

*Pseudomonas aeruginosa*로부터 FPLC를 이용한 protease IV의 분리와 그것의 사람구강편평상피암종 세포에 미치는 세포독성효과

부산대학교 치의학전문대학원 구강해부학교실

구병찬 · 이무형 · 광현호 · 박봉수 · 김규천*

I. 서 론

약 100년 전에 암을 가진 사람이나 동물이 미생물 병원균에 감염되었을 때 암이 줄어들었다는 보고가 있었다¹⁾. 연이은 연구에 의하면 병원균들은 저산소상태의 암 조직에서 복제하고 숙주의 면역계를 자극하여 암의 진행을 억제하는 것으로 알려졌다²⁻⁴⁾. 오랜 시간 동안 이런 사실은 간과되어 오다가 최근에 암치료에 있어서 박테리아가 새롭게 각광을 받고 있다. 그래서 많은 박테리아들이 암의 성장률의 낮추거나 암의 크기를 줄이기 위해 사용되고 있다. 방광암과 다른 형태의 암에 사용되고 있는 *Mycobacterium bovis* BCG가 가장 두드러진 예가 될 것이다²⁾. 그러나 임상에서 안전하게 사용되기 위해서는 아직도 극복해야 할 많은 어려움이 남아 있다. 왜냐하면 살아있는 박테리아는 심각한 독성물질을 생성하고 부작용을 일으키기 때문에 사람의 암 치료에 사용됨에 있어서는 한계가 있다^{5, 6)}.

구강편평상피암은 구강에서 발생하는 악성 종양의 대부분을 차지하고 있다. 대부분의 구강편평상피암은 수술에 의한 절제와 방사선 치료에 의해 치료하고 있지만 5년 이내의 생존율에서는 가장 낮은 것으로 알려져 있다. 방사선 치료는

점막염, 체중감소 그리고 연조직의 괴사와 같은 현상에 제한적이다. 그리고 말기의 구강편평상피암은 암 치료제들이 유도하는 세포자멸사에 대해서도 저항성을 가진다^{7, 8)}.

최근의 연구들에 의하면 면역요법, 화학요법 그리고 방사선요법과 같은 암치료를 위한 많은 치료물질들은 암세포에서 세포자멸사를 유도시킴으로써 그들의 효과를 나타내고 있음을 설명하였다^{9, 10)}. 세포자멸사는 조절된 세포죽음으로서 세포표면에 있는 수용체를 통해 전달된 다양한 자극이 신호가 되어 단계적으로 세포내 분자들을 자극하여 세포를 죽음에 이르게 한다¹¹⁾.

박테리아는 단백질 합성저해제, 막에 구멍을 형성하는 단백질 그리고 내인성 세포죽음 기작을 활성화시키는 물질들을 분비함으로써 세포자멸사를 일으킬 수 있다¹²⁾. 나의 연구팀은 *Pseudomonas aeruginosa*의 세포막분비물 (Extracellular Products of *Pseudomonas aeruginosa*; EPPA)이 사람의 폐육종암 세포들보다 사람구강편평상피암종에서 더욱 더 선택적인 세포독성을 보였고, 그 세포죽음은 세포자멸사에 의한 죽음을 발견하였다. 이러한 사실은 EPPA에 구강편평상피암 세포에 대한 효과적인 항암물질이 포함되어 있음을 암시한다.

*Pseudomonas aeruginosa*는 그람 음성균으로서 면역이 약화된 환자나 낭포성 섬유증 환자에

* 교신저자.

서 심각한 감염을 일으킨다¹³⁾. *Pseudomonas aeruginosa*는 exotoxin A, exoenzyme S, elastase, protease IV 그리고 alkaline protease와 같은 독성물질을 세포밖으로 생산한다. 이러한 유독성 인자들이 호흡상피세포와 내피세포 그리고 대식세포에서 세포자멸사를 일으킨다고 보고되고 있다¹⁴⁻¹⁶⁾.

