

Fenbendazole에 저항성과 감수성을 지닌 염전위충의 분비배설물에서의 DNase 활성 비교

곽 동 미*

워싱턴주립대학교 수의과대학
(게재승인: 2004년 6월 14일)

Comparison of DNase activities from excretory/secretory products of *Haemonchus contortus* fenbendazole-resistant and -susceptible isolates

Dongmi Kwak*

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine,
Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA
(Accepted: June 14, 2004)

Abstract : Change in β -tubulin nucleic acid and protein sequences was the only known difference between *Haemonchus contortus* fenbendazole (FBZ)-resistant and -susceptible isolates. This change was sufficient to determine the pathologic effect induced by FBZ treatment. This research was initiated to investigate further differences from these two isolates. Since β -tubulin is involved in formation of microtubule, which has functions in secretory vesicle transport, DNase activities from excretory/secretory products (ESP) of the two isolates were compared, based on pH, sensitivity to DNase inhibitors, molecular masses and production of 3'-OH. The most significant difference detected was that a 38.5 kDa DNase activity was identified from ESP of *H. contortus* FBZ-susceptible isolates but not from those of *H. contortus* FBZ-resistant isolates. However, it was shown that the 38.5 kDa DNase is expressed with similar level of activity in intestine and whole worm of *H. contortus* FBZ-resistant and -susceptible isolates. This result demonstrated that the secretory transport pathway of the 38.5 kDa DNase was inhibited by unknown mechanisms, which may be related with β -tubulin sequence change in FBZ-resistant isolates. Other DNases of 34, 36 and 37 kDa were detected from ESP of both *H. contortus* FBZ-resistant and -susceptible isolates. Overall DNase activities found from ESP of these two isolates were not inhibited by 10 mM EDTA at pH 5.0, but largely inhibited by pH 7.0. In addition, DNase activities in two isolates produced DNA fragments with mixtures of 3'-hydroxyls (OH) and 3'-phosphates (P) at each pH although the 3'-end labeling ratios at pH 5.0 and 7.0 were shown different. Identification of inhibition of the 38.5 kDa DNase secretion in FBZ-resistant isolates suggests existence of further differences, in addition to β -tubulin sequence change, in two isolates. This shows complex effect of FBZ on *H. contortus* biological mechanisms.

Key words : DNase activity, excretory/secretory products, *Haemonchus contortus*, fenbendazole-resistant and -susceptible isolates, parasite

서 론

Benzimidazole 계열의 구충제는 다양한 종류의 선충,

흡충, 조충, 원충 그리고 곰팡이 등에 기인되는 감염에 대한 치료제로 광범위하게 적용되고 있으며 β -tubulin이 이들 약제의 주요 목표로 알려져 있다 [6]. 이 약제들이

*Corresponding author: Dongmi Kwak

Department of Veterinary Microbiology and Pathology, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, WA 99164-7040, USA

[Tel: 1-509-335-6332, Fax: 1-509-335-8529, E-mail: dmkwak@vetmed.wsu.edu]

β -tubulin과 결합함으로써 microtubule의 형성이 억제되었으며 이 약제들에 저항성을 지닌 기생충들은 β -tubulin의 유전자와 단백질 구조에 변화를 가져온다 [1]. 반추수의 제 4위에 기생하며 흡혈하는 선충류(nematode)인 염전위충(*Haemonchus contortus*)에선 β -tubulin의 아미노산의 구조에 있어서 변화가 확인되었지만 특히, 200번째에 위치한 phenylalanine의 tyrosine으로의 전환이 약제 저항성에 결정적으로 작용한다고 알려져 있다 [3]. 더욱이, 자유생활 선충인 *Caenorhabditis elegans*에 염전위충 유래의 β -tubulin 유전자를 주입함으로써 약제 저항성이 결정됨을 보여 주었다 [4].

Benzimidazole 계열의 약제의 작용기전은 아직 잘 알려져 있지 않지만 microtubule이 세포 내에서 분비소포 운반(secretory vesicle transport)과 세포분열 등의 다양한 기능을 하기 때문에 이들의 기능이 방해됨으로 인한 이차적인 현상으로 기생충 내에서의 병리현상이 나타난 것으로 추측하고 있다. 염전위충 및 다른 선충류에서 이 약제에 의한 여러 병리현상이 발견되었다 [1, 2]. 특히, 염전위충에서는 microtubule 형성이 억제되었고 이어서 분비소포운반이 억제되어 이들 소포들이 분비되지 못하고 세포질 내에 축적이 되었으며 그 후 분비소포 내용물(단백질 분해 효소 등)이 세포질 내로 확산되었고 이어 DNA 분해(internucleosomal sized fragmentation)와 소화관의 용해(dissociation of intestinal tissue)가 일어났다 [2]. 그러나 이런 병리현상은 이들 약제에 감수성이 있는 기생충에서만 나타났으며 저항성이 있는 기생충에서는 microtubule의 형성이 억제되지 않았으며 이차적인 병리현상도 나타나지 않았다.

