

Comparison of Expression Profiles between Trophozoite and Cyst of *Acanthamoeba castellanii*

Eun-Kyung Moon and Hyun-Hee Kong[†]

Department of Parasitology, Kyungpook National University School of Medicine, Taegu 700-422, Korea

Acanthamoeba is an opportunistic pathogen known to cause granulomatous amoebic encephalitis and amebic keratitis. *Acanthamoeba* exhibits life cycle consisting of trophozoite and cyst, and the cyst is highly resistant to variable antibiotics and therapeutic agents. To understand the encystation mechanism of *Acanthamoeba*, the expression profiles of trophozoite and cyst were compared by gene ontology (GO) analysis. Ribosomal proteins and cytoskeletal proteins were highly expressed in trophozoite. In cyst, various protease, and signal transduction - and protein turnover - related proteins were highly expressed. These results correlated with eukaryotic orthologous groups (KOG) assignment and microarray analysis of *Acanthamoeba* trophozoite and cyst ESTs. The information of differential expression profiles of trophozoite and cyst would provide important clues for research on encystation mechanism of cyst forming protozoa including *Acanthamoeba*.

Key Words: *Acanthamoeba*, Encystation, Expression profile, GO analysis

가시아메바 (*Acanthamoeba*)는 인간의 생활환경주변에 널리 분포하며, 종에 따라 인체에 감염되어 아메바성 육아종성 뇌염, 아메바성 각막염 또는 아메바성 피부염 등을 일으킬 수 있는 병원성 원충이다 (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). 가시아메바의 생활사는 영양형 및 포낭형의 2기로 나눌 수 있는데, 영양형은 이동, 탐식, 세포분열 및 각종 대사작용을 수행하는 반면, 영양물질의 부족, 온도 및 pH의 변화 등에 의해 생존하기에 부적합한 환경에 처하게 되면 영양형은 포낭형으로 전환되어 일시 정지상태를 유지하고 있다가 생존하기 적합한 환경에 처해졌을 때 다시 영양형으로 회복하여 각종 대사를 수행하게 된다 (Marciano-Cabral and Cabral, 2003). 가시아메바의 포낭형은 인체에 감염되었을 때 숙주의 면역반응이나 각종 항생물질에 대해 강한 저항성을 나타내기 때문에 (Aksozek et al., 2002; Coulon et al., 2010), 현재의 치료제로서는 완벽한 치료효과를 거두기 힘든 실정이다.

최근 포낭을 형성하는 병원성 원충들의 포낭 형성 메

커니즘을 이해하기 위해 포낭 형성 관련 인자들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. *Giardia intestinalis*의 cyst wall protein 1, 2, 3의 연구 결과가 보고되었고 (Touz et al., 2002; Davis-Hayman et al., 2005; Sun et al., 2003), *Toxoplasma gondii*의 lactate dehydrogenase 및 enolase가 보고되었으며 (Cleary et al., 2002), *Entamoeba histolytica*의 heat shock protein 70 및 cyst wall protein Jacob에 대한 연구 결과가 보고되었다 (MacFarlane et al., 2005). 가시아메바의 포낭 형성 관련 인자들에 대한 연구 또한 활발히 진행되고 있는데, cyst specific protein 21, encystation mediating serine proteinase, autophagy related protein 8 및 포낭 형성 초기에 관여하는 cysteine proteinase에 대한 연구 결과가 발표되었다 (Chen et al., 2001; Moon et al., 2008b; Moon et al., 2009; Leitsch et al., 2010). 가시아메바의 영양형 및 포낭형의 expressed sequence Tags (ESTs)에 대한 orthologous groups (KOG) 분석 및 cDNA에 대한 microarray 분석 결과가 보고되었고 (Moon et al., 2008a; Moon et al., 2011b) 이들에 대한 database도 구축되었다 (Moon et al., 2009). 또한 실험실에서 장기간 배양으로 인해 포낭형성을 저하됨을 확인한 후 새 균주로 영양형 및 포낭형의 cDNA library를 제작하여 포낭 형성 시 발현이 증가하는 ESTs에 대해 KOG 분석을 수행하였다 (Moon et al., 2011a).

