibitor		4.71
AREP	Acidic ribosomal phosphoprotein P	Protein biosynthesis	4.53
MFRS17	Mitochondrial ribosomal protein S1	Protein biosynthesis	3.72
RPL30	Ribosomal protein L30	Protein biosynthesis	3.70
RPS3	Ribosomal protein S3	Protein biosynthesis	3.55
TPM3	Troponin 3 gamma	Muscle development	3.52
CREM	cAMP responsive element modulator	regulation of transcription	3.09
TLN	Talin		2.97
Ube2i	Ubiquitin-conjugating enzyme E2I	Ubiquitin dependent protein catabolism	2.85
MSH6	MutS homolog 6(<i>E. coli</i>)	DNA repair	2.67
PTDSS2	Phosphatidylserine synthase 2		2.46
SELENEP1	Selenium binding protein 1		2.41
RPL3	Ribosomal protein L3	Protein biosynthesis	2.40
GNB2-RS1	Guanine nucleotide binding protein, beta 2, related sequence 1		2.36
ROBO1	Roundabout homolog 1		2.36
NEK6	NIMA-related expressed kinase 6		2.33
RPS16	Ribosomal protein S16	Protein biosynthesis	2.30
HIST2	Histone protein 4		2.23

Table 3-2. Up-regulated genes of RAW 264.7 cell treated with LeTx.

Gene	Title	Biological process	Intensity
JAK1	Janus kinase 1	Intracellular signaling cascade	0.48
STAT4	Signal transducer and activator of transcription 4	Intracellular signaling cascade	0.48
BT G1	B- cell translocation gene 1, anti-proliferative	Proliferating	0.48
SERPINE2	Serine(or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin) member 2	Tissue remodeling/clotting	0.47
STAT5A	Signal transducer and activator of transcription 5A	Intracellular signaling cascade	0.47
CTSW1	Cathepsin W	Proteolysis	0.46
GAS1	Growth arrest specific 1	Cell cycle arrest	0.45
CNIH	Cornichon homolog (<i>Drosophila</i>)	Intracellular signaling cascade	0.45
GLRX1	Glutaredoxin 1(thioltransferase)	Electron transport	0.45
AQP3	Aquaporin 3	Transport	0.45
FXC1	Fractured callus expressed transcript 1	Transport	0.45
CYP7B1	Cytochrome P450, 7b1	Electron transport	0.45
ATP1A1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting beta 1 polypeptide	Na ⁺ /K ⁺ transport	0.45
AOX1	Aldehyde oxidase 1	Electron transport	0.45
CYP4A10	cytochrome P450, 4a10	Electron transport	0.45
BIRC1E	Baculoviral IAP repeat-containing 1e	Apoptosis	0.44
SLC16A1	Solute carrier family 16 (monocarboxylic acid transporters)	Transport	0.44
BACE	Beta-site APP cleaving enzyme	Proteolysis	0.40
CAMK4	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	Protein amino acid phosphorylation	0.42
APOM	Apolipoprotein M	Transport	0.42
MCPT5	Mast cell protease 5	Proteolysis	0.37
SCYB9	Small inducible cytokine B subfamily(Cys-X-Cys), member	Immune response	0.36
KCNE4	Potassium voltage-gated channel, Isk-related subfamily, gene 4	Ion transport	0.34
PSMB9	Proteasome subunit, beta type 9	Immune response	0.30
CASP8AP2	Caspase 8 associated protein 2	Apoptosis	0.26

Table 3-3. The list of gene expression pattern

Gene	Induced	Repressed
Protein biosynthesis		
RPL10A		○
MPRS17		○
RPL30		○
RPS3		○
RPL3		○
RPL16		○
ARBP		○
Intracellular signaling cascade		
JAK1	○	
STAT4	○	
STAT5A	○	
CNIH	○	
Cell growth		
NEK6		○
GAS1	○	
Tissue remodeling/cloting		
SERPINB2	○	
Proteolysis		
CTSW1	○	
BACE	○	
MCPT5	○	
Transport		
AQP3	○	
FXC1	○	
SLC16A1	○	
APOM	○	
KCNE4	○	
ATP1A1	○	
Electron transport		
CYP7B1	○	
GLRX1	○	
AOX1	○	
CYP4A10	○	

Table 3-4. The gene lists that show differentially expressed patterns and classify into gene functions.

2h infection			12h infection		
Gene Functions		Ratio	Gene Functions		Ratio
Apoptosis/cell death			Apoptosis/cell death		
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	0.41	+	protein kinase C, alpha	0.58	+
BCL2-like 1	0.36	+	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	0.38	+
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	0.33	+	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	0.38	+
arachidonate 15-lipoxygenase, second type	-1.04	--	caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	0.38	+
collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	-0.94	-	BCL2-antagonist of cell death	0.33	+
			death-associated protein	0.32	+
			serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	0.31	+
			BCL2-associated athanogene 4	-2.79	---
			caspase 5, apoptosis-related cysteine protease	-2.39	---
			serum/glucocorticoid regulated kinase	-1.09	--
Immune response/response to stress			Immune response/response to stress		
microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	1.23	+++	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	0.83	++
endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6	0.78	++	interleukin 11	0.55	+
chemokine (C-C motif) receptor 1	0.54	+	interferon, alpha-inducible protein 27	0.51	+
CD226 antigen	-1.56	---	CD1D antigen, d polypeptide	-2.85	---
interleukin 2 receptor, beta	-1.23	--	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	-2.39	---
defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	-1.09	--	C-reactive protein, pentraxin-related serum amyloid A4, constitutive	-2.05	---
				-1.54	--
Cell growth			Cell growth		
high-mobility group protein 2-like 1	1.53	+++	supervillin	0.97	++
carnitine palmitoyltransferase II	1.07	+++	coronin, actin binding protein, 2B	0.75	++
aquaporin 1 (channel-forming integral protein, 28kDa)	0.84	++	MAX dimerization protein 1	-3.28	---
mortality factor 4 like 2	-1.45	--	spectrin SH3 domain binding protein 1	-2.25	---
keratin 7	-0.95	-	dynamin 1	-1.74	---
ollagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	-0.94	-	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	-1.62	---
			gap junction protein, alpha 4, 37kDa (connexin 37)	-1.55	---
			ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E isoform 1	-1.20	--
			serum/glucocorticoid regulated kinase	-1.09	--
			RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	-1.02	--
Signal Transduction			Signal Transduction		
ADP-ribosylation factor-like 3	1.13	+++	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	0.76	++
endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6	0.78	++	dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)	0.66	+
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	-1.20	--	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2	-2.58	---
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	-1.15	--	SH3-domain GRB2-like 3	-2.47	---

phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa	-1.04	--	spectrin SH3 domain binding protein 1	-2.25	---
collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	-0.94	-	protein kinase C, epsilon	-1.46	--
			importin 7	-1.35	--
			integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	-1.02	--
Transcription			Transcription		
general transcription factor IIC, polypeptide 4, 90kDa	0.74	++	homolog of Yeast RRP4 (ribosomal RNA processing 4), 3'-5'-exoribonuclease	0.90	++
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	0.59	++	peroxisome proliferative activated receptor, alpha	0.70	++
inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein	-1.25	--	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	0.65	+
interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	-0.90	-	aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	0.55	+
			UBX domain containing 2	-1.52	---
			E2F transcription factor 6	-1.15	--
			cyclin H	-0.97	-