Protease IV (PIV)는 약 26 kDa 분자량을 가지는 serine protease이며, fibrinogen, plasmin 그리고 plasminogen을 분해시키며, 토끼와 생쥐의 각막에서 심각한 손상을 일으킨다는 보고가 있다¹⁷⁾. 본 연구는 EPPA에서 PIV를 FPLC를 이용하여 추출하고 그것이 YD-9 구강편평상피암 세포주에 세포자멸사 효과를 가지는 것을 알아보고자 시행하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. Cell culture

YD-9 세포는 Dulbecco's modified Eagles medium : Nutrient Mixture F12 (DMEM/F12, 3 : 1)의 혼합배지에 10% 소 태아 혈청, 1% glutamine 그리고 100 µg/ml penicillin/streptomycin을 첨가하고 5% CO₂가 제공되는 습윤상태의 37 °C 배양기에서 배양되었다.

2. Bacteria의 순수 분리

고체 배지 (Luria-Bertani agar)에 mucoid를 형성하며, microscope상에서 운동성이 있는 특이한 냄새를 갖는 bacteria의 colony를 선택하여 액체 LB 배지에 접종하여 순수 분리하였다. 이 박테리아의 동정을 위해 total bacterial DNA를 추출하고, 이로부터 박테리아의 16S rRNA의 염기서열을 분석하기 위해 gene amp system (PCR machine; corbet Research, Australia)를 사용하여 forward primer (5'-AACTGGAGG AAGGTGGGAT-3')와 reverse primer (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3')를 사용하여 PCR (polymerase chain reaction)로 증폭하고 증폭된 PCR product를 1% agarose gel에서 전

기영동하고 순수 분리하여 pGEM-T vector (Promega)에 삽입한 것을 E. coli에서 형질전환 시켜서 증가된 plasmid를 분리하여 PCR product의 sequence를 확인하고 균주를 동정했다.

3. Bacteria의 분비 단백질의 전기영동 분석

Bacteria를 LB (Luria-Bertani media; tryptone 10 g, yeast extract 5 g, NaCl 10 g per liter) 액체 배지에 접종하여 37°C에서 48시간 동안 shaking incubation하였다. bacteria가 포함된 배양액을 취하여 4°C에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리하였다. 그 상층액을 새 튜브에 옮겨 담고 pore-size 0.22 µm membrane으로 filtration하여 통과한 여과액을 사용하였다. Trichloroacetic acid를 이용하여 침전 농축하였다. 표준 단백질로써 BSA (Bovine Serum Albumin)를 표준으로 사용하여 Brad-Ford법으로 정량하였고 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis하고 commassie blue로 염색하여 밴드를 확인하였다.

4. 생산된 분비 단백질의 분리 및 정제

분리 농축된 *Pseudomonas aeruginosa*의 분비 단백질이 포함된 배지를 Superdex 75 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Code No. 17-1047-01) column이 부착된 ÄKTA FPLC system (Amersham Biosciences)에 흘려 보냈다. 각각의 peak를 수집하여 동정하였고, PIV와 일치하는 peak를 여러번 수집 농축하는 방법으로 정제하였다.

5. 선택된 peak의 사람 구강편평암세포의 독성 Test

96 plate에 sub-culture된 사람구강편평상피암 세포에 분리 농축된 PIV, exotoxin과 Las B elastase를 처리하여 MTT assay법으로 세포 생존율을 측정하였다.

6. Hoechst 33258 staining

분리된 PIV가 유도하는 세포자멸사의 형태학

적인 관찰을 위해 Hoechst 33258 염색을 시행했다. 세포는 4% formaldehyde로 10분간 고정하고 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 농도의 Hoechst 33258를 1 시간 동안 처리한 후에 형광현미경에서 관찰하였다.

7. 단백질의 동정

분리 농축되어진 peak collection 단백질의 N-말단 아미노산 서열을 알아내기 위해 (주)프로테오믹스에 의뢰하였다. sample의 준비는 FPLC를 통과한 배양액 중 나온 peak의 collection tube를 모아서 농축하여 SDS-PAGE 전기영동으로 얻어진 acrylamide gel을 얇게 잘라 의뢰하였다.