현재까지 진행된 연구들은 포낭 형성 과정 중 발현이

*Received: August 9, 2012 / Revised: August 24, 2012

Accepted: August 31, 2012

[†]Corresponding author: Hyun-Hee Kong. Department of Parasitology, Kyungpook National University School of Medicine, 101 Dongin-dong, Joong-gu, Taegu 700-422, Korea.
Tel: +82-53-420-4882, Fax: +82-53-422-9330
e-mail: hkhong@mail.knu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

증가하는 유전자에 대해 초점을 두어, 포낭 형성 시 발현이 증가하는 단백질의 역할 규명에 대한 연구가 대부분이었다. 이에 본 연구에서는 가시아메바의 영양형 및 포낭형의 ESTs에 대해 gene ontology (GO) 분석을 수행하여 포낭 형성 과정 중 발현이 증가하는 유전자와 발현이 감소하는 유전자에 대한 profile들을 제작하였다. 또한 앞서 보고된 KOG 분석 및 microarray 분석 결과와 상호관계를 규명함으로써 포낭을 형성하는 병원성 원충의 포낭 형성 기작을 이해하는데 중요한 기초자료를 제공하고자 하였다.

본 연구를 위해 American Type Culture Collection에서 구입한 *Acanthamoeba castellanii* Castellani (ATCC#30011)의 영양형은 PYG (peptone-yeast-glucose) 배지 (10 g proteose peptone, 10 g yeast extract, 10 ml ~ 50% glucose, 10 ml ~ 0.5 M Na₂HPO₄, 10 ml ~ 0.5 M K₂HPO₄ in 970 glass distilled water with the final pH adjusted to 6.5)에 넣어 25°C 배양기 (Sanyo, San Diego, California, USA)에서 배양하였다. 포낭형은 5×10^5 개의 영양형을 포낭 형성 유도배지 (95 mM NaCl, 5 mM KCl, 8 mM MgSO₄, 0.4 mM CaCl₂, 1 mM NaHCO₃, 20 mM Tris-HCl, pH 9.0) 10 ml에 넣어 25°C에서 3일간 배양하여 확보하였고, 위 배지에 사용한 모든 시약들은 라이프사이언스 (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 가시아메바의 영양형 및 포낭형의 RNA는 TRIzol (Gibco BRL, Rockville, Maryland)을 사용하여 추출하였고, 각각의 cDNA library는 ZAP-cDNA Synthesis Kit 및 ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit (Stratagene, La Jolla, California, USA)의 사용방법에 준하여 제작하였고 (Moon et al., 2008a), 각 유전자의 염기서열은 PE377 DNA 염기서열분석기 (PerkinElmer, Boston, Massachusetts, USA)로 분석하였다. Ortholog (서로 다른 종에서 동일한 기능을 수행하는 유전자들의 관계) 유전자 분석은 서열 유사성을 기본으로 하여 진행하였고, GO 분석은 두 단계로 진행하였다. 1차 분석은 서열 유사성 검사로, 확보된 가시아메바의 영양형 및 포낭형 ESTs (Moon et al., 2011a)에 대해 단백질 수준으로 BLAST를 수행하여 e-value가 1e-5를 통과하는 유전자를 분석대상으로 선별하였다. 2차 분석은 서열 유사성과 발현패턴에 대한 '피어슨 상관계수' (Pearson Correlation coefficient)를 비교하여 ortholog 유전자를 비교하게 되는데, 일차 선별된 ESTs들을 한국생명공학연구원의 유전체 자원센터에 의뢰하여 이차 분석을 실시한 후 ortholog 유전자를 3가지 생물학적 메커니즘 범주 (biological function, cell component, molecular function)

로 나누어 gene ontology 분석을 수행하였다. Microarray 분석은 CustomArray™ 12K microarray를 사용하였고, 영양형 및 포낭형의 cDNA에 Biotin을 탐침한 샘플을 반응시켰으며, GenePix 4200A microarray scanner로 결과를 판독하였다. 최종 결과는 LPE-test P-value 0.05 미만이고, fold-change 2 이상인 것들만 분류하여 정리하였다 (Moon et al., 2011b).