이 연구는 두 염전위충 분리주에서의 차이를 조사하기 위하여 수행하였으며 microtubule이 분비배설물(excretory/secretory products)의 운반에 관여하기 때문에 우선적으로 분비배설되는 DNase의 차이를 분석하였던 바 이들 분리주에서 분비배설되는 DNase 활성의 차이를 확인하였다.

재료 및 방법

기생충 샘플

Fenbendazole(FBZ)에 저항성과 감수성을 지닌 염전위충 감염자충을 양에 투여하고 25일 후에 도살하여 각 분리주의 성충을 제 4위에서 얻었다 [11]. 분비배설물은 각 분리주의 성충을 100 IU의 penicillin과 0.1 mg/ml의 streptomycin이 첨가된 배양액(Dulbecco's modified Eagle's medium(Life Technologies, Rockville, MD, USA), pH 6.6)에서 24시간 배양하여 얻었다 [5]. 회수한 분비배설물은 Centricon(YM-10, Millipore, Bedford, MA,

USA)으로 농축되었으며 단백질 정량은 bicinchoninic acid assay를 사용하여 결정되었다. 또한, 두 분리주로부터 소화관(intestine)과 전체 균질액(whole worm lysates)도 만들어 졌다 [5]. 음성 대조군으로, FBZ에 저항성을 지닌 기생충을 마지막으로 세척한 용액(50 mM Tris-HCl, pH 7.4)이 위에서 언급한 것과 같이 배양되고 농축되었으며 양의 혈청도 사용되었다.

Plasmid DNA 분해 실험

DNase 활성은 먼저 plasmid DNA를 사용하여 결정하였다 [5]. 각 샘플(400 ng)은 400 ng의 plasmid DNA와 여러 배양 조건(pH 및 이온)에서 20 μ l 반응으로 배양되었다. pH의 영향을 결정하기 위하여, pH 4.0-10.0(20 mM Tris-HCl)를 사용하였으며 2 mM CaCl_2 와 2 mM MgCl_2 의 존재 하에서 배양하였다. 배양은 37°C에서 30분간 진행하였다. 배양 후 70°C에서 10분간 처리함으로써 DNase를 불활화하였다. 모든 샘플들은 ethidium bromide가 함유된 agarose gel(0.8%)에서 전기영동(100 V/20분)된 후 자외선광으로 plasmid DNA 분해정도로 DNase 활성을 확인하였다. 음성 대조군도 동일하게 처리되었다.

DNase 활성에 대한 억제제의 영향은 pH 5.0과 7.0에서 결정되었으며 금속이온의 필요성을 결정하기 위하여 10 mM EDTA를 사용하였으며, 비특이적인 DNase 억제제인 aurintricarboxylic acid(ATA, 100 μ M)도 사용되었다.

모든 결과는 최소한 세 번 이상의 반복된 실험에서 얻어졌다.

Zymogram gel에 의한 DNase의 M_r 결정

기생충의 분비배설물에 있는 DNase의 M_r 을 그리고 각 DNase의 생화학적 특성(pH 및 이온)을 조사하기 위하여 zymogram gel 분석을 실행하였다 [5]. Zymogram gel은 기존의 SDS-PAGE에 DNase의 기질인 salmon sperm DNA(200 μ g/ml)가 첨가되어 있다. 먼저, 기생충의 분비배설물(5 μ g)을 loading buffer(50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 0.4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 10% glycerol, 10 μ g/ml bovine serum albumin, 0.01% bromophenol blue)와 37°C에서 10분간 처리한 후 전기영동하였다. 그 후, zymogram gel을 renaturation buffer(40 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1% casein)로 2시간 동안 세척하면서 SDS를 제거하였고 이 과정에서 변성된 DNase의 활성이 회복되었다. 다음으로 gel을 pH 5.0 혹은 7.0(40 mM Tris-HCl, 0.02% sodium azide)에서 배양하였으며, 이때 각 pH에서 2 mM CaCl_2 와 2 mM MgCl_2 존재 하에서 혹은 10 mM EDTA 존재 하에서 배양하였다. Ethidium bromide 존재 하에서 16시간을 배양한 후 자외선광으로 DNase의 M_r 을 확인하였다. DNase 활성이 존재하는 곳에는

DNA가 분해되었으므로 자외선광에서 검게 나타나며 DNA가 분해되지 않은 곳에는 ethidium bromide에 염색된다. DNase의 M_r 은 표준 분자량(Rainbow molecular mass standards, 14.3-220 kDa, Amersham, Piscataway, NJ, USA)에 의해 결정되었다.

염전위충 두 분리주에서 분비배설되는 DNase가 이들 분리주의 소화관(100 μ g)과 전체 균질액(50 μ g)에서 발현이 되는지를 조사하기 위하여 이들 샘플이 위에서 언급한 것과 같이 처리되었으며 배양은 88시간동안 진행하였다.

