

사람 대식세포에 스테리아포에 처리에 의한 P21-activated kinase 2 단백질의 발현양상

Expression Patterns of P21-Activated Kinase 2 by Sterne Spores on Human Macrophages

서귀문* Gwi-Moon Seo	정경화* Kwang-Hwa Jung	곽현정* Hyun Jung KwaK
김성주* Seong-Joo Kim	김지천* Ji-Chon Kim	채영규* Young-Gyu Chai

ABSTRACT

In order to elucidate the mechanism of infection on human macrophages, we performed the 2-dimensional electrophoresis and the western blot analysis using the infected human macrophages with the spores of live and inactivated Sterne. We confirmed P21-activated kinase 2 protein which related to cell death(apoptosis) human macrophages at the early stage events. The inhibition of the P21-activated protein kinase 2 protein will be reduced apoptosis on infected human macrophages with Sterne spores.

주요기술용어(주제어) : P21-activated protein kinase 2(p21 자동인산화효소), Spore(아포), 2-dimensional electrophoresis(이차원전기영동), Apoptosis(세포사멸), Proteomics(단백질체학)

1. 서론

탄저(anthrax)는 탄저균(*Bacillus anthracis*)의 감염에 의해 가축뿐만 아니라 사람에게도 발병되는 인수공통 전염병이다. 폐탄저(inhalation anthrax)의 경우 탄저균 아포가 대식세포에 감염되는 초기 단계에서는 숙주세포내로 들어가기 위하여 대식세포와 탄저균 아포의 상호작용이 일어난다^[2]. 그런 후, 대식세포가 아포를 식균작용에 의하여 세포내부로 취하게 되

고, 세포 내로 들어간 탄저균 아포는 림프구로 이동된 대식세포 내에서 발아가 된다. 발아된 아포는 탄저균 영양세포로서 방어항원(protective antigen), 치사요소(lethal factor), 부종요소(edema factor)의 독소가 생산된다. 이렇게 생산된 탄저균 독소들은 대식세포의 식균작용(phagocytosis)등을 회피하고, 대식세포 내에서 발아하고 증식하여 세포외로 방출되면서 대식세포를 사멸케 하고, 결국 초기감염 단계 후반부에 탄저균 영양세포는 혈액 1ml당 10⁸개로 증식된다. 그런 후 온몸으로 퍼져서, 결국 패혈증에 의하여 숙주를 사망에 이르게 한다^[2,3].

P21-activated protein kinases(PAKs)는 PAK1, PAK2, PAK3를 포함하는 group I 과 PAK 4, 5, 6

* 2004년 9월 20일 접수~2004년 12월 8일 심사완료

* 한양대학교(Hanyang University)

주저자 이메일 : gmseo@genopia.net

를 포함하는 group II로 구성되어 있다. Group I은 small G protein Cdc42와 Rac1의 결합에 의하여 자동인산화 되며, group II는 아직 명확하게 그 기전이 알려져 있지 않다.

PAK2는 다양한 조직에서 분비가 되지만 그 외의 PAK isoforms은 특이적으로 분비가 된다. PAK2는 일반적으로 스트레스에 의하여 분비가 되며 caspase 3에 의한 세포의 사멸에 관한 신호전달에 관여한다. PAK2는 세포독성의 본질을 가지고 있기 때문에 매우 정밀하게 조절이 된다. 분해는 ubiquitination후 프로테아좀(proteasome)에 의하여 분해가 된다.

Group I PAKs는 27 kDa의 regulatory domain과 34 kDa의 catalytic domain을 가지며, catalytic domain은 caspase 3에 의하여 절단되어 핵으로 들어가 세포사멸에 관여하는 것으로 알려져 있다^[4]. 따라서 본 연구에서는 탄저균 살아있는 스테인과 불활성화시킨 스테인 아포를 사람 대식세포에 감염시켰을 때 PAK2의 발현양상을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

가. 단백질 정량

탄저균 스테인아포를 대식세포에 감염을 시킨 후 단백질을 시간 별로 추출하였다. 각각의 단백질들을 Lowry 등(1951)의 방법으로 정량 하였다. Bicinchoninic acid(BCA) 표준 시약을 미리 희석하여 준비하였다. 각각의 시료를 각각 1:40, 1:100, 1:200으로 희석했다. 각각의 표준시약과 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 30초 동안 방치하여 시약을 섞어주었다. 플레이트 뚜껑을 덮고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 정도 방치 하였다. 후에 실온으로 식히고 wavelength 562nm에서 ELISA reader로 측정하였다. 표준 곡선을 그려 단백질 양을 계산하였다.