가시아메바의 포낭 형성 과정 중 발현이 증가하거나 감소하는 유전자에 대한 profile들을 작성하기 위해, 2,659개의 영양형 ESTs와 2,706개의 포낭형 ESTs에 대해 gene ontology (GO) 분석을 수행한 결과, 생물학적 과정 (biological process)의 관점에서 볼 때, 가시아메바 영양형에서는 metabolic process (62개) 및 translation (56개)에 관여하는 유전자가 가장 많이 발현되는 것으로 확인되었다. 포낭형에서도 translation (79개) 및 metabolic process에 관여하는 유전자가 가장 많이 발현되는 것으로 확인되었으나 proteolysis (29개), intracellular protein transport (20개) 및 signal transduction (18개)에 관여하는 유전자도 높은 발현을 보인 것으로 확인되었다 (Fig. 1-A). 분자적 기능 (molecular function)면에서 볼 때, 영양형 및 포낭형 모두에서 ATP binding, catalytic activity 및 protein binding에 관여하는 유전자가 높은 발현을 보였으나, 영양형에서 높은 발현은 보였던 structural constituent of ribosome (69개) 관여 유전자가 포낭형에서는 상대적으로 낮은 발현 - structural constituent of ribosome (41개) - 을 보였다 (Fig. 1-B). 세포 안에서 유전자 생산물이 활동하는 위치에 대해 다루는 세포 요소 (cellular component) 측면에서 볼 때, 영양형 및 포낭형 모두에서 intracellular, ribosome 및 cytoplasm 순으로 높은 유전자 발현을 보였으나, 영양형에서 상대적으로 낮은 발현은 보였던 integral to membrane (18개) 관여 유전자가 포낭형에서는 발현이 오히려 증가하는 것으로 - integral to membrane (26개) - 확인되었다 (Fig. 1-C).

가시아메바의 영양형 및 포낭형 ESTs에 대해 KOG (eukaryotic orthologous groups) 분석한 결과 (Moon et al., 2011a) 및 microarray 분석 결과 (Moon et al., 2011b)를 막대그래프로 정리하여 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2에서 보여주듯이, KOG 분석 결과 역시 영양형에서는 J 항목 (translation, ribosomal structure 및 biogenesis) 및 Z 항목 (cytoskeleton) 등에서 공통적으로 발현이 증가하는 것으로 확인되었고, 포낭형에서는 T 항목 (signal transduction mechanisms) 및 O 항목 (posttranslational modification,

protein turn over, chaperones) 등에서 영양형에 비해 높은 발현을 보이는 것으로 확인되었다. 이러한 결과들은 Fig. 1에서 보여준 GO 분석 결과들과도 일치하는 것으로 확인되었다.

위 결과들을 검증하기 위해, GO 분석을 통해 영양형에서 높은 발현을 보였던 translation 관련 유전자 5종류 및 structure constituent 관련 유전자 5종류, 그리고 포낭형에서 높은 발현을 보였던 proteolysis에 관련된 유전자 5종류 및 signal transduction 관련 유전자 5종류에 대해 microarray 분석 결과와 비교하여 보았다 (Table 1). GO 분석 결과 translation 항목에 분류되면서 KOG 분석 결과 J 항목에 속하는 5종류의 유전자와, GO 분석 결과

structure constituent 항목에 분류되면서 KOG 분석 결과 Z 항목에 속하는 5종류의 유전자 모두 microarray 분석 결과 영양형에서 발현이 증가하는 것과 일치하는 결과를 보였다. 또한 GO 분석 결과 proteolysis 항목에 분류되면서 KOG 분석 결과 O 항목에 속하는 5종류의 유전자 및 GO 분석 결과 signal transduction 항목에 분류되면서 KOG 분석 결과 T 항목에 속하는 유전자 5종류 모두 microarray 분석 결과 포낭형에서 발현이 증가하는 것과 일치하는 것으로 확인되었다 (Table 1). 이러한 결과들은 본 연구에서 가시아메바의 영양형 및 포낭형의 ESTs에 대해 GO 분석한 결과들에 대한 신뢰도를 높이는 것이라 볼 수 있다.