0.3~0.7: + ; 0.7~1.0: ++ ; 1.0~1.5: +++ ; -0.5~-1.0: - ; -1.0~-1.5:-- ; -1.5>:---

Table 3-5. The Δ Ct values of NF- κ B1 and GAPDH gene

Sample Name	Detector Name	Ct	Detector Name	Ct
2h-PA	NF- κ B1	24.26255	GAPDH	17.34959
2h-PA	NF- κ B1	24.48643	GAPDH	17.43594
2h-PA	NF- κ B1	24.27945	GAPDH	17.40751
2h-LeTx	NF- κ B1	23.87165	GAPDH	17.05794
2h-LeTx	NF- κ B1	24.00778	GAPDH	17.06862
2h-LeTx	NF- κ B1	24.16906	GAPDH	17.04793
12h-PA	NF- κ B1	22.65936	GAPDH	16.67673
12h-PA	NF- κ B1	22.52463	GAPDH	16.77535
12h-PA	NF- κ B1	23.47535	GAPDH	16.8478
12h-LeTx	NF- κ B1	24.5775	GAPDH	17.81178
12h-LeTx	NF- κ B1	24.97232	GAPDH	17.96163
12h-LeTx	NF- κ B1	24.46268	GAPDH	18.08765

Table 3-6. The list of genes that are related to apoptosis/cell death category

Apoptosis/cell death	Gene Symbol	Cluster ID	Ratio	Time point
adenosine A1 receptor	ADORA1	Hs.77867	0.45	2h
caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)	CASP2	Hs.433103	0.44	2h
programmed cell death 1	PDCD1	Hs.158297	0.41	2h
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	Hs.74122	0.41	2h
BCL2-like 1	BCL2L1	Hs.305890	0.36	2h
mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	MAPK8IP2	Hs.356523	0.35	2h
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	BNIP2	Hs.204539	0.35	2h
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 5	TNFRSF5	Hs.504816	0.33	2h
FAST kinase	FASTK	Hs.75087	-0.70	2h
caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	CASP7	Hs.9216	-0.83	2h
zinc finger protein 443	ZNF443	Hs.142150	-0.93	2h
collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	COL4A3	Hs.407817	-0.94	2h
programmed cell death 2	PDCD2	Hs.367900	-0.97	2h
arachidonate 15-lipoxygenase, second type	ALOX15B	Hs.111256	-1.04	2h
G protein-coupled receptor 65	GPR65	Hs.131924	0.68	12h
protein kinase C, alpha	PRKCA	Hs.349611	0.58	12h
angiotensin II receptor, type 2	AGTR2	Hs.405348	0.46	12h
PRKC, apoptosis, WT1, regulator	PAWR	Hs.406074	0.41	12h
BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)	BCL2L11	Hs.84063	0.38	12h
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	Hs.82359	0.38	12h
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12A	TNFRSF12A	Hs.355899	0.38	12h
caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CASP3	Hs.141125	0.38	12h
synuclein, alpha (non A4 component of amyloid precursor)	SNCA	Hs.76930	0.37	12h
tumor protein p53 binding protein, 2	TP53BP2	Hs.44585	0.35	12h
BCL2-antagonist of cell death	BAD	Hs.76366	0.33	12h
catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	CTNNA1	Hs.58488	0.32	12h
death-associated protein	DAP	Hs.75189	0.32	12h
serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	STK17A	Hs.9075	0.31	12h
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFKB1	Hs.160557	-0.72	12h
TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	Hs.297660	-0.80	12h
serum/glucocorticoid regulated kinase	SGK	Hs.296323	-1.09	12h
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	TNFRSF9	Hs.193418	-1.19	12h
tumor protein p73-like	TP73L	Hs.137569	-1.29	12h
protein kinase C, epsilon	PRKCE	Hs.155281	-1.46	12h
caspase 5, apoptosis-related cysteine protease	CASP5	Hs.213327	-2.39	12h
BCL2-associated athanogene 4	BAG4	Hs.194726	-2.79	12h

Table 3-7. The list of genes that are related to immune response/response to stress category

Immune response/response to stress	Gene Symbol	Cluster ID	Ratio	Time point
leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 3	LILRB3	Hs.511766	1.33	2h
microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	MAPRE2	Hs.446375	1.23	2h
endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6	EDG6	Hs.159543	0.78	2h
lipocalin 1 (tear prealbumin)	LCN1	Hs.2099	0.77	2h
CD1A antigen, a polypeptide	CD1A	Hs.1309	0.64	2h
chemokine (C-C motif) receptor 1	CCR1	Hs.301921	0.54	2h
CD79B antigen (immunoglobulin-associated beta)	CD79B	Hs.89575	0.50	2h
chemokine (C-X-C motif) ligand 9	CXCL9	Hs.77367	-0.87	2h
defensin, alpha 5, Paneth cell-specific	DEFA5	Hs.72887	-1.09	2h
interleukin 2 receptor, beta	IL2RB	Hs.75596	-1.23	2h
CD226 antigen	CD226	Hs.369661	-1.56	2h
chemokine (C-X-C motif) ligand 10	CXCL10	Hs.413924	0.83	12h
guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	GBP1	Hs.62661	0.68	12h
chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	Hs.89714	0.66	12h
leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B (with TM and ITIM domains), member 4	LILRB4	Hs.67846	0.57	12h
interleukin 11	IL11	Hs.1721	0.55	12h
adenosine deaminase, RNA-specific	ADAR	Hs.7957	0.51	12h
interferon, alpha-inducible protein 27	IFI27	Hs.278613	0.51	12h
indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	INDO	Hs.840	0.50	12h
inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein	IKBKAP	Hs.31323	-0.83	12h
integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)	ITGB1	Hs.287797	-0.86	12h
chemokine (C motif) ligand 1	XCL1	Hs.174228	-0.90	12h
complement component 6	C6	Hs.1282	-1.00	12h
chemokine (C-C motif) receptor 3	CCR3	Hs.506190	-1.14	12h
Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor for (CD32)	FCGR2A	Hs.352642	-1.37	12h
serum amyloid A4, constitutive	SAA4	Hs.512677	-1.54	12h
alpha-fetoprotein	AFP	Hs.155421	-1.55	12h
CD1B antigen, b polypeptide	CD1B	Hs.1310	-1.60	12h
linker for activation of T cells	LAT	Hs.498997	-1.73	12h
CD160 antigen	CD160	Hs.81743	-2.04	12h
C-reactive protein, pentraxin-related	CRP	Hs.76452	-2.05	12h
platelet factor 4 variant 1	PF4V1	Hs.72933	-2.39	12h
carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 8	CEACAM8	Hs.41	-2.39	12h
CD1D antigen, d polypeptide	CD1D	Hs.1799	-2.85	12h