나. 세포질 및 핵단백질 추출

Cell culture plate로부터 배양액을 제거하고 미리

준비해 둔 10ml ice-cold PBS로 2회 세척하였다. 그런 후, plate를 얼음 위에 올려 놓은 채 0.5ml ice-cold PBS를 넣어주고 cell scraper로 긁어주어 cell을 모은 다음 새 튜브로 옮겨주었다. 3,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 원심 분리하였다. 상층 액을 제거한 후 Buffer A(10mM HEPES, pH 7.9, 10mM KCl, 0.1mM EDTA, 0.5mM PMSF)를 400 μ l 넣고 약하게 혼합하였다. 그런 후에 15분간 얼음 위에서 방치하였다. 10% NP-40을 25 μ l 넣고 10초간 세게 혼합한 후 13,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 원심 분리하였다. 상층 액을 모아서 cytosolic extract로서 사용한다. 다시 한번 Buffer A를 넣은 후 얼음 위에서 15분간 방치하고, 10% NP-40을 25 μ l 넣고 10초간 세게 혼합한 후 13,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 2분간 원심 분리하였다. Buffer B(20mM HEPES, pH 7.9, 0.4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF)를 100 μ l 넣고 얼음 위에 방치하면서 10분간 강하게 혼합하였다. 13,000rpm으로 4 $^{\circ}$ C에서 30분간 원심 분리한 후에 상층 액을 모아 새 튜브로 옮겨서 실험에 사용하였다.

다. 웨스턴 블랏

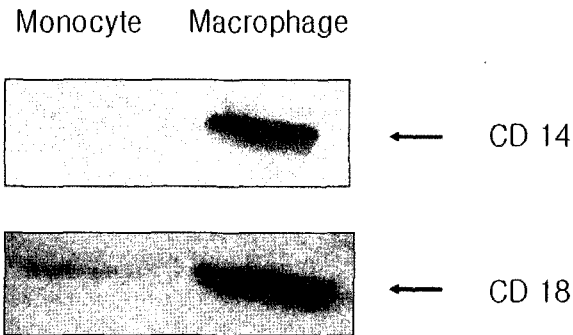
탄저균 아포의 PAK2발현을 확인하기 위하여 Bollag(1996)의 방법으로 western blotting assay를 수행하였다. 즉, SDS-PAGE 젤은 12%로 제조하고 젤을 탱크에 완충액과 함께 넣은 후 시료를 부하하여 100V에서 전기영동 하였다. 시료가 젤 밑바닥까지 내려가면 전기영동을 멈추고 젤을 분리한 후 PVDF 막에 transfer 시켰다. Transfer는 100V에서 1시간 수행하였다. 실험을 수행할 때 열이 발생함으로 저온실에서 수행하였다. Transfer가 끝난 후 PVDF 막을 조심스럽게 핀셋으로 분리하고 PVDF 막을 차단 완충액에 담근 후 상온에서 1시간 동안 방치했다. 후에 교반기 위에서 TBS 완충액으로 10분 동안 세척하는 과정을 3회 반복했다. TBS 완충액에 PVDF 막을 담고 polyclonal rabbit anti-PAK2(C-19), polyclonal goat anti-PAK2(Santacruz)를 1:1,000배 희석하여 첨가한 후 교반기에서 상온으로 1시간 30분 방치하였다. 후에 교반기 위에서 TBS 완충액으로 10분 동안 세척하는 과정을 3회 반복했다. Peroxidase labelled

anti-rabbit antibody를 1:10,000배로 희석하여 TBS 완충액과 함께 PVDF 막에 첨가했다. ECL kit 시약을 50:1로 섞어 준 후 PVDF 막에 부어주었고 1분 동안 방치한 후 암실에서 film으로 시간대별로 감광하였다.

3. 결과

가. 사람 대식세포의 분화

사람 혈액으로부터 단핵구(monocyte)를 분리하여 대식세포로 분화시킨 후 분화도를 확인하기 위하여 대식세포 마커인 CD14와 CD18 항체를 사용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과에 의하여 분화가 되었음을 확인하였다(그림 1).