Plasmid DNA 3'-말단 확인

분해된 plasmid DNA의 3'-말단(3'-OH 혹은 3'-P)의 확인은 다음과 같이 실행하였다 [5]. 먼저, 1 μ g의 plasmid DNA가 0.4 μ g의 기생충의 분비배설물에 의해 pH 5.0 혹은 7.0에서 분해되었다. 이어서, 분해된 plasmid DNA(각각 400 ng plasmid)는 calf intestinal alkaline phosphatase (4 U, Roche, Indianapolis, IN, USA)를 처리한 균과 처리하지 않은 균으로 나누어서 37°C에서 1시간동안 배양되었다. 다음으로, 각 샘플에서 20 μ g plasmid DNA 단편들은 3'-OH에 nucleotides를 첨가하는 효소인 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT, 6 U, Roche)와 37°C에서 1시간동안 배양되었으며 여기서 사용된 nucleotides는 biotinylated dideoxyadenosine triphosphate(Bt-ddATP, 250 pmol, PerkinElmer, Boston, MA, USA)였다. 각각의 반응들은 agarose gel에서 전기영동 되었으며 DNA 단편들은 nylon membrane(Roche)으로 옮겨졌다. 3'-말단에 첨가된 Bt-ddATP들은 streptavidin-conjugated horseradish peroxidase(1:1000 희석, Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA)와 반응하였고 확인은 enhanced chemiluminescence detection system(Amersham)을 사용하여 신호를 X-ray film에 녹음하였다. 그리고, 각 반응의 신호는 chemilmager 4000(Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA)에서 정량되었다. Phosphatase는 3'-P를 3'-OH로 전환하기 때문에 생성된 모든 3'-말단을 확인할 수 있으며 phosphatase가 없는 샘플에서는 오직 3'-OH만 TdT에 의해 확인이 된다. 그러므로, phosphatase 처리된 것의 신호를 처리되지 않은 것의 신호로 나누어 비율을 얻을 수 있으므로 그 비율로 각 샘플에서 생성된 plasmid DNA 3'-말단이 3'-OH인지 혹은 3'-P인지, 아니면 혼합(3'-OH와 3'-P)되어 있는지를 결정하였다 [5]. 비율은 두 번의 반복실험 평균으로 표시되었다.

결 과

DNase 활성에 대한 pH의 효과

FBZ에 저항성을 지닌 염전위충 분비배설물의 DNase

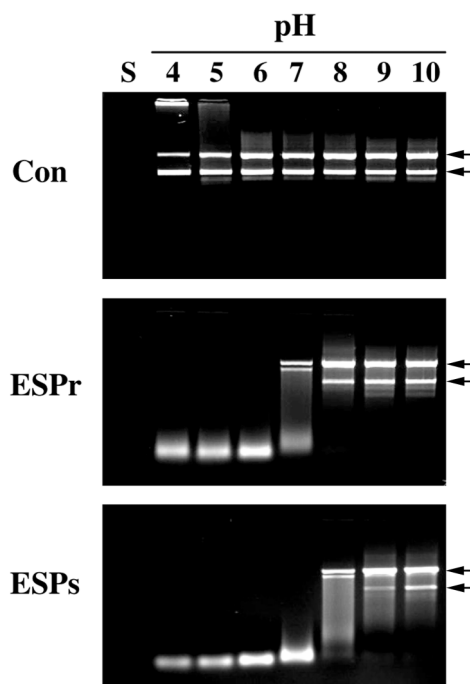


Fig. 1. pH effects on DNase activities from *Haemonchus contortus* excretory/secretory products(ESP). Samples(400 ng protein) from ESP of *H. contortus* fenbendazole-resistant (ESPr) and -susceptible(ESPs) isolates were incubated with plasmid DNA(400 ng) at 37°C for 30 minutes in buffers at pH 4.0 to 10.0 containing 2 mM $CaCl_2$ and 2 mM $MgCl_2$. S, samples of *H. contortus* ESP without plasmid. Cultured worm-washed buffer without sample(Con, same volume) was incubated as described above as a negative control. The digested products were analyzed in agarose gel(0.8%) and visualized by ethidium bromide staining. Arrows on the right refer to estimated sizes of two forms of DNA in undigested plasmid at 4(upper) and 2.5(lower) kilo base pairs, respectively.