III. 실험결과

1. *Pseudomonas aeruginosa* 균주 확인

토양으로부터 순수 분리한 박테리아의 16S rRNA의 염기서열을 밝히기 위해 시행한 PCR의 결과 371 bp의 증폭된 DNA를 확인할 수 있었다(그림 1A). pGEM-T vector에 삽입하여 restriction enzyme digestion reaction으로 삽입여부를 확인하였으며(그림 1B), elastase와 protease를 동시에 생산해 내며, mucoid colony를 형성하는 *pseudomonas aeruginosa*임을 Gene Bank (NCBI)의 BLAST search로 동정할 수 있었다(그림 2).

2. EPPA의 단백질 분석 결과

EPPA를 전기영동하여 26 kDa에 해당하는 뚜렷한 밴드를 확인했고, 이 단백질의 동정을 의뢰한 결과 PIV임을 알 수 있었다(그림 3).

3. 생산된 분비 단백질의 분리 및 정제

*Pseudomonas aeruginosa*의 여러 가지 분비 단백질 중에서 원하는 PIV 단백질만을 순수정제하기 위하여 gel chromatography를 적용하였다(그림 4A). ÄKTA FPLC system (Amersham Biosciences)을 이용하였고, column은 Superdex

75 HR 10/30 (Amersham Biosciences, Code No. 17-1047-01)를 사용하였다. Column의 equilibration은 최대 압력 1.8 MPa 이하를 유지하면서, flow rate 0.5 ml/min의 속도를 유지하여, 2배 볼륨인 50 ml의 PBS (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4)를 흘려보냈다. 시료의 준비는 *Pseudomonas aeruginosa* 배양액을 4°C에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리하고 0.22 μm membrane으로 filtration한 것을 준비하였다. Column에 loading할 시료량을 500 μl 로 하여 sample loop에 주입했다. Buffer는 phosphate buffer (pH 7.0)를 사용하여 flow rate 0.5 ml/min으로 흘려보냈다. Collection volume은 0.5 ml로 하고, 19 ml을 흘려보내고 난 후인 collector의 B5 fraction에 해당하는 peak를 여러 번 수집하고 농축하였다. 500 μl 의 시료에 포함된 PIV의 농도는 대략 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도로 측정되었다. Peak를 모아 10배 농축되어진 PIV 10 μl 를 6 X loading buffer 3 μl 와 혼합하여 100°C에서 3분 끓인 후 12% SDS-PAGE로 26 kDa 정도의 밴드를 확인하였다(그림 4B).

4. YD-9 세포에 대한 세포독성효과 및 Hoechst 염색

FPLC에 의해 추출된 PIV는 OSC 세포에 대해 세포 독성 효과를 나타내었지만, EPPA에 포함된 다른 독성 단백질에 비해서는 떨어지는 경향을 보였다(그림 5A). 그리고 Hoechst 염색에 의해 PIV가 처리된 세포에서 핵의 응축과 분절을 관찰할 수 있었다(그림 5B).

IV. 총괄 및 고안

최근 종양에 대한 진단과 치료의 많은 발전에도 불구하고 두경부 영역 악성종양의 예후는 큰 변화가 없으며 특히 잘 발달된 혈관분포를 가지는 설암에서는 그 치료 및 예후가 매우 불량하다. 최소한의 침윤양상을 보이는 편평상피암일 지라도 구강에 존재할 경우 대부분 근치적 절제술로 치료를 하지만 국소적인 재발 혹은 원격전이 등으로 생명에 위협을 초래할 수 있다. 따라

서 생물학적으로 침윤양상의 종양을 가진 환자를 구분하고 효과적인 치료전략에 중요한 요소로 작용할 수 있는 물질개발에 대한 연구가 계속적으로 진행되고 있다.