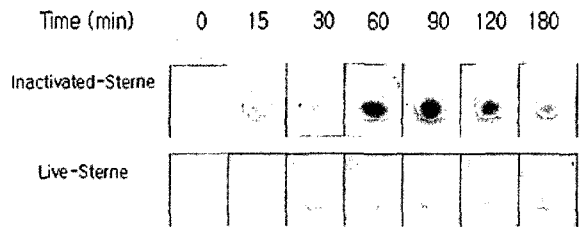
[그림 1] Differentiation of macrophage from human blood monocyte. Left; monocyte, Right; macrophage

나. 사람 대식세포에서의 PAK2 발현

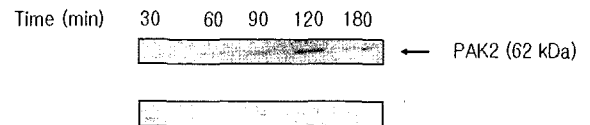
탄저균 스테리아포를 사람 대식세포에 감염을 시킨 후에 2-DE에 대한 발현양상은 그림 2에 보여 주었다. 불활성화 시킨 스테리아포를 감염시킨 후 60~90분 까지 발현이 증가됨을 확인할 수 있었다.

대식세포에서 웨스턴 블랏에 의한 PAK2의 발현양상을 확인 하였는데 불활성화 시킨 스테리아포는 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가가 되는 반면에 살아있는 스테리아포를 감염시켰을 경우에는 전반적으로 PAK2의 발현에 변화가 없는 것으로 확인되었다(그림 3). 그러나 세포 사멸에 관련된 caspase 3에 의하

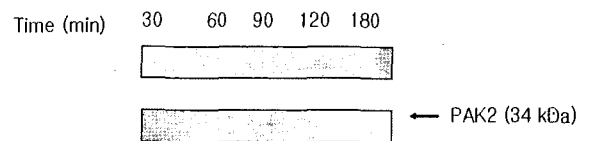
여 절단되는 34kDa의 활성도메인(catalytic domain)은 불활성화 시킨 스테리아포에서는 90분에서 관찰이 되었지만 많은 양이 관찰되지 않았다. 반면에 살아있는 스테리아포를 처리한 경우에는 60분 정도에서 34kDa의 단편이 관찰되었으며 90분에서는 많은 양의 단편을 관찰할 수 있었다(그림 4). 이러한 것은 살아있는 스테리아포가 감염이 되어 대식세포를 사멸시킬 때 PAK2의 34kDa 단편이 핵 안에서 세포사멸에 관여할 것으로 사료된다.



[그림 2] Two-dimensional gel images of human macrophages after infection by inactivated-Sterne spores and live-Sterne spores. This spot was identified the P21-activated kinase 2



[그림 3] Expression of full-length PAK2 in human macrophage cells. Arrow indicates full-length PAK2 expression patterns. Upper; inactivated-Sterne spore, Bottom; live-Sterne spore



[그림 4] Expression of PAK2-p34 in human macrophage cells. Arrow indicates molecular weight. Upper; inactivated-Sterne spore, Bottom; live-Sterne spore.

4. 결론

탄저균의 불활성화 시킨 스테인과 살아있는 스테인 아포를 사람 대식세포에 감염을 시켜 PAK2의 발현 패턴을 연구하였다. 탄저균의 불활성화 시킨 스테인아포를 감염 시에 대식세포의 생존과 관련된 62kDa의 전체길이의 단백질이 발현이 됨을 확인하였다. 반면에 살아있는 스테인균주의 아포를 사람 대식세포에 감염을 시켜서 세포사멸에 관련된 34kDa의 활성도메인(catalytic domain)의 발현을 핵단백질에서 확인하였다. 이는 탄저균 스테인아포감염으로 인하여 세포사멸이 유도되는 것으로 보인다. 이러한 연구는 탄저균 아포가 대식세포의 사멸을 완화할 수 있는 표적물질로서 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- [1] Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, S. J., Protein methods, 2ed. Wiley-Liss, Inc., 605 Thire Avenue, NY. pp.195~228 (1996).
- [2] Guidi-Rontani, C. The alveolar macrophage: the Trojan horse of *Bacillus anthracis*. Trends Microbiol. 10, 2002, pp.405~409.
- [3] Guidi-Rontani, C., M. Weber-Levy, E. Labruyere, and M. Mock. Germination of *Bacillus anthracis* spores within alveolar macrophage. Mol. Microbiol. 31, 1999, pp.9~17.
- [4] Jacobi, R., McCarthy, C. C., Koepfel, M. A., Stringer, D. K. Caspase-activated PAK-2 is regulated by subcellular targeting and proteasomal degradation. J. Biol. Chem. 278, 2003, pp.38675~38685.
- [5] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 1951, pp.265~275.
- [1] Bollag, D. M., Rozycki, M. D., Edelstein, S. J.,