활성은 pH 4.0에서 7.0까지의 산성과 중성 pH에서 확인이 되었으나 산성 pH가 최적의 환경임을 나타내었다 (Fig. 1). 그러나, 염기성 pH에서는 DNase 활성이 아주 미약하거나 확인되지 않았다. 기생충의 분비배설물 자체에서 DNA가 오염되어 있는지를 알기 위하여 plasmid DNA없이 전기영동을 하였으나(Fig. 1, lane S), DNA는 확인되지 않았다. 이것은 ethidium bromide에 염색된 것이 plasmid DNA에서 유래했음을 나타낸다. 한편, FBZ에 감수성을 지닌 염전위충의 분비배설물의 DNase 활성은 pH 4.0에서 10.0까지 넓은 범위에서 나타났으나 산성 pH에서 활성이 높게 나타났다. FBZ에 저항성을 지닌 분리주와 감수성을 지닌 분리주에서의 DNase 활성은 산성 pH에는 비슷하게 나타났지만 중성과 염기성 pH

에서는 감수성을 지닌 기생충의 분비배설물에서 더 높게 나타났다.

음성 대조군으로 FBZ에 저항성을 지닌 기생충을 세척한 용액의 배양액을 사용하였다. Fig. 1에서 나타난 것과 같이 plasmid DNA 분해는 일어나지 않고 분해되지 않은 2.5와 4 kbp의 두 plasmid DNA만 보여진다.

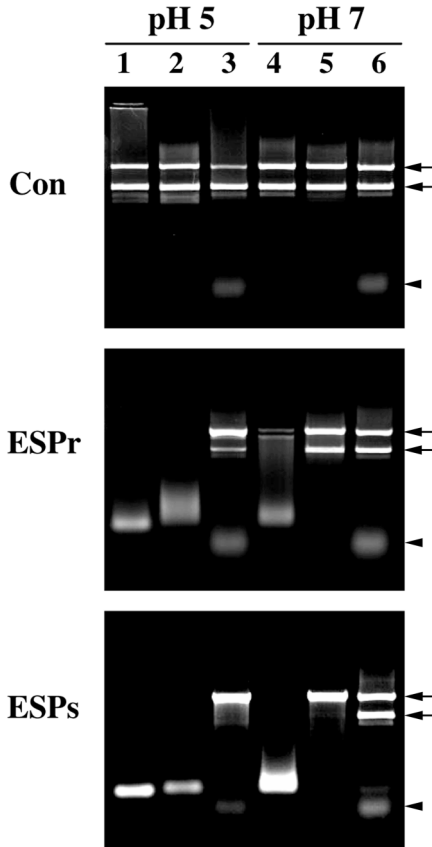


Fig. 2. Effects of EDTA and aurintricarboxylic acid(ATA) on DNase activities from *Haemonchus contortus* excretory/secretory products(ESP). Samples(400 ng protein) from ESP of *H. contortus* fenbendazole-resistant(ESPr) and -susceptible(ESPs) isolates were incubated with plasmid DNA(400 ng) at 37°C for 30 minutes in buffers at pH 5.0(lanes 1-3) or 7.0(lanes 4-6) containing 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂(lanes 1 & 4), 10 mM EDTA(lanes 2 & 5) or 100 μM ATA with 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂(lanes 3 & 6). Cultured worm-washed buffer without sample(Con, same volume) was incubated as described above as a negative control. The digested products were analyzed in agarose gel(0.8%) and visualized by ethidium bromide staining. Arrows on the right refer to estimated sizes of two forms of DNA in undigested plasmid at 4(upper) and 2.5(lower) kilo base pairs, respectively. The arrow head points to background staining that was caused by ATA.

DNase 활성에 대한 억제제의 효과

위에서 확인된 DNase 활성에 대한 EDTA와 ATA의 효과는 Fig. 2에서 보여진다. FBZ에 저항성을 지닌 기생충 분비배설물의 DNase 활성은 pH 5.0에서 10 mM EDTA에 거의 영향을 받지 않았지만 pH 7.0에서 EDTA에 거의 대부분의 활성이 억제되었다. 한편, 알려진 거의 모든 DNase에 억제 효과를 나타내는 ATA에 대해서는 pH 5.0과 7.0에서 거의 모든 활성이 억제되었다.

FBZ에 감수성을 지닌 기생충 분비배설물의 DNase 활성도 저항성을 지닌 샘플과 같이 pH 5.0에선 EDTA에 억제되지 않았지만 pH 7.0에서는 거의 대부분의 활성이 억제되었다. 또한, ATA에 대해서는 pH 5.0과 7.0에서 거의 모든 활성이 억제되었다. Fig. 2에서 ATA(lane 3, pH 5.0)와 EDTA(lane 5, pH 7.0)에 처리되었을 때 약하게 잔존해 있는 DNase 활성에 의해 2.5 kbp plasmid DNA(supercoil)가 nick되어 4 kbp plasmid DNA(closed circular 혹은 nicked)만이 보여진다.

음성 대조군으로 사용된 FBZ에 저항성을 지닌 기생충의 세척용액의 배양액에서 plasmid DNA의 분해는 거의 보이지 않았다.