오래전 미생물 병원균에 감염된 암 환자에서 암의 크기가 현격히 줄어들었다는 보고가 있는 이후, 암치료에 이용될 수 있는 박테리아를 발견하거나 유전자 조작에 의하여 개발하고 또는 박테리아의 추출물을 찾아내는 많은 노력이 지금까지 이루어지고 있다⁴⁻⁶⁾. 화학요법에 적합한 물질을 분비하는 혐기성 박테리아를 생쥐의 피하 종양에 처리했을 때 종양의 크기가 현저하게 줄어들었다고 보고되었으며 이를 combination bacteriolytic therapy라고 불리고 있다⁵⁾. 비록 다양한 종류의 박테리아가 종양 조직의 혐기성 상태에서 증식하면서 종양을 줄어들게 하는 것이라 믿어지고 있지만, 그러한 병원균에 의한 암 억제에 대한 기전에 대해서는 아직까지 잘 밝혀지고 있지 않다. 특히 박테리아가 분비하는 특정 인자들에 의한 암세포의 사멸 기작에 대해서는 거의 알려진 바가 없다.

*Pseudomonas aeruginosa*는 병원에서 감염되는 가장 일반적인 그람-음성 박테리아로서 많은 독성물질과 변성능력을 가지는 효소들을 분비하며 이들이 발병에 중요한 기능을 하고 있다¹³⁻¹⁶⁾. 나의 실험실에서는 EPPA가 MG63과 HOS와 같은 뼈육종세포에 비해 구강편평상피암종에 훨씬 더 많은 세포사멸을 일으키는 것을 발견하고 이러한 현상을 유도하는 물질을 찾기 위해 다양한 방법을 통해서 물질 추출과 그 물질이 구강편평상피암에 미치는 효과를 연구하고 있다. EPPA를 FPLC에서 단백질들의 peak를 관찰하였을 때, 많은 종류의 peak들을 볼 수 있었으며, 그 중에 몇몇 peak들은 다른 것과는 구별되게 선명한 peak를 나타내었다. 그러한 peak들에 대한 단백질 동정을 의뢰해서 확인하였고, 유전자 클로닝에 의한 방법 대신 직접적으로 FPLC를 통해서 분리할 수가 있었다. 여러 종류의 명확한 peak 중에서 저자는 약 26 kDa 분자량을 가지는 PIV를 분리해 내고자 본 실험을 시행하였다.

PIV는 숙주의 면역계를 무력화시킬 뿐만 아니라 직접적으로 망막 조직에 손상을 줄 수 있는

활성 부위를 가지고 있는 serine protease이다^{19, 20)}. 성숙한 PIV는 단백질 분해능을 가지고 *Pseudomonas aeruginosa*의 세포밖 배양액에서 발견된다²¹⁾. 나노그램의 PIV를 토끼의 각막에 주입했을 때 각막염에서 나타나는 것과 같이 각막상피세포가 파괴되었다고 보고되었다¹⁷⁾. 하지만 PIV의 다른 기능에 대해서는 아직까지 연구가 되고 있지 않아서 PIV를 분리하는 본 실험은 앞으로 많은 PIV 기능을 밝히는데 있어서 중요한 첫 과정이 될 것이다.

추출된 PIV는 *Pseudomonas aeruginosa*가 분비하는 exotoxin-A나 Las B elastase에 비해서는 세포독성효과가 떨어지지만 Hoechst 염색에 의한 결과로 봐서 세포사멸사에 의한 기작으로 세포가 죽음에 이른다는 것을 알 수 있었다. 다행스럽게 FPLC에서 나타난 PIV의 peak는 다른 단백질과는 선명하게 구별되는 양상을 보였기 때문에 유전자 클로닝을 하지 않고 FPLC에서 직접 추출할 수 있는 편리함이 있었다. 그리고 추출된 PIV를 전기영동으로 확인했을 때, 다른 밴드들을 거의 볼 수 없는 것으로 보아 순도 역시 매우 높은 것으로 생각된다. 하지만 EPPA가 보여 준 구강편평상피암세포에 대한 높은 세포독성효과와 비교해 볼 때, PIV의 구강편평상피암세포에 대한 세포독성효과가 낮은 것으로 보아 PIV는 우리가 기대하는 EPPA의 핵심적인 단백질은 아닌 것으로 생각된다. 그럼에도 불구하고 PIV의 효과에 대한 연구가 미진하기에 PIV 추출은 그 기능을 밝힘에 있어서 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다.