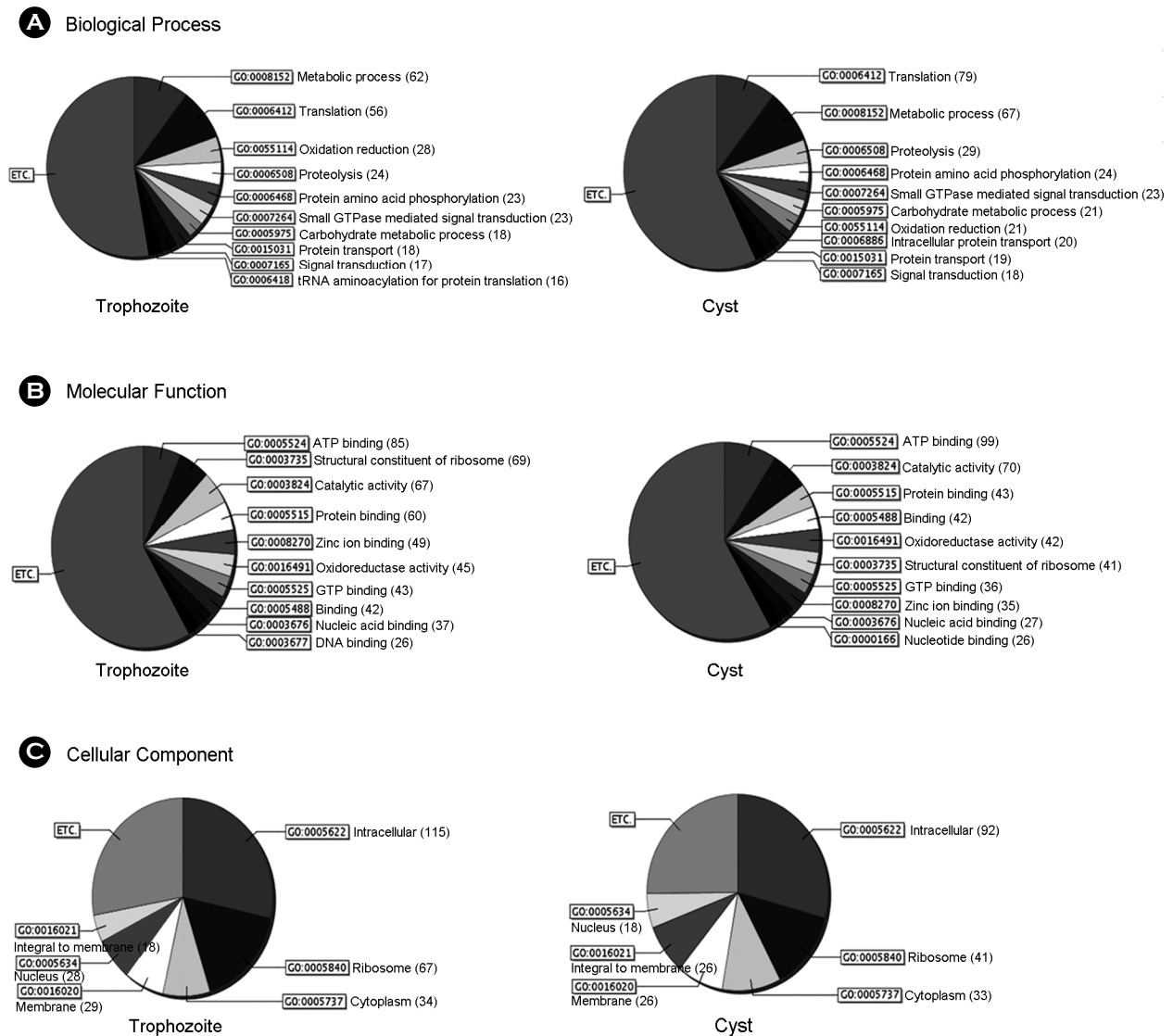


Fig. 1. Comparison of gene expression between trophozoite and cyst by GO analysis.