Zymogram gel에서의 DNase의 M_r 확인

기생충 샘플에서 DNases의 M_r을 결정하기 위하여 zymogram gel 분석을 하였으며 각 DNase에 대한 생화학적 특성도 분석하였다(Fig. 3). FBZ에 저항성을 지닌 기생충의 분비배설물의 DNase 활성은 3 M_r(34, 36 및 37 kDa)에서 나타났으며 이들 중 37 kDa DNase는 pH 5.0에서만 특이적으로 나타났다. 34 kDa DNase는 pH 5.0와 7.0에서 나타났으나 36 kDa DNase는 pH 7.0에서는 활성이 나타났지만 pH 5.0에서는 활성이 있는지가 명확하지 않았다. 그러나 더 짧은 시간의 배양으로 36 kDa DNase를 pH 5.0에서 확인할 수 있었다. 16시간의 배양은 36과 37 kDa DNases가 하나로 보이게 한다. 반면, FBZ에 감수성을 지닌 기생충의 분비배설물의 DNase 활성은 4 M_r(34, 36, 37 및 38.5 kDa)에서 확인되었다. 37 kDa DNase는 pH 5.0에서만 특이적으로 나타났으나 34, 36 및 38.5 kDa DNases는 pH 5.0과 7.0 모두에서 나타났다. Fig. 3에선 36 kDa DNase(pH 5.0)가 보이지 않으나 짧은 시간의 배양으로 확인할 수 있었다. 두 분리주의 분비배설물의 DNase 활성을 비교하였을 때 38.5 kDa DNase 활성이 FBZ에 감수성을 지닌 기생충의 분비배설물에서만 확인되었고 저항성을 지닌 분비배설물에서는 확인되지 않았다. 이는 세 번의 다른 반복 실험에서도 같은 결과가 얻어졌다.

각 DNase 활성에 금속이온이 필요한지를 조사하기 위하여 10 mM EDTA 존재 하에서 gel을 배양하였다. FBZ

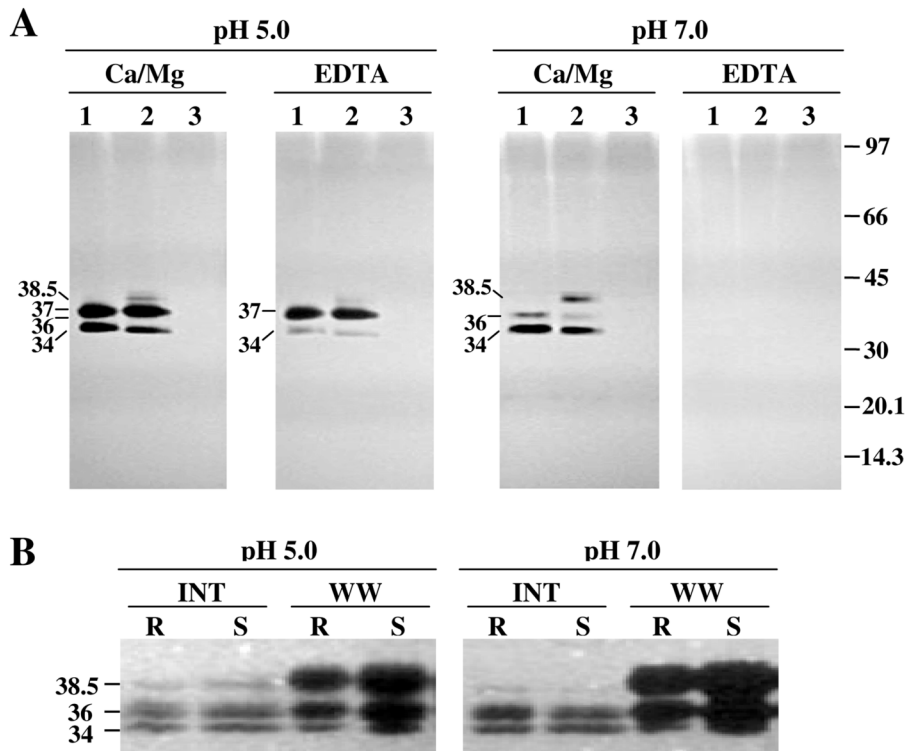


Fig. 3. Zymographic analysis of DNase activity in *Haemonchus contortus*. (A) Samples (5 μ g protein) from excretory/secretory products of *H. contortus* fenbendazole-resistant (lane 1) and -susceptible (lane 2) isolates or sheep serum (lane 3) were separated by SDS/PAGE (10% gel containing 200 μ g/ml salmon sperm DNA) and incubated in buffers (pH 5.0 or 7.0) containing 2 mM CaCl_2 and 2 mM MgCl_2 (Ca/Mg) or 10 mM EDTA (EDTA). M_s of DNases were estimated by staining the gel with ethidium bromide and visualizing by UV illumination. (B) Samples from intestine (INT, 100 μ g protein) and whole worm (WW, 50 μ g protein) of *H. contortus* fenbendazole-resistant (R) and -susceptible (S) isolates were analyzed as in (A). Molecular markers are indicated in kDa on the right and numbers on the left refer estimated sizes of DNases based on molecular markers.