V. 결 론

구강편평상피암은 구강에서 발생하는 악성 종양의 대부분을 차지하며, 대부분의 구강편평상피암은 수술에 의한 절제와 방사선 치료에 의해 치료하고 있지만 5년 이내의 생존율에서는 가장 낮은 것으로 알려져 있다. 오래전 미생물 병원균에 감염된 암 환자에서 암의 크기가 현격히 줄어들었다는 보고가 있는 이후, 암치료에 이용될 수 있는 박테리아를 발견하거나 유전자 조작에 의하여 개발하고 또는 박테리아의 추출물을 찾아

내는 많은 노력이 지금까지 이루어지고 있다.

*Pseudomonas aeruginosa*는 exotoxin A, exoenzyme S, elastase, protease IV 그리고 alkaline protease와 같은 독성물질을 세포밖으로 생산한다. 이러한 유독성 인자들이 호흡상피 세포와 내피세포 그리고 대식세포에서 세포자멸사를 일으키는 것으로 알려져 있다. 본 연구실에서는 *Pseudomonas aeruginosa*의 세포밖분비물(EPPA)이 MG63과 HOS와 같은 골육종세포에 비해 구강편평상피암종에 훨씬 더 많은 세포사멸을 일으키는 것을 발견하고 이러한 현상을 유도하는 물질을 찾기 위해 다양한 방법을 통해서 물질 추출과 그 물질이 구강편평상피암에 미치는 효과를 연구하고 있다. EPPA를 FPLC에서 단백질들의 peak를 관찰하였을 때, 많은 종류의 peak들을 볼 수 있었으며, 그 중에서 저자는 약 26 kDa 분자량을 가지는 PIV를 분리해 내고자 본 실험을 시행하였다.

FPLC에서 나타난 PIV의 peak는 다른 단백질과는 선명하게 구별되는 양상을 보였기 때문에 유전자 클로닝을 하지 않고 FPLC에서 직접 추출할 수 있는 편리함 있었다. 추출된 PIV를 전기영동으로 확인했을 때, 다른 밴드들을 거의 볼 수 없는 것으로 보아 순도 역시 매우 높은 것으로 생각된다. 추출된 PIV는 *Pseudomonas aeruginosa*가 분비하는 exotoxin-A나 Las B elastase에 비해서는 세포독성효과가 떨어지지만 Hoechst 염색에 의한 결과로 봐서 세포자멸사에 의한 기작으로 세포를 죽음에 이르게 한다는 것을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Coley WB : The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases, 1893. Clin Orthop 262 : 3-11, 1991.
2. Alexandroff AB, Jackson AM, O'Donnell MA and James K : BCG immunotherapy of bladder cancer: 20 years on. Lancet 353(9165) : 1689-1694, 1999.
3. Paglia P and Guzman CA : Keeping the immune system alerted against cancer, Cancer Immunol Immunother 46(2) : 88-92, 1998.
4. Pawelek JM, Low KB and Bermudes D : Tumor-targeted Salmonella as a novel anticancer vector. Cancer Res 57(20)