Table 3-8. The list of genes that are related to cell growth category

Cell growth		Cluster ID	Ratio	Time point
high-mobility group protein 2-like 1	HMG2L1	Hs.92260	1.53	2h
KIAA0528 gene product	KIAA0528	Hs.30656	1.51	2h
microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	MAPRE2	Hs.446375	1.23	2h
carnitine palmitoyltransferase II	CPT2	Hs.274336	1.07	2h
aquaporin 1 (channel-forming integral protein, 28kDa)	AQP1	Hs.76152	0.84	2h
interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	ILF3	Hs.256583	-0.90	2h
collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	COL4A3	Hs.407817	-0.94	2h
folate receptor 1 (adult)	FOLR1	Hs.73769	-0.95	2h
keratin 7	KRT7	Hs.23881	-0.95	2h
PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	PMS1	Hs.111749	-0.99	2h
Enah/Vasp-like	EVL	Hs.241471	-1.19	2h
mortality factor 4 like 2	MORF4L2	Hs.411358	-1.45	2h
supervillin	SVIL	Hs.163111	0.97	12h
homolog of Yeast RRP4 (ribosomal RNA processing 4), 3'-5'-exoribonuclease	RRP4	Hs.511949	0.90	12h
coronin, actin binding protein, 2B	CORO2B	Hs.24907	0.75	12h
solute carrier organic anion transporter family, member 3A1	SLCO3A1	Hs.113657	0.74	12h
gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, pi	GABRP	Hs.439141	0.72	12h
discs, large homolog 3 (neuroendocrine-dlg, <i>Drosophila</i>)	DLG3	Hs.11101	-1.00	12h
RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	RASA1	Hs.758	-1.02	12h
T-cell acute lymphocytic leukemia 1	TAL1	Hs.73828	-1.04	12h
oligodendrocyte lineage transcription factor 2	OLIG2	Hs.176977	-1.04	12h
serum/glucocorticoid regulated kinase	SGK	Hs.296323	-1.09	12h
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, <i>Drosophila</i>); translocated to, 3	MLLT3	Hs.404	-1.10	12h
epiregulin	EREG	Hs.115263	-1.10	12h
E2F transcription factor 6	E2F6	Hs.135465	-1.15	12h
papillary renal cell carcinoma (translocation-associated)	PRCC	Hs.9629	-1.18	12h
epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	EPS8	Hs.2132	-1.18	12h
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9	TNFRSF9	Hs.193418	-1.19	12h
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E isoform 1	ATP6V1E1	Hs.77805	-1.20	12h
ferritin, heavy polypeptide 1	FTH1	Hs.448738	-1.24	12h
ecotropic viral integration site 2A	EVI2A	Hs.70499	-1.26	12h
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 6	DDX6	Hs.271541	-1.31	12h
HIV-1 Rev binding protein	HRB	Hs.352962	-1.35	12h
hypothetical protein FLJ25410	FLJ25410	Hs.126780	-1.46	12h
alpha-fetoprotein	AFP	Hs.155421	-1.55	12h
gap junction protein, alpha 4, 37kDa (connexin 37)	GJA4	Hs.296310	-1.55	12h
ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 70kDa, V1 subunit A	ATP6V1A	Hs.409131	-1.62	12h

MRE11 meiotic recombination 11 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)	MRE11A	Hs.20555	-1.65	12h
dynamamin 1	DNM1	Hs.436132	-1.74	12h
chromosome 20 open reading frame 150	C20orf150	Hs.301040	-1.82	12h
CD160 antigen	CD160	Hs.81743	-2.04	12h
nucleolar protein 1, 120kDa	NOL1	Hs.15243	-2.10	12h
spectrin SH3 domain binding protein 1	SSH3BP1	Hs.42710	-2.25	12h
ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	ATM	Hs.526394	-2.31	12h
MAX dimerization protein 1	MAD	Hs.379930	-3.28	12h

Table 3-9. The list of genes that are related to signal transduction category

Signal Transduction	Gene Symbol	Cluster ID	Ratio	Time point
ADP-ribosylation factor-like 3	ARL3	Hs.182215	1.13	2h
ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	RAC2	Hs.301175	0.86	2h
endothelial differentiation, G-protein-coupled receptor 6	EDG6	Hs.159543	0.78	2h
glutamate receptor, metabotropic 4	GRM4	Hs.429018	0.75	2h
metastasis suppressor 1	MTSS1	Hs.77694	-0.84	2h
Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	ROCK2	Hs.58617	-0.85	2h
adenylate cyclase 9	ADCY9	Hs.20196	-0.90	2h
collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	COL4A3	Hs.407817	-0.94	2h
phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa	PDE1C	Hs.422923	-1.04	2h
hypothetical protein LOC118987	LOC118987	Hs.131834	-1.07	2h
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4	MAP3K4	Hs.390428	-1.15	2h
Enah/Vasp-like	EVL	Hs.241471	-1.19	2h
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	Hs.247362	-1.20	2h
dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	DDAH2	Hs.247362	0.76	12h
G protein-coupled receptor 65	GPR65	Hs.131924	0.68	12h
v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	ERBB3	Hs.306251	0.68	12h
chemokine (C-X-C motif) ligand 5	CXCL5	Hs.89714	0.66	12h
peptide YY	PYY	Hs.169249	0.66	12h
dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)	DVL3	Hs.381928	0.66	12h
mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP2K1	Hs.132311	0.58	12h
adenylate cyclase 9	ADCY9	Hs.20196	0.57	12h
RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	RASA1	Hs.758	-1.02	12h
integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	ITGB3	Hs.87149	-1.02	12h
protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 1	PTPN1	Hs.418004	-1.06	12h
epiregulin	EREG	Hs.115263	-1.10	12h
faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome)	FGD1	Hs.104349	-1.12	12h
chemokine (C-C motif) receptor 3	CCR3	Hs.506190	-1.14	12h
epidermal growth factor receptor pathway substrate 8	EPS8	Hs.2132	-1.18	12h
insulin-degrading enzyme	IDE	Hs.290659	-1.18	12h
bone morphogenetic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	BMPR2	Hs.53250	-1.32	12h
importin 7	IPO7	Hs.434408	-1.35	12h
activin A receptor, type I	ACVR1	Hs.150402	-1.36	12h
killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	KLRB1	Hs.169824	-1.36	12h
protein kinase C, epsilon	PRKCE	Hs.155281	-1.46	12h
protein kinase, cGMP-dependent, type I	PRKG1	Hs.2689	-1.55	12h
linker for activation of T cells	LAT	Hs.498997	-1.73	12h