에 저항성을 지닌 기생충의 분비배설물의 DNase 활성은 EDTA 존재하의 pH 5.0에서 37 kDa DNase가 저항성을 나타내었다. 34 kDa DNase는 EDTA 존재하의 산성 pH에서 거의 대부분의 활성이 억제되었다. 반면, EDTA 존재하의 pH 7.0에선 어떤 DNase도 확인되지 않았다. FBZ에 감수성을 지닌 기생충 분비배설물의 DNases는 pH 5.0에서 37 kDa DNase가 EDTA에 의해 활성이 억제되지 않았으나 34 kDa DNase는 거의 대부분의 활성이 억제되었다. pH 7.0에서 확인된 34, 36 및 38.5 kDa DNase 모두 EDTA에 활성이 억제되었다.

38.5 kDa DNase 활성이 FBZ에 감수성을 지닌 기생충의 분비배설물에서만 확인되었기 때문에, 다음으로 38.5 kDa DNase가 두 분리주의 소화관과 기생충 전체 균질액에서 발현이 되는지를 확인하였다(Fig. 3B). FBZ에 저항성을 지니거나 감수성을 지닌 분리주의 소화관과 기생충 전체 균질액의 DNase 활성을 zymogram gel

에서 분석하였을 때 34, 36 그리고 38.5 kDa DNase가 pH 5.0과 7.0에서 두 분리주로부터 확인되었으며 그 활성도 비슷하게 나타났다.

음성 대조군으로 사용된 양의 혈청에는 DNase 활성이 확인되지 않았다.

Plasmid DNA 3'-말단 확인

FBZ에 저항성을 지닌 기생충의 분비배설물의 DNase가 어떤 3'-말단(3'-OH 혹은 3'-P)을 생산하는지를 확인하기 위하여 3'-말단 확인 실험을 하였다(Fig. 4). FBZ에 저항성을 지닌 기생충의 분비배설물의 DNase에 의해 생성된 3'-말단의 비율(두 실험결과의 평균)은 pH 5.0에서 8.2이었으며 pH 7.0에선 7.5이었다. 이들의 비율은 3'-말단이 3'-OH와 3'-P가 혼합되어 있다는 것을 의미하며 비율 8.2는 약 12%가 3'-OH이며 88%가 3'-P임을 의미한다. 비율 7.5는 약 13%가 3'-OH이며 87%가 3'-P임을 의

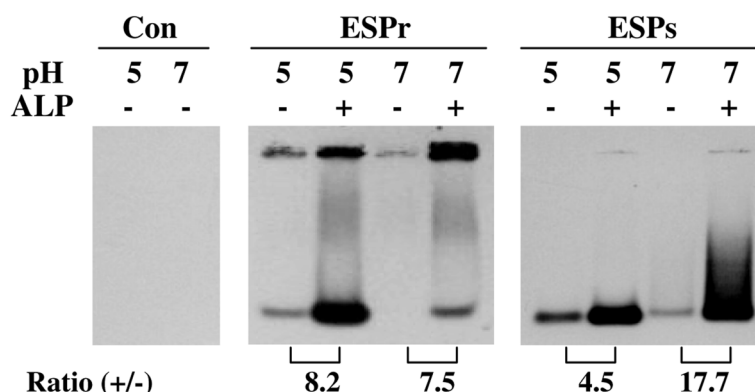


Fig. 4. 3'-End labeling of DNA fragments produced by DNase activities from *Haemonchus contortus* excretory/secretory products (ESP). Plasmid DNA was digested by DNase activities from ESP of *H. contortus* fenbendazole-resistant (ESPr) and -susceptible (ESPs) isolates (400 ng protein) as described in Fig. 1. Fragments produced were treated with (+) or without (-) alkaline phosphatase (ALP) at 37°C for 1 hr. Samples were then subjected to 3'-end labeling with terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT). DNA fragments (20 ng) separated on an agarose gel (0.8%) was transferred to nylon membranes. Labeled ends were detected as described in methods. Lanes Con, reactions with cultured worm-washed buffer without worm samples. Densitometric measures were done on exposures that produced detectable signal in each lane used to generate end labeling ratios (see methods; average of two repeats) of densitometric signal for samples treated with (+) or without (-) ALP. The ratio of ESPr at pH 7.0 was obtained from a longer exposed one.

미한다. 반면, FBZ에 감수성을 지닌 기생충의 분비배설물의 DNase는 pH 5.0과 7.0에서 각각 4.5와 17.7이었다. 비율 4.5는 약 22%가 3'-OH이며 비율 17.7은 약 6%가 3'-OH임을 나타낸다.

음성 대조군인 FBZ에 저항성을 지닌 기생충의 세척 용액의 배양액에 처리된 plasmid DNA에서는 신호가 거의 확인되지 않았다.