- : 4537-4544, 1997.
5. Dang LH, Bettgowda C, Huso DL, Kinzler KW and Vogelstein B : Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 298(26) : 15155-15160, 2001.
6. Jain RK and Forbes NS : Can engineered bacteria help control cancer? Proc Natl Acad Sci U S A 98(26) : 14748-17450, 2001.
7. Wong DT, Todd R, Tsuji T and Donoff RB : Molecular biology of human oral cancer. Crit Rev Oral Biol Med 7(4) : 319-328 1996.
8. Dong G, Loukinova E, Chen Z, Gangi L, Chanturita TI, Liu ET and Van Waes C : Molecular profiling of transformed and metastatic murine squamous carcinoma cells by differential display and cDNA microarray reveals altered expression of multiple genes related to growth, apoptosis, angiogenesis, and the NF-kappaB signal pathway. Cancer Res 61(12) : 4797-4808, 2001.
9. Debatin KM, Poncet D and Kroemer G : Chemotherapy: targeting the mitochondrial cell death pathway. Oncogene 21(57) : 8786-803, 2002.
10. Lewanski CR and Gullick WJ : Radiotherapy and cellular signalling, Lancet Oncol 2(6) : 366-370, 2001.
11. Cohen JJ : Apoptosis. Immunol Today 14(3) : 126-130, 1993.
12. Nicas TI and Iglewski BH : The contribution of exoproducts to virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. Can J Microbiol 31(4) : 387-392, 1985.
13. Artenstein AW and Cross AS : Local and disseminated diseases caused by *Pseudomonas aeruginosa*, In: Campa M, Bendinelli M, Friedman H, Eds. *Pseudomonas aeruginosa* as an opportunistic pathogen. New York: Plenum Press, 223-244, 1993.
14. Rajan S, Cacalano G, Bryan R, Ratner AJ, Sontich CU, van Heerckeren A, Davis P and Prince A : *Pseudomonas aeruginosa* induction of apoptosis in respiratory epithelial cells: analysis of the effects of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction and bacterial virulence factors. Am J Respir Cell Mol Biol 23(3) : 304-312, 2000
15. Hauser AR and Engel JN : *Pseudomonas aeruginosa* induces type-III-secretion-mediated apoptosis of macrophages and epithelial cells. Infect Immun 67(10) : 5530-5537, 1999.
16. Jendrossek V, Grassme H, Mueller I, Lang F and Gulbins E : *Pseudomonas aeruginosa*-induced apoptosis involves mitochondria and stress-activated protein kinases. Infect Immun 69(4) : 2675-2683, 2001.
17. Engel LS, Hill JM, Caballero AR, Green LC and O'Callaghan RJ : Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 273(27) : 16792-16797, 1998.

18. Kim DH ; Replication-selective microbiological agents: fighting cancer with targeted germ warfare. *J Clin Invest* 105(7) : 837-839, 2000.
19. Estrellas PS Jr, Alionte LG and Hobden JA : A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr Eye Res* 20(3) : 157-165, 2000.
20. Traidej M, Marquart ME, Caballero AR, Thibodeaux BA and O'Callaghan RJ : Identification of the active site residues of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV. Importance of enzyme activity in autoprocessing and activation. *J Biol Chem* 24;278(4) : 2549-2453, 2003.
21. Traidej M, Caballero AR, Marquart ME, Thibodeaux BA, O'Callaghan RJ : Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* protease IV expressed in *Pseudomonas putida*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44(1) : 190-196, 2003.

Explanation of Figures

- Figure 1.** PCR product of *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA (A) and confirmation of 16s RNA inserted into pGEM-T cloning vector (B). Lane 1: pGEM-T-PCR product constructed plasmid DNA, Lane 2: Digestion reaction by PstI/ApaI restriction enzyme from pGEM-T-PCR product ligation plasmid.
- Figure 2.** Sequencing analysis of *Pseudomonas aeruginosa* 16S rRNA
- Figure 3.** Western analysis of *Pseudomonas aeruginosa* extracellular products and confirmation of PVI through protein classification.
- Figure 4.** Purification of PIV on Histrap HP column. (A) chromatogram of each step, PIV was purified by binding, washing and elution steps. (B) The purified histidine tagging PIV on SDS-PAGE.
- Figure 5.** Cytotoxic effects of 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PIV, Las B elastase and exotoxin-A on YD-9 cells (A) and apoptosis induced by 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PIV (B).