Ras-related GTP binding A	RRAGA	Hs.432330	-2.01	12h
CD160 antigen	CD160	Hs.81743	-2.04	12h
alpha disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	ADAM9	Hs.2442	-2.06	12h
hypothetical protein LOC118987	LOC118987	Hs.131834	-2.06	12h
Src-like-adaptor	SLA	Hs.75367	-2.19	12h
spectrin SH3 domain binding protein 1	SSH3BP1	Hs.42710	-2.25	12h
ataxia telangiectasia mutated (includes complementation groups A, C and D)	ATM	Hs.526394	-2.31	12h
SH3-domain GRB2-like 3	SH3GL3	Hs.270055	-2.47	12h
guanylate cyclase 1, soluble, alpha 2	GUCY1A2	Hs.178295	-2.58	12h

Table 3-10. The list of genes that are related to transcription category

Transcription	Gene. Symbol	Cluster ID	Ratio	Time point
high-mobility group protein 2-like 1	HMG2L1	Hs.92260	1.53	2h
KIAA1404 protein	KIAA1404	Hs.371794	1.01	2h
general transcription factor IIIC, polypeptide 4, 90kDa	GTF3C4	Hs.22302	0.74	2h
cartilage paired-class homeoprotein 1	CART1	Hs.41683	0.65	2h
paired box gene 8	PAX8	Hs.308061	0.65	2h
Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 1	CITED1	Hs.40403	0.59	2h
v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	MAFB	Hs.169487	0.56	2h
zinc finger protein 8 (clone HF.18)	ZNF8	Hs.2077	0.54	2h
activated RNA polymerase II transcription cofactor 4	PC4	Hs.229641	-0.75	2h
nuclear antigen Sp100	SP100	Hs.371696	-0.76	2h
T-cell acute lymphocytic leukemia 1	TAL1	Hs.73828	-0.77	2h
dachshund homolog (Drosophila)	DACH	Hs.63931	-0.82	2h
zinc finger protein 551	ZNF551	Hs.184846	-0.84	2h
developmentally regulated GTP binding protein 1	DRG1	Hs.115242	-0.87	2h
interleukin enhancer binding factor 3, 90kDa	ILF3	Hs.256583	-0.90	2h
PHD finger protein 15	PHF15	Hs.397990	-0.92	2h
zinc finger protein 443	ZNF443	Hs.142150	-0.93	2h
PMS1 postmeiotic segregation increased 1 (S. cerevisiae)	PMS1	Hs.111749	-0.99	2h
inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein homolog of Yeast RRP4 (ribosomal RNA processing 4), 3'-5'-exoribonuclease	ID1	Hs.410900	-1.25	2h
zinc finger protein 358	RRP4	Hs.511949	0.90	12h
zinc finger protein 358	ZNF358	Hs.133475	0.84	12h
peroxisome proliferative activated receptor, alpha	PPARA	Hs.271640	0.70	12h
collagen, type IV, alpha 3 (Goodpasture antigen)	COL4A3	Hs.407817	0.68	12h
Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	KLF7	Hs.436708	0.65	12h
hypothetical protein BC005868	LOC90233	Hs.184846	0.63	12h
chemokine-like factor super family 4	CKLFSF4	Hs.325825	0.57	12h
lysyl oxidase-like 1	LOXL1	Hs.65436	0.55	12h
aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2	ARNT2	Hs.6111	0.55	12h
cofactor of BRCA1	COBRA1	Hs.410095	0.54	12h
disabled homolog 2, mitogen-responsive phosphoprotein (Drosophila)	DAB2	Hs.81988	0.51	12h
brain abundant, membrane attached signal protein 1	BASP1	Hs.511745	0.51	12h
dyskeratosis congenita 1, dyskerin	DKC1	Hs.4747	-0.94	12h
cyclin H	CCNH	Hs.514	-0.97	12h
T-cell acute lymphocytic leukemia 1	TAL1	Hs.73828	-1.04	12h

oligodendrocyte lineage transcription factor 2	OLIG2	Hs.176977	-1.04	12h
myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 3	MLLT3	Hs.404	-1.10	12h
E2F transcription factor 6	E2F6	Hs.135465	-1.15	12h
UBX domain containing 2	UBXD2	Hs.350806	-1.52	12h
SRY (sex determining region Y)-box 9 (campomelic dysplasia, autosomal sex-reversal)	SOX9	Hs.2316	-1.65	12h
nucleolar protein 1, 120kDa	NOL1	Hs.15243	-2.10	12h
HMG2 like	LOC127540	Hs.236810	-2.23	12h
MAX dimerization protein 1	MAD	Hs.379930	-3.28	12h

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연구개발의 목표 달성도

구 분	평가의 착안점 및 달성도	
	착 안 사 항	달성도(%)
1차년도(2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ DNA microarray chip 제작 혹은 확보 여부 ○ 대식세포에 각각 다른 특성을 갖는 탄저균을 처리하여 반응 분석 조건 확립 여부 ○ 각각의 탄저균을 대식세포에 처리시, 특이하게 반응하는 유전자를 DNA microarray chip을 사용하여 분석 및 확보 여부 (20종 이상) ○ 각각의 탄저균을 대식세포에 처리시, 특이하게 반응하는 단백질을 2DE 및 MALDI-TOF 사용으로 분석 및 확보 여부 (20종 이상) ○ 스톤 균주에서 방어항원과 치사요소의 분리 및 정제 여부 ○ 유전자와 단백질의 데이터베이스 구축 여부 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
2차년도(2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 치사독소의 특성 분석 여부 ○ 대식세포에 치사독소를 처리하였을 때, 특이하게 반응하는 유전자를 DNA chip을 이용하여 분석 및 확보 ○ 방어항원과 치사 요소 처리시, 대식세포의 단백질 변화 양상을 proteomics 기술로 분석 및 확보 ○ 확보된 유전자의 기능 분석 ○ 확보된 단백질의 특성 분석 ○ 유전자와 단백질의 데이터베이스 구축 여부 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
3차년도(2003)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 치사독소에 의한 대식세포의 반응 양상을 시간별로 분석 여부 - cDNA microarray chip 분석 - 단백질 분석 (2DE 및 MALDI-TOF 분석) ○ 치사독소와 관련 단백질의 반응 분석 여부 ○ 유전자와 단백질의 데이터베이스 구축 여부 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 탄저 치사독소의 정제 및 특성 분석 여부 ○ 탄저 병원성 관련 유전자나 단백질의 확보 여부 ○ 치사 독소에 관련된 유전자나 단백질 확보 여부 ○ 확보된 유전자나 단백질의 특성 분석 여부 ○ 유전자와 단백질의 데이터베이스 구축 여부 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

2절. 평가착안점에 입각한 연구개발 목표의 달성도:

평가착안점에 입각한 연구개발 목표는 100% 달성하였다. 본 과제를 달성하기 위하여, 연구팀을 세 개로 나누어 실험을 수행하였다. 즉, 탄저 치사독소나 탄저균 아포가 숙주 세포에 들어갔을 때 처음으로 반응하게 되는 대식세포와의 관계를 (1) 프로테오믹스 기술을 이용하여 분석하였고, (2) 치사독소를 정제하여 그 기질을 분석하였고, (3) DNA chip 기술을 이용하여 대식세포에서 발현되는 유전자를 분석하였다.