Gene Ontology (GO) 분석은 생명체에서 일어날 수 있는 여러 현상을 크게 3가지 범주 (biological function, cell component, molecular function)로 나눈 후 각 범주에 속한 세부 생물학적 메커니즘에 대해 기술한 것이라 할 수 있

다. GO 분석은 서로 다른 종간 기능비교 및 분화 과정 중 발달단계별 생물학적 기능비교에 유용하다.

본 연구에서는 가시아메바의 영양형 및 포낭형의 ESTs에 대해 각각 GO 분석하여 비교함으로써, 포낭이 형성

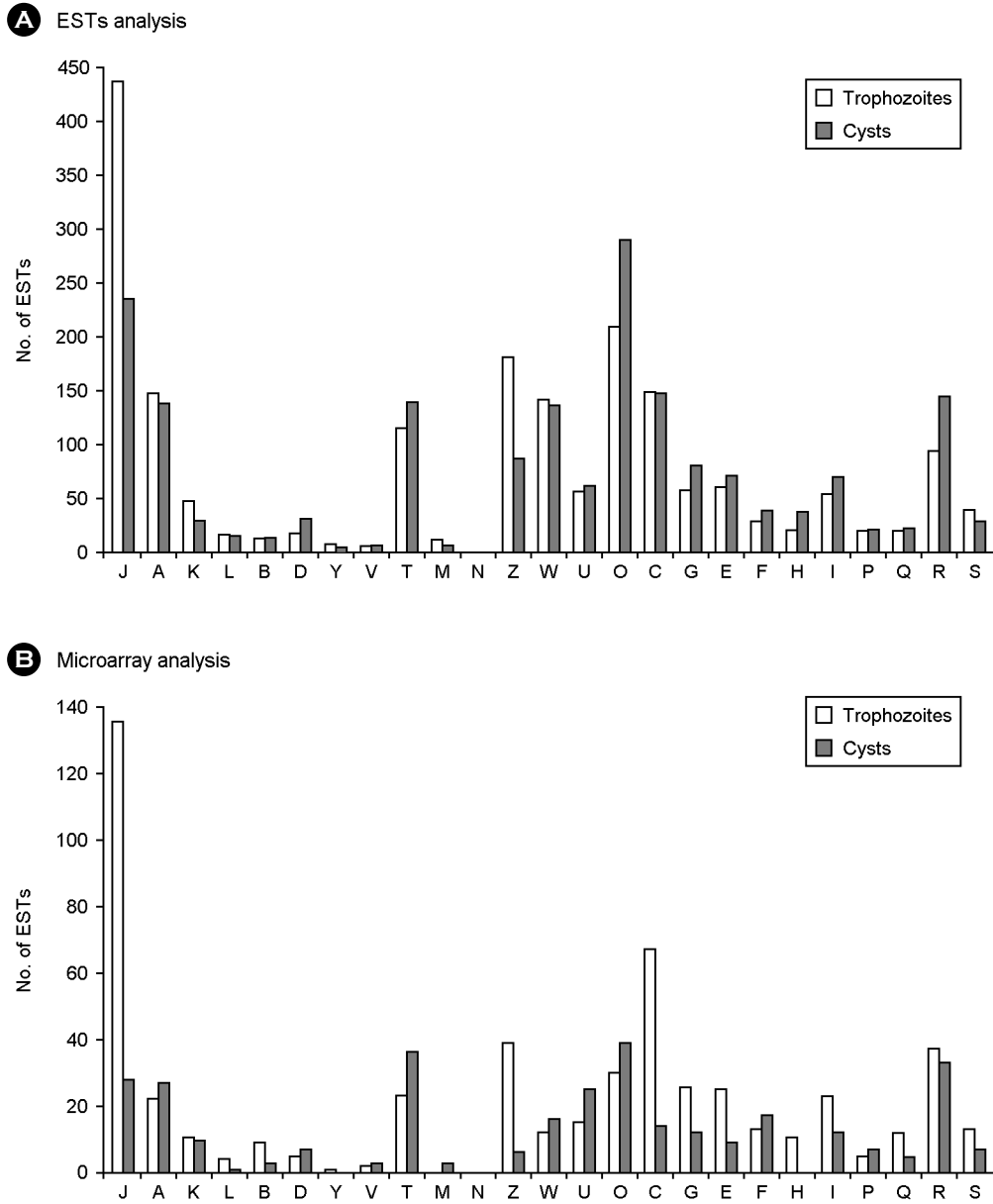


Fig. 2. Comparison of gene expression between trophozoite and cyst by KOG analysis. (A) ESTs analysis (Sequence similarity $\leq 1E^{-5}$), (B) microarray analysis (LPE-test P -value < 0.05). **J**; Translation, ribosomal structure and biogenesis, **A**; RNA processing and modification, **K**; Transcription, **L**; Replication, recombination and repair, **B**; Chromatin structure and dynamics, **D**; Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, **Y**; Nuclear structure, **V**; Defense mechanisms, **T**; Signal transduction mechanisms, **M**; Cell wall/membrane/envelope biogenesis, **N**; Cell motility, **Z**; Cytoskeleton, **W**; Extracellular structures, **U**; Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, **O**; Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, **C**; Energy production and conversion, **G**; Carbohydrate transport and metabolism, **E**; Amino acid transport and metabolism, **F**; Nucleotide transport and metabolism, **H**; Coenzyme transport and metabolism, **I**; Lipid transport and metabolism, **P**; Inorganic ion transport and metabolism, **Q**; Secondary metabolites biosynthesis, transport and metabolism, **R**; General function prediction only, and **S**; Function unknown.