고 찰

FBZ에 저항성을 지닌 염전위충 분리주와 감수성을 지닌 염전위충 분리주 사이에 알려진 차이가 microtubule을 형성하는 β -tubulin에 있다고 알려져 있으며 그 외의 다른 차이점은 알려져 있지 않다 [3]. 더욱이, β -tubulin의 아미노산 200번째 자리의 전환이 FBZ에 저항성을 지니는데 충분하다고 보고되어 있다. 이 연구는 이들 분리주에서 다른 차이점을 밝히기 위하여 실행되었으며 우선 microtubule이 분비배설 세포의 운반에 주로 관여하기 때문에 두 분리주로부터 분비배설되는 DNase 활성을 비교 분석하였다. 이들 분리주로부터 분비배설되는 DNase 활성을 반복 실험을 통하여 비교하였던 바 가장 큰 차이점은 FBZ에 저항성을 지닌 분리주에서 38.5 kDa DNase가 분비배설되지 않는다는 것이었다. 그러나 두 분리주의 소화관과 기생충 전체 균질액에서는 38.5 kDa DNase 뿐만 아니라 34와 36 kDa DNases가 확인이

되었으며 인식할 만한 다른 차이점은 발견되지 않았다. 따라서, 두 분리주의 소화관에서의 분비배설물에서의 DNase 활성 비교는 38.5 kDa DNase가 두 분리주에서 발현은 되지만 FBZ에 저항성을 지닌 분리주에서는 분비배설이 되지 않는다는 것을 증명하였다. 그러나, 어떤 기전에 의해서 분비배설이 차단되는지는 알려져 있지 않으며 단지, 분비배설 세포의 운반을 맡고 있는 microtubule의 한 부분인 β -tubulin에서의 차이가 한 이유일 것이라고 추정된다.

FBZ에 저항성을 지닌 염전위충 분리주와 감수성을 지닌 분리주의 분비배설물에서 DNase 활성의 다른 차이점은 생성된 3'-말단 비율이 다르다는 것이다. 저항성을 지닌 분리주와 감수성을 지닌 분리주에서의 3'-말단 비율은 pH 5.0에서 각각 8.2와 4.5이었다. 이것은 두 분리주가 3'-OH와 3'-P가 혼합된 3'-말단을 생성한다는 것을 보여주지만 저항성을 지닌 분리주가 pH 5.0에서 더 많은 3'-P를 생성한다는 것을 의미한다. 반면, pH 7.0에서는 3'-말단 비율이 각각 7.5와 17.7이었다. 이 비율들은 두 분리주가 3'-OH와 3'-P가 혼합된 3'-말단을 생성한다는 것을 보여주지만 감수성을 지닌 분리주가 중성 pH에서 더 많은 3'-P를 생성한다는 것을 의미한다. 특히, pH 7.0에서 FBZ에 감수성을 지닌 분리주가 비율 17.7을 나타낸 것은 전통적인 중성 DNase I(비율 1.0)의 특성 [5]에 비교할 때 특이한 현상이었다. 두 분리주 분비배설물의 DNase에 의해 생성된 3'-말단 비율이 다른 것

은 38.5 kDa DNase에 의해 기인한 것으로 추측이 된다. 혹은, 이들 분리주의 DNase들이 같은 M_r 을 지니고 있지만 서로 다른 특성을 지닐 수도 있을 것이다.

이 두 분리주에서의 DNase 활성에 있어서 차이점이 있었지만 공통점도 발견되었다. 특히, 분비배설물 특이 의 그리고 전통적인 산성 DNase II의 특성을 지니고 있는 37 kDa DNase가 두 분리주에서 확인되었다. 이 DNase는 산성 pH에서 지배적인 활성으로 나타났으며 그 활성이 EDTA 존재 하에서도 억제되지 않았다. 그러나, 중성 pH에서 활성은 확인되지 않았다. 위의 특성은 37 kDa DNase가 전통적인 산성 DNase II의 특성을 지니고 있음을 다시금 증명한 것이었다. 37 kDa DNase 뿐만 아니라 34 kDa DNase도 두 분리주에서 확인되었으며 산성과 중성 pH에서 활성이 나타났으나 EDTA 존재 하에서 대부분의 활성이 억제되었다.

마지막으로, 38.5 kDa DNase가 FBZ에 감수성을 지닌 분리주에서는 분비배설이 되었지만 저항성을 지닌 분리주에선 분비배설되지 않았기 때문에 이 38.5 kDa DNase의 분비배설 경로가 34, 36 및 37 kDa DNases와 다른 경로를 갖고 있을 것으로 추정된다. 이들이 같은 분비배설 소포에 쌓여 기생충 밖으로 분비배설이 된다면 38.5 kDa DNase도 분비배설물에서 확인이 되어야 할 것이기 때문이다. 분비배설되는 DNases는 대체로 signal peptides를 갖고 있거나 아니면 작은 소포에 쌓여 분비가 된다고 알려져 있다 [8]. 세포 밖으로 분비되지 않는 DNases는 다른 localization signal(예, nuclear localization signal [10], mitochondrial localization signal [7])을 지니고 있거나 propeptide sequence를 지니고 있는 proenzyme으로 세포내에 존재하거나 [9] 세포내의 소기관 [12]에 쌓여 있다고 알려져 있다(예, lysosomal DNase II). 기생충의 세포 내에서 이들 DNase가 어떤 기전으로 활성화가 되며 어떤 경로로 분비배설되는지 그리고 세포 밖으로 분비배설된 DNases의 역할을 밝히는 것과 어떤 DNase가 숙주의 점막세포를 침투하는데 관여하며 또한 어떤 DNase가 기생충의 생존에 중요한지를 밝히는 것은 과제로 남아 있다.