프로테오믹스 기술을 이용하여 생쥐 대식세포에서 또는 사람의 대식세포에서 탄저 치사독소나 탄저균 아포에 의하여 발현하는 단백질을 5종 이상 동정할 수 있었으며, 탄저 아포에 의한 사람 대식세포에서는 21개의 단백질을 동정하였다. 탄저 치사독소나 탄저균 아포에 의하여 발현에 영향을 받는 각각의 단백질 중 중요한 역할을 수행하는 단백질에 대한 연구를 실시간 역전사유전자 증폭방법이나 웨스턴 블롯팅 방법으로 수행하여 치사독소나 탄저균 아포가 대식세포에 영향을 미치는 초기 기전을 이해하고자 하였다.

또한, 치사독소를 클로닝하여 과량 생산에 성공하였고, 생체내 기질이 되는 MEK 등을 클로닝하여 과량 생산하여 효소학적인 관점에서 치사독소의 특성과 pH에 의한 특성을 규명하였다. MAPKK 종류 이외에는 아직까지 확실하게 생체내 치사독소의 기질이 규명되지 않고 있어, 치사독소의 생체내 기질이 확보되거나, 혹은 치사독소의 저해 효과를 갖는 물질이 규명된다면, 치사독소 치료제 개발도 가능할 것이다.

또한, 탄저 치사 독소나 탄저균 아포에 의한 생쥐 대식세포나 사람 대식세포의 초기 반응을 cDNA array chip을 사용하여 규명하였다. 이때 사용한 치사독소의 농도는 프로테오믹스 연구에 사용한 독소의 농도보다 낮은 아급성치사독소량으로 처리하였다. 생쥐 대식세포의 경우, 대개의 단백질 생합성 관련 효소들의 발현이 낮았졌으며, 신호전달에 관련된 단백질이나 세포성장, 조직의 리모델링, 단백질가수분해효소, 물질을 이동시키는 데 관련된 단백질들의 유전자 발현은 증가하였다. 사람 대식세포의 경우도 처리후, 2시간이나 12시간 등에 따라서 발현되는 유전자의 양상이 변하였으며, 결국 치사독소에 의하여 세포가 방어하는 기전 혹은 치사독소의 양이 많은 경우 세포가 사멸하는데 관련된 유전자의 발현이 현저하게 증가함을 확인할 수 있었다.

3절. 관련분야의 기술발전예의 기여도:

지금까지, 탄저 치사독소나 탄저균 아포를 이용하여 생쥐 대식세포나 사람 대식세포에 처리하여 이들이 어떻게 숙주세포에서 처음 만나는 대식세포에서 어떻게 살아 남고, 대식세포는 또 어떻게 반응하는가에 대한 유전자 발현 양상이나 단백질 발현 양상에 관련된 연구는 아직 발표된 바 없다. 탄저균 아포가 생체내에 흡입되어 들어와 폐에 들어오게 되면 적어도 8,000개의 아포만 있어도 이들이 폐포 대식세포를 통하여 받아하고 생

체내로 들어오게 된다. 들어온 탄저균 아포는 발아하여 성장하면서 치사독소 등을 배출하게 되고 이들 배출된 치사독소에 의하여 숙주 (소 등 가축이나 사람)은 죽게된다. 항생체에 의하여 생체내의 탄저균을 모두 죽였다고 하더라도, 결국 생성한 치사독소 등에 의하여 숙주는 죽게된다. 아직까지도 그 기전을 확실하게 모르는 치사독소의 특성과 기질이나 저해제에 대한 연구나, 백신이나 치료제의 개발을 미국을 비롯한 선진외국에서는 엄청난 예산을 들여 연구하고 있는 중이다. 균주나 유전자나 혹은 이들에 관한 정보가 국가간 통용되지 못하고 있는 지금의 현실에서, 자체적으로 치사독소의 저해제를 개발하거나, 치사독소의 기전을 이해하여 백신이나 치료제를 개발하는 일은 국내의 가축 뿐만 아니라, 우리 국민의 안녕을 위해서도 중요한 일이다.

본 연구를 수행하면서, 기존의 연구 방법을 그대로 답습한 것이 아니라, DNA array chip 기술이나 프로테오믹스 기술을 도입하여 post-genome 시대에 걸맞는 연구를 수행하였고, 그에 대한 기능적 유전체학, 단백질체학, 생물정보학 등의 도움으로 탄저 독소 혹은 탄저균 아포 처리에 관련된 새로운 단백질이나 유전자를 확보 및 동정하여 최초로 탄저 치사독소 관련 유전자나 단백질의 발현 양상을 발표할 수 있었다. 이들 첨단 기술을 사용함으로써, 이들 운영에 관련된 인력을 양성하였고, 첨단 기술을 갖고 연구를 수행함으로써, 탄저 치사독소나 탄저균 아포의 영향에 대한 기전을 조금 더 이해할 수 있었으며, 확보된 유전자나 단백질의 특성을 이용하여 탄저균 탐색에 관련된 바이오마커 개발이나, 백신 및 치료제 개발에 대한 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 또한, 탄저균 뿐만 아니라, 여러 가지 세균성 병원균에 대한 백신이나 치료제 개발 혹은 연구 등에 대한 기초 자료로도 충분히 활용할 수 있을 것으로 보인다.

몇 가지 예를 들어 보면, 다음과 같다.