될 때 발현이 증가하는 유전자와 발현이 감소하는 유전자를 정리하였다. 가시아메바의 영양형은 살기에 부적합한 환경에 처해졌을 때 포낭형으로 전환되어 생존에 필요한 최소한의 대사만을 수행할 것으로 예상되었으나, 포낭형의 ESTs에 대한 GO 분석 결과, 포낭형 역시 대사 과정에 많은 유전자들을 발현시키는 것으로 확인되었다 (Fig. 1). 한 가지 혹은 그 이상의 분자 기능이 조합되어 이뤄지는 생물학적 목적에 대해 다루는 생물학적 과정 (biological process)의 범주에서 볼 때 포낭형은 translation (79개), metabolic process (67개), proteolysis (29개), protein amino acid phosphorylation (24개), small GTPase mediated signal transduction (23개), carbohydrate metabolic process (21개), oxidation reduction (21개), intracellular protein transport (20개), protein transport (19개) 및 signal transduction (18개) 순으로 발현 정도를 나타내었다 (Fig. 1-A). 영양형의 metabolic process 및 translation에 분류된 유전자들은 각종 생물학적 대사 과정에 필요한 단백질을 생산해 내기 위한 것으로 생각되나, 포낭형의 translation 및 metabolic process에 분류된 유전자들은 포낭 형성 과정에 필요한 단백질을 생산해 내기 위한 것으로 여겨진다. 영양형의 proteolysis 관련 유전자들은 탐식 및 소화작용과 관련되어 있을 것으로 생각되고, 포낭형의 proteolysis 관련 유전자들은 포낭 형성에 필수적 요소인 자가포식과정 (autophagic process)에 필요한 단백질을 생산해내는 것들이라 생각된다. 가시아메바의 포낭 형성 과정 중 높은 발현을 보인 자가포식관련 단백질들 (autophagy related protein 8 및 autophagy related protein 16)이 그 예라 할 수 있다 (Moon et al., 2009; Song et al., 2012). 포낭형에서 높은 발현을 보인 intracellular protein transport (20개) 관련 유전자들 또한 *Giardia lamblia*의 포낭 형성 과정 중 세포벽을 구성하기 위해 이동되는 단백질들 즉, ESVs (encystation secretory vesicles) 및 VSPs (variable surface proteins)과 같은 범주의 것들로 생각된다 (Davids et al., 2006). Signal transduction 관련 유전자들 또한 세포 안에서의 위치에 대해 다루는 세포 요소 (cellular component) 범주의 integral to membrane 관련 유전자들과 함께 포낭을 형성하기 위한 신호전달체계에 관계되는 단백질들을 발현시키는 것으로 생각된다. 가시아메바의 포낭 형성 초기에 발현 증가를 보인 다양한 PKC (protein kinase C) 유전자들이 그 예라고 할 수 있다 (Moon et al., 2011a). 본 연구에서 수행한 가시아메바의 영양형 및 포낭형의 ESTs에 대한 GO 분석 결과는 포낭 형성 과정 중 발현