결 론

FBZ에 저항성을 지닌 염전위충 분리주와 감수성을 지닌 염전위충 분리주 사이의 다른 점이 microtubule을 형성하는 β -tubulin에 있다고 알려져 있으나 이 두 분리주로부터 다른 차이점을 발견하기 위하여 분비배설되는 DNases를 비교 분석하였던 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) FBZ에 저항성을 지닌 염전위충 분리주에서 3 M_r

(34, 36 및 37 kDa)의 DNase 활성이 확인되었다.

(2) FBZ에 감수성을 지닌 염전위충 분리주에서 4 M_r (34, 36, 37 및 38.5 kDa)의 DNase 활성이 확인되었다.

(3) 38.5 kDa DNase는 FBZ에 감수성을 지닌 분리주에서만 확인되었고 저항성을 지닌 분리주에서는 확인되지 않았다.

(4) 38.5 kDa DNase는 FBZ에 저항성을 지닌 분리주의 소화관과 전체 균질액에서 발현은 되지만 분비배설되지 않았다.

(5) 두 분리주에서 분비배설되는 DNase에 의해 생성되는 3'-말단은 3'-OH와 3'-P가 혼합되어 있으나 서로 다른 비율로 나타났다.

참고문헌

1. **Borgers, M., De Nollin, S., De Brabander, M. and Thienpont, D.** Influence of the anthelmintic mebendazole on microtubules and intracellular organelle movement in nematode intestinal cells. *Am. J. Vet. Res.* 1975, **36**, 1153-1166.
2. **Jasmer, D. P., Yao, C., Rehman, A. and Johnson, S.** Multiple lethal effects induced by a benzimidazole anthelmintic in the anterior intestine of the nematode *Haemonchus contortus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2000, **105**, 81-90.
3. **Kwa, M. S., Veenstra, J. G. and Roos, M. H.** Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in beta-tubulin isotype 1. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1994, **63**, 299-303.
4. **Kwa, M. S., Veenstra, J. G., Van Dijk, M. and Roos, M. H.** Beta-tubulin genes from the parasitic nematode *Haemonchus contortus* modulate drug resistance in *Caenorhabditis elegans*. *J. Mol. Biol.* 1995, **246**, 500-510.
5. **Kwak, D. and Jasmer, D. P.** Non-classic characteristics define prominent DNase activities from the intestine and other tissues of *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 2003, **104**, 131-139.
6. **Lubega, G. W. and Prichard, R. K.** Interaction of benzimidazole anthelmintics with *Haemonchus contortus* tubulin: binding affinity and anthelmintic efficacy. *Exp. Parasitol.* 1991, **73**, 203-213.
7. **Prats, E., Noel, M., Letourneau, J., Tiranti, V., Vaque, J., Debon, R., Zeviani, M., Cornudella, L. and Ruiz-Carrillo, A.** Characterization and expression of the mouse endonuclease G gene. *DNA Cell Biol.*

- 1997, **16**, 1111-1122.
8. **Shak, S., Capon, D. J., Hellmiss, R., Marsters, S. A. and Baker, C. L.** Recombinant human DNase I reduces the viscosity of cystic fibrosis sputum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1990, **87**, 9188-9192.
 9. **Shiokawa, D. and Tanuma, S.** Molecular cloning and expression of a cDNA encoding an apoptotic endonuclease DNase gamma. Biochem. J. 1998, **332**, 713-720.
 10. **Shiokawa, D., Shika, Y. and Tanuma, S.** Identification of two functional nuclear localization signals in DNase gamma and their roles in its apoptotic DNase activity. Biochem. J. 2003, **376**, 377-381.
 11. **Shompole, S., Yao, C., Cheng, X., Knox, D., Johnson, S. and Jasmer, D. P.** Distinct characteristics of two intestinal protein compartments discriminated by using fenbendazole and a benzimidazole resistant isolate of *Haemonchus contortus*. Exp. Parasitol. 2002, **101**, 200-209.
 12. **Yasuda, T., Takeshita, H., Iida, R., Nakajima, T., Hosomi, O., Nakashima, Y. and Kishi, K.** Molecular cloning of the cDNA encoding human deoxyribonuclease II. J. Biol. Chem. 1998, **273**, 2610-2616.