- 1) 본 연구를 통하여 확립된 탄저균 치사독소의 초기 숙주 세포에 대한 병원성 관련 경로에 대한 규명은 (cDNA microarray chip 기술, proteomics 분석 기술, 효소 이용 기술, 단백질 구조 결정 기술, 효소반응속도결정 기술, 단백질 발현 기술, 효소 반응 저해제 탐색 기술, 백신 개발 기술 등) 고도의 기술과 지식이 필요한 첨단 생명공학기술임.
- 2) 본 기술은 앞으로 다양한 용도의 신규 백신 및 치료제 개발 및 생산에 응용 될 수 있음. 또한 병원체 미생물의 병원성 유발 요인을 분석하고, 독소들의 독력 대사경로를 결정하는 기술은 질병의 예방과 치료 연구에 도움을 줄 것으로 기대됨.
- 3) cDNA microarray chip 기술 및 proteomics 분석 기술을 통한 탄저균 발병 경로에 대한 규명에 필요할 뿐만 아니라, 다른 가축 질병의 발병 경로에 대한 분석이나 이들에 대한 백신 및 치료제 개발에도 도움이 될 것임.
- 4) 백신 개발 기술은 고도의 기술과 지식을 필요로 하기 때문에 기술의 독점성이 강하고 순수익율이 다른 산업에 비해서 월등이 높음. 또한 미생물 병원체에 의한 발병 기작을 밝히는 것은 여러 질병의 감염 경로와 예방 및 치료에 있어 중요한 정보를 제공하므로

이를 이용한 기술은 산업적 활용가치가 높고 중요함.

5) 탄저 발병 경로를 규명함으로써 이 기술을 활용하여 다른 미생물 병원체에 의한 여타 가축 질병의 병인을 규명하고 또한 이를 이용한 질병의 예방과 치료제 등의 개발에 활용되어 관련 산업 분야의 활성화에 영향을 주게 되고, 원료 및 제조비용의 감소, 수입 대체 효과 등의 측면에서 관련 산업체에 경제적 도움을 주게 될 것임.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

1절. 추가연구의 필요성

현재까지의 지원으로, 탄저균 아포에 의하여 발현되는 생쥐대식세포의 단백질을 확보하여 기능을 분석하고 이에 관련된 단백질을 특허(출원번호 10-2003-0032454, 출원인: 채영규 등)를 출원하였으며, 이를 이용하여 탄저의 감염에 대한 바이오 마커와 백신에 대한 후보 물질이 제공될 수 있다. 이는 이미 국내 논문에 투고 완료하였다("생쥐 대식세포 RAW264.7에서 탄저균 아포 감염에 의한 프로테오믹스분석", 대한 미생물학회). 사람 대식세포에 대한 탄저균 아포를 이용한 프로테오믹스 분석은 ("Targeting of *Bacillus anthracis* interaction factors for human macrophages using two-dimensional gel electrophoresis", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2004) 322, 854-859)에 게재하였다. 치사독소에 의한 마우스 대식세포의 영향에 대한 연구도 현재 논문 투고 중에 있으며("탄저 치사독소에 의한 생쥐 대식세포 (RAW264.7) 에 대한 프로테오믹스 분석", 대한미생물학회), 사람 대식세포에 대한 탄저균 아포의 처리에 대한 특허도 출원 중에 있다(프로테오믹스 분석으로 초기 탄저 감염 바이오마커 확인 및 발굴에 관한 방법, 출원중).

또한, 치사독소의 대량 발현체제 구축 및 활성화법 검증에 대해서는 외국 학술지 ("Production and proteolysis assay of lethal factor from *Bacillus anthracis*" *Protein Expression and Purification*, (2003) 30, 2930300)에 게재하였으며 이와 더불어 치사독소의 high-throughput inhibitor screening 법을 개발하였다. 이는 치사독소의 저해제 개발에 큰 도움을 줄 것으로 사료되어지는 바이다. 또한 치사독소의 박테리아를 이용한 대량생산체제 구축은 독소의 기능을 연구함에 있어 *Bacillus anthracis* 균주를 직접 배양하지 않아도 됨으로써 보다 쉽고 안전하게 연구할 수 있는 수단을 제공할 것이라 할 수 있겠다. 또한 국외 치사독소에 대한 연구를 진행하고 있는 선두 그룹만이 가지고 있던 대량생산체제를 갖춤으로써 앞으로 치사독소에 대한 보다 mutagenesis, inhibitor design 등 보다 심도 있는 연구를 가능하게 하였다. 현재 진행 중인 치사독소의 새로운 기질에 대한 탐색은 앞으로 치사독소가 대상세포 사멸을 어떻게 조절하는지에 대한 근원적인 배경을 제시할 것으로 사료되어지며 이는 치사독소의 작용억제를 위한 중요한 단서가 될 것이다. 치사요소의 효소 활성특성 규명에 관하여 이를 발표 ("Implication of pH in the catalytic properties of anthrax lethal factor", *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2004), 313, 217-222) 하였으며 고처리량 치사요소 활성 검정법을 이용하여 chemical library screening을 통하여 후보 억제제를 탐색 중에 있다. 또한 치사요소의 새로운 기질 및 세포내 작용기전을 규명하기위한 2-DE gel analysis를 통하여 얻은 후보 단백질 군을 대상으로 이들의 치사요소와 상관관계를 in vitro level에서 밝히는 작업을 계속 진행 중에 있다. 고처리량 활성 검정법을 이용한 inhibitor

screening은 현재 탄저에 대한 치료제가 개발되어 있지 않은 상태임을 감안하여 볼 때 매우 중요한 자료를 확보하였다고 할 수 있으며 이를 통하여 제약, 의약, 농약 등의 분야에 널리 활용 되어질 수 있을 것으로 사료 되어진다.

탄저균 치사독소에 반응하는 마우스 대식세포 (macrophage-like cell, RAW 264.7)의 유전자 발현양상 확인은 치사독소(PA+LF)를 농도별로 처리하여 반응하는 유전자를 확보하여 확인하였으며, 이들은 차후로 바이오 마커와 백신에 대한 후보 유전자가 되리라 사료된다. 탄저 치사독소에 대한 결과를 특허출원(출원번호 10-2003-0045320 오광근 등)하였으며, (“Gene Expression Profile of Murine Macrophages to Anthrax Lethal Toxin”, Lett. Appl. Microbiol.)에 실릴 예정으로 있다. 또한, 사람 대식세포에 대한 치사독소의 영향에 관한 유전자는 현재 논문 투고 중에 있다.

위에서 본 바와 같이, 본 연구는 상당히 많은 새로운 사실을 확보하여 국내외에 발표하고 일부는 특허를 신청하였다. 그럼에도 본 연구는 추가적으로 연구가 필요한 부분있다. 즉, DNA chip이나 프로테오믹스 기술로 얻어진 상당히 많은 유전자나 단백질에 대한 자세한 기전의 연구는 바이오마커, 백신, 혹은 치료제 개발에 매우 중요하기 때문에 계속적으로 추가 연구가 진행되거나, 혹은 지원되어야 할 것으로 보인다.