Table 1. Comparison of differential expressed genes by GO analysis with microarray analysis

KOG	KOG_Annotation	Trophozoite	Cyst
J	50S ribosomal protein L33	7.78	1
J	Elongation factor 1-alpha	2.59	1
J	60S ribosomal protein L36	2.56	1
J	40S cytoribosomal protein S24	2.54	1
J	Mitochondrial ribosomal protein L23	2.32	1
Z	Actin-1	2.31	1
Z	Dynein light chain	2.21	1
Z	Profilin-1A	2.20	1
Z	F-actin capping protein	2.18	1
Z	Coactosin related cluster	2.03	1
O	Cysteine proteinase	1	282.38
O	Ubiquitin	1	11.03
O	Dipeptidyl peptidase IV	1	10.46
O	Subtilisin-like serine proteinase	1	6.58
O	Heat-shock protien 70	1	5.96
T	Phosphatidylinositol 4-phosphate 5'-kinase	1	9.91
T	Tyrosine kinase-like (TKL) protein	1	4.38
T	CAMP-dependent prtotein kinase A	1	2.64
T	Serine/threonine protein kinase	1	2.64
T	Ras-related small GTP-binding protein	1	2.48

ArrayAssist[®] 5.5.1 was used as statistical software.

LPE-test *P*-value < 0.05 and Fold-change (>2, <-2).

J; Translation, ribosomal structure and biogenesis, **Z**; Cytoskeleton, **O**; Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, and **T**; Signal transduction mechanisms.

차이를 보인 유전자들에 대한 KOG 분석 및 microarray 분석 결과와 비슷한 양상을 보였다 (Fig. 1 and Fig. 2).

위 결과들을 종합해 보면, 가시아메바는 영양형에서 포낭형으로 전환될 때 이동, 탐식, 세포분열 및 에너지 생산 등과 관련된 단백질들의 발현이 억제되는 반면, 포낭을 형성하기 위한 신호에 관련되는 단백질, 세포벽 구성에 필요한 단백질 및 불필요한 단백질의 제거 또는 에너지 순환에 관련되는 단백질 (자가포식체 관련 단백질)들의 발현이 증가되는 것으로 확인되었다. 이 중 일부 유전자들에 대한 발현 증가 또는 발현 감소는 영양형 및 포낭형 유전자들에 대한 microarray 결과와 비교하여 증명하였다 (Table 1). 포낭 형성에 관련하여 현재까지 보고

된 논문들은 주로 포낭 형성 시 발현이 증가되는 단백질들에 대해 그 특성과 기능을 연구하는 데 집중되어 있다. 본 연구에서는 포낭 형성 시 발현이 감소되는 유전자들에 대한 중요도를 언급함으로써, 해당 단백질의 발현이 억제 되어야만 포낭 형성이 원활하게 진행됨을 시사한다고 할 수 있다. 이러한 단백질들의 발현 억제 또는 과발현이 포낭 형성에 미치는 영향 또한 차후에 연구되어야 할 것으로 생각된다. 본 연구에서 정리한 가시아메바의 포낭 형성 과정 중 발현이 증가하는 유전자와 발현이 감소하는 유전자에 대한 profile들은 앞서 보고된 KOG 분석 및 microarray 분석 결과와 함께 포낭을 형성하는 병원성 원충의 포낭 형성 기작을 이해하는데 중요한 기초 자료가 될 것으로 생각된다.