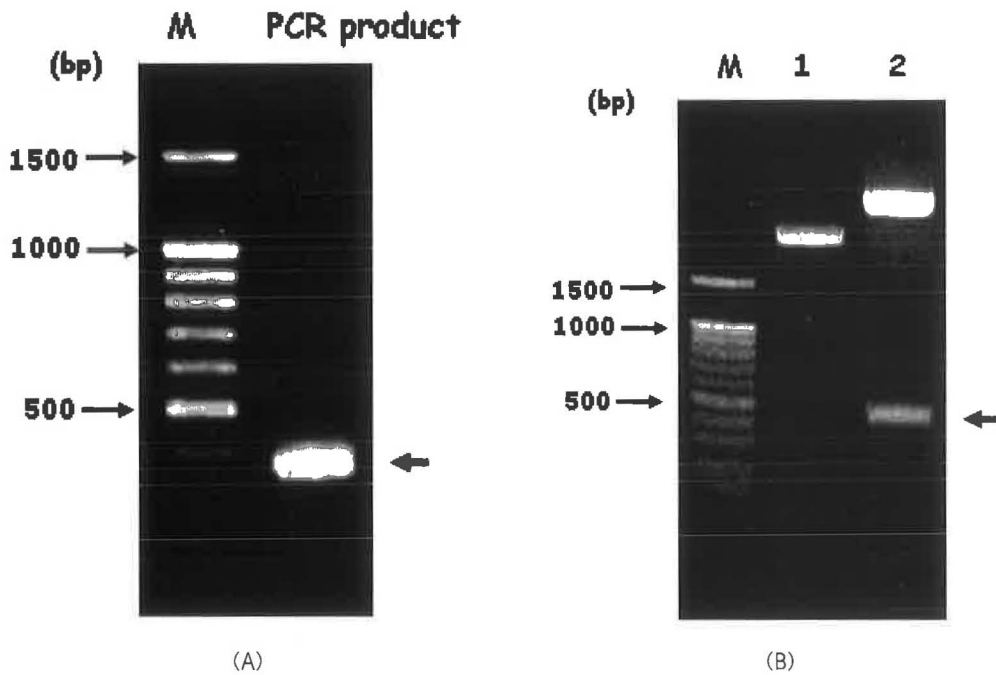


Fig. 1.

1	AGGAGGTGAT	CCAACCGCAG	GTTCCCCTAC	GGCTACCTTG	TTACGACTTC	ACCCCAGTCA
	TCCTCCACTA	GGTTGGCGTC	CAAGGGGATG	CCGATGGAAC	AATGCTGAAG	TGGGGTCAGT
61	TGAATCACTC	CGTGGTAACC	GTCCCCCTTG	CGGTTAGACT	AGCTACTTCT	GGAGCAACCC
	ACTTAGTGAG	GCACCATTGG	CAGGGGGAAC	GCCAATCTGA	TCGATGAAGA	CCTCGTTGGG
121	ACTCCCATGG	TGTGACGGGC	GGTGTGTACA	AGGCCCGGGA	ACGTATTAC	CGTGACATTC
	TGAGGGTACC	ACACTGCCCG	CCACACATGT	TCCGGGCCCT	TGCATAAGTG	GCACTGTAAG
181	TGATTCACGA	TTACTAGCGA	TTCCGACTTC	ACGCAGTCGA	GTTGCAGACT	GCGATCCGGA
	ACTAAGTGCT	AATGATCGCT	AAGGCTGAAG	TGCCTCAGCT	CAACGTCTGA	CGCTAGGCCT
241	CTACGATCGG	TTTTATGGGA	TTAGCTCCAC	CTCGCGGCTT	GGCAACCCTT	TGTACCGACC
	GATGCTAGCC	AAAATACCTT	AATCGAGGTG	GAGCGCCGAA	CCGTTGGGAA	ACATGGCTGG
301	ATTGTAGCAC	GTGTGTAGCC	CTGGCCGTAA	GGGCCATGAT	GACTTGACGT	CATCCCCACC
	TAAACATCGT	CACACATCGG	GACCGGCATF	CCCGGTACTA	CTGAACTGCA	GTAGGGGTGG
361	TTCCTCCAGT	T				
	AAGGAGGTCA	A				

Fig. 2.