2절. 타 연구에의 응용

본 연구에서 사용한 것은 탄저 치사독소와 탄저균 아포를 사용하여 치사독소의 특성과 기질의 규명하였고, 또 이들을 숙주의 대식세포에 적용하여 초기 숙주세포가 반응하는데 관련된 유전자나 단백질의 발현양상을 규명하였다. 이와 같은 방법 혹은 사용한 기술 등을 수많은 가축 혹은 작물에 관련된 농업 분야에 사용할 수 있을 것으로 추정된다. DNA chip이나 프로테오믹스 기술을 도입하여 특정 농업용 질병을 탐색 및 탐지하거나, 혹은 이들 첨단 기술을 이용하여, 얼마든지 가축이나 작물 관련 병원균의 감염에 대한 기전을 이해하기 위하여 사용될 수 있기 때문이다. 많은 농업관련 분야에서 최첨단의 기능적 유전체학, 단백질체학, 및 생물정보학 등을 이용하여 병원균의 진단이나 탐색, 혹은 백신제 개발이나 치료제 개발에 사용될 수 있다면, 본 연구가 많은 도움이 될 것으로 추정된다.

3절. 기업화 추진방안을 기술

본 과제에서 밝혀진 초기 대식세포에서의 유전자 발현 양상이나 단백질 발현 양상에 관련된 유전자나 단백질은 초기 탄저 감염에 대한 사람의 바이오마커로서 사용할 수 있

을 것이다. 이들은 숙주 세포에서의 탄저균 치사독소에 반응하는 유전자나 단백질이므로 이들의 기전을 이해하여 실질적인 탄저 백신이나 치료제를 개발할 수 있는 자료를 제공할 수 있다. 또한, 치사독소의 새로운 기질에 대한 탐색은 앞으로 치사독소가 대상세포 사멸을 어떻게 조절하는지에 대한 근원적인 배경을 제시할 것으로 사료되어지며 이는 치사독소의 작용억제를 위한 치료제 개발에 도움이 될 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

탄저균에 대한 연구는 탄저균의 치사요인 중 하나인 치사요소(lethal factor)에 초점을 맞추어서 진행이 되었다. 2001년 9.11 사태 이후 생물방어 예산이 연간 7.7조원에 이르렀으며, 이에 따라 우편물 테러에 사용되었던 Ames 균주의 전체 지놈 염기서열 결과가 Read등(2001)에 의하여 수행되어 탄저균 병원성 연구의 기초를 제공하였다. 그리고 지금까지 알려져 있지 않던 치사요소(lethal factor)에 대한 구조가 밝혀져 치사요소에 대한 저해제 개발에 이용되고 있다 (Pannifier등, 2001).

미국의 Leppla 그룹의 Moayeri는 치사독소를 이용하여 생쥐에서 TNF- α 에 의존하지 않는 산소결핍증 (hypoxia)가 발생한다고 2003년도에 보고하였다. Salles등(2003)은 생쥐 대식세포에 낮은 농도의 치사독소를 6시간동안 미리 처리하여 적응시킨 다음 고농도의 치사독소를 처리하였을 시에 저항성을 갖는다고 보고하였다.

Papov등 (2004)은 독력을 약화시킨 균주인 Sterne과 완전한 독력을 갖는 Ames균주를 생쥐에 주사하여 사이토카인의 분비양상을 확인하였는데 기존에 치사독소에 의하여서는 Hanna(1993)등이 TNF- α 등이 분비한다고 주장하였다. Ames균주를 주사한 생쥐에서 IL-1 β 는 Balb/c에서 10배정도 증가하는 반면에 C57BL/6에서는 분비가 되지 않는다고 하였다. A/J에서는 IL-1 β 와 IL-6가 Sterne과 Ames에서 모두 분비가 되는 반면에 TNF- α 는 분비가 되지 않는다고 보고하였다.

Chitlaru등(2004)은 탄저균 비독성균주와 독성균주 (Vollum)의 막 단백질을 2-DE를 이용하여 분석을 하여 14개의 차이를 보이는 단백질을 확인하였다.

Karin 그룹은 2004년에 Toll-like receptor 4가 활성화 되고난 후에 대식세포의 사멸 (apoptosis)가 발생할 때 protein kinase PKR이 필요하다고 보고를 하였다.

Pickering등(2004)은 탄저균 Sterne균주 아포와 이 균주에서 치사요소만을 제거한 아포를 이용하여 사이토카인 분비를 확인 하였다. 이들은 생쥐 대식세포인 J774A1세포주를 이용하여 연구하였는데 기존 치사요소에 의하여 TNF- α 가 분비된다는 Hanna그룹과 견해를 같이 하였다. 즉, TNF- α 와 IL-12가 생쥐대식세포에 Sterne 아포를 감염시켰을 시에 분비가 된다는 것이다.

Min등 (2004)은 치사요소 저해제를 동정하기 위하여 질량분석기 (mass spectroscopy)를 사용하여 저해제를 탐색하였다. 이들은 1.1 μ mol에서 MEK를 저해하는 화학물질을 선별하였다.

Kacprzak등 (2004)은 PA가 세포표면의 수용체(receptor)와 결합하기 위해서는 furin-like protease (endopeptidase)에 의하여 20 kDa이 절단되어 나가고 나머지 63 kDa이 heptamer를 형성하는데 이들은 furin-like protease를 저해하는 polyarginine 이 포함된 펩타이드를 이용하여 탄저균 독소가 세포내로 들어가는 것을 저해하는 연구

를 수행 하였다. D-polyarginine에서 1.3 nM가장 강력하게 저해를 하는 것을 확인하였다.

Lacy그룹(2004)은 CMG2의 VWA A (von Willebrand factor A)의 구조를 밝혔으며 또한 CMG2와 PA간의 친화도를 연구하였다. 이들은 200 pM에서 CMG2와 PA간의 상화작용이 가장 잘 일어났으며 이 또한 탄저균 독소의 치료제 개발에 대한 연구를 수행하였다.

Santelli등 (2004)이 Anthrax toxin receptor(ATR)인 TEM8과 CMG2는 구조적으로 거의 유사한데 이들은 숙주세포내로 LF와 EF가 들어가기 위하여 먼저 PA가 세포표면의 TEM8과 CMG2에 결합을 하고 LF와 EF를 세포내로 들어가게 만든다. 이들은 PA와 CMG2의 결합력에 대한 연구를 수행하였으며 anthrax anti-toxin에 대한 표적 물질의 선별과 항암제 치료에 도움을 줄 수 있는 후보군을 연구하였다.

현재까지 탄저균의 아포 및 치사요소에 대한 연구는 많은 논란이 있는 것이 사실이다.

앞으로 탄저균의 아포와 대식세포에 대한 관련연구와 치사요소의 기질과 저해제 연구에 많은 투자와 연구가 필요하다.