Acknowledgements

이 논문은 2011학년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Aksozek A, McClellan K, Howard K, Niederkorn JY, Alizadeh H. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J Parasitol*. 2002. 88: 621-623.
- Chen L, Orfeo T, Gilmartin G, Bateman E. Mechanism of cyst specific protein 21 mRNA induction during *Acanthamoeba* differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 2004. 1691: 23-31.
- Cleary MD, Singh U, Blader IJ, Brewer JL, Boothroyd JC. *Toxoplasma gondii* asexual development: identification of developmentally regulated genes and distinct patterns of gene expression. *Eukaryot Cell*. 2002. 1: 329-340.
- Coulon C, Collignon A, McDonnell G, Thomas V. Resistance of *Acanthamoeba* cysts to disinfection treatments used in health care settings. *J Clin Microbiol*. 2010. 48: 2689-2697.
- Davids BJ, Reiner DS, Birkeland SR, Preheim SP, Cipriano MJ, McArthur AG, Gillin FD. A new family of giardial cysteine-rich non-VSP protein genes and a novel cyst protein. *PLoS One*. 2006. 1: e44.
- Davis-Hayman SR, Hayman JR, Nash TE. Encystation-specific regulation of the cyst wall protein 2 gene in *Giardia lamblia* by multiple cis-acting elements. *Int J Parasitol*. 2003. 33: 1005-1012.
- Leitsch D, Köhler M, Marchetti-Deschmann M, Deutsch A, Allmaier G, Duchêne M, Walochnik J. Major role for cysteine proteases during the early phase of *Acanthamoeba castellanii* encystment. *Eukaryot Cell*. 2010. 9: 611-618.
- MacFarlane RC, Shah PH, Singh U. Transcriptional profiling of *Entamoeba histolytica* trophozoites. *Int J Parasitol*. 2005. 35: 533-542.
- Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev*. 2003. 16: 273-307. Review.
- Moon EK, Chung DI, Hong YC, Ahn TI, Kong HH. *Acanthamoeba castellanii*: gene profile of encystation by ESTs analysis and KOG assignment. *Exp Parasitol*. 2008a. 119: 111-116.
- Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH. Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009. 168: 43-48.
- Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH. Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot Cell*. 2008-b. 7: 1513-1517.
- Moon EK, Chung DI, Hong Y, Kong HH. Expression levels of encystation mediating factors in fresh strain of *Acanthamoeba castellanii* cyst ESTs. *Exp Parasitol*. 2011a. 127: 811-816.
- Moon EK, Kim JO, Xuan YH, Yun YS, Kang SW, Lee YS, Ahn TI, Hong YC, Chung DI, Kong HH. Construction of EST database for comparative gene studies of *Acanthamoeba*. *Korean J Parasitol*. 2009. 47: 103-107.
- Moon EK, Xuan YH, Chung DI, Hong Y, Kong HH. Microarray analysis of differentially expressed genes between cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Korean J Parasitol*. 2011b. 49: 341-347.
- Song SM, Han BI, Moon EK, Lee YR, Yu HS, Jha BK, Danne DB, Kong HH, Chung DI, Hong Y. Autophagy protein 16-mediated autophagy is required for the encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012. 183: 158-165.
- Sun CH, McCaffery JM, Reiner DS, Gillin FD. Mining the *Giardia lamblia* genome for new cyst wall proteins. *J Biol Chem*. 2003. 278: 21701-21708.
- Touz MC, Norez MJ, Slavin I, Carmona C, Conrad JT, Mowatt MR, Nash TE, Coronel CE, Lujan HD. The activity of a developmentally regulated cysteine proteinase is required for cyst wall formation in the primitive eukaryote *Giardia lamblia*. *J Biol Chem*. 2002. 277: 8474-8481.