제 7 장 참고문헌

- Black D.S., Bliski J.B., The RhoGAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence, *Mol. Microbiol.* 37 (2000) 515-527.
- Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-254. Blanchard R.K., Cousins R.J., Up-regulation of rat intestinal uroguanylin mRNA by dietary zinc restriction, *Am. J. Physiol.* 272, (1997) 972-978.
- Brown A.J.H., Hutchings C., Burke, J.F., Mayne L.V., Application of a rapid method(targeted display) for the identification of differentially expressed mRNAs following NGF-induced neuronal differentiation in PC12 cells, *Mol. Cell Neurosci.* 13, (1999) 119-130.
- DeRisi J.L., Iyer V.R., Brown P.O., Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale, *Science* 278, (1997) 680-686.
- Dixon T.C., Fadl A.A., Koehler T.M., Swanson J.A., Hanna P.C., Early *Bacillus anthracis*-macrophage interactions: intracellular survival and escape, *Cell Microbiol.* 6 (1999) 453-463.
- Dragon D.C., and Rennie R.P, Evaluation of spore extraction and purification methods for selective recovery of viable *Bacillus anthracis* spores, *Lett. Appl. Microbiol.* 33 (2001) 100-105.
- Funato K., Beron W., Yang C.Z., Mukhopadhyay A., Stahl P.D., Reconstitution of Phagosome-Lysosome Fusion in Streptolysin O-permeabilized Cells, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 16147- 16151.
- Garin J., Diez R., Kieffer S., Dermine J.F., Duclos S., Gagnon E., Sadoul R., Rondeau C., Desjardins M., The phagosome proteome: insight into phagosome function, *J. Cell Biol.* 152 (2001) 165-180.
- Green B.D., Battisti L., Koehler T.M., Thorne C.B., Ivins B.E., Demonstration of

- a capsule plasmid in *Bacillus anthracis*, *Infect. Immun.* 49 (1985) 291-297.
- Guidi-Rontani C., The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*, *Trends Microbiol.* 10 (2002) 405-409.
- Guidi-Rontani C., Weber-Levy M., Labruyere E., Mock M., Germination *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophage, *Mol. Microbiol.* 31 (1999) 9-17. Hanna P.C., Kochi C., Collier R.J., Biochemical and physiological changes induced by anthrax lethal toxin in J774 macrophage-like cells, *Mol. Biol. Cell* 3 (1992) 1269-1277.
- Kim, SeongJoo, KeySung Cho, YongKeel Choi, and Y.G. Chai. Production of *Bacillus anthracis* protective antigen by improvement of culture condition and purification methods. *Kor. J. Microbiol.* 37(1), (2001a) 21-27.
- Kim S.J., Cho K.S., Choi Y.K., Chai Y.G., Molecular Diversity of *pagA* Gene from *Bacillus anthracis*, *Kor. J. Microbiol.* 37 (2001) 49-55.
- Kim, SeongJoo, GyeongHyun Park, HyoungTai Kim, KeySung Cho, JeeCheon Kim, YongKeel Choi, SeungHwan Park, NamTaek Lee, and Y.G. Chai. Random amplified polymorphic DNA-PCR analysis for identification of *Bacillus anthracis*, *Kor. J. Microbiol.* 37(1), (2001c) 56-60.
- Lee N., MacDonald H., Reinhard C., Halenbeck R., Roulston A., Shi T., Williams L.T., Activation of hPAK65 by caspase cleavage induces some of the morphological and biochemical changes of apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 13642-13647.
- Lee N.H., Weinstock K.G., Kirkness E.F., Earle-Hughes J.A., Fuldner, R.A., Marmaros S., Glodek A., Gocayne J.D., Adams M.D., Kerlavage A.R., Fraser C.M., Venter J.C., Comparative expressed-sequence-tag analysis of differential gene expression profiles in PC12 cells before and after nerve growth factor treatment, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, (1995) 8303-8307.
- Liang P., Pardee A.B., Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of polymerase chain reaction, *Science* 257, (1992) 967-971.
- Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Follettie M.T., Gallo M.V., Chee M.S.,

- Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Hortton H., Brown E.L., Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, *Nature Biotechnol.* 14, (1996) 1675-1680.
- Molestina R.E., Klein J.B., Miller R.D., Pierce W.H., Ramirez J.A., Summersgill J.T., Proteomic analysis of differentially expressed *Chlamydia pneumoniae* genes during persistent infection of Hep-2 cells, *Infect. Immun.* 6 (2002) 2976-2981.
- Oakley B.A., Kirsch D.R., Morris N.R., A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 105 (1980) 361-363.
- Palmer-Toy D.E., Sarracino D.A., Sgroi D.C., LeVangie R., Leopold P.E., Direct acquisition of matrix-assisted laser Desorption/ionization time-of-flight from laser capture microdissected tissues. *Clin Chem* 46 (2000) 1513-1516.
- Peitu G., Alibert O., Guichard B., Lamy B., Bois F., Leroy E., Novel gene transcripts preferentially expressed human muscles revealed by quantitative hybridization of a high density cDNA array, *Genome. Res.* 6, (1996) 492-503.
- Popov S.G., Villasmil R., Bernardi J., Grene E., Cardwell J., Popova T., Effect of Bacillus anthracis lethal toxin on human peripheral blood mononuclear cells, *FEMS Lett*, 527 (2002a) 211-215.
- Regula J.T., Ueberle B., Boguth G., G□□'rg A., Schn□□'lzer M., Herrmann R., Frank R., Towards a two-dimensional proteome map of *Mycoplasma pneumoniae*, *Electrophoresis* 21 (2000) 3765-3780.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, *Science* 270, (1995) 467-470.
- Schena M., Shalon D., Davis R.W., Brown P.O., Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, (1996) 10614-10619.
- Sgroi D.C., Teng S., Robinson G., LeVangie R., Elkahoulou, In vivo gene

- expression profile analysis of human breast cancer progression. *Cancer Res.* 59, (1999) 5656-5661.
- Shevchenko A., Wilm M., Vorm O., Mann M., Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 68 (1996)850-858.
- Tang G., Leppla S.H., Proteasome activity is required for anthrax lethal toxin to kill macrophages, *Infect. Immun.* 67 (1999) 3055-3060.
- Turnbull P.C., Bohm R., Cosivi O., Doganay M., Hugh-Jones M.E, Joshi D.D, Lalitha M.K., and V. de Vos, Guidelines for the surveillance and control of anthrax in Human and Animals, WHO/EMC/ZDI 3rd Ed 1998.
- Vasmatazis G., Essand M., Brinkmann U., Lee B., Pastan L., Discovery of three genes specifically expressed in human prostate by expressed sequence tag database analysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, (1998) 300-304.
- Velculesu V.E., Zhang L., Vogelstein B., and Kinzler K.W., Serial analysis of gene expression, *Science* 270, (1995) 484-487.
- Weissman A.M., Regulating protein degradation by ubiquitination, *Immunol. Today* 18 (1997) 189-198.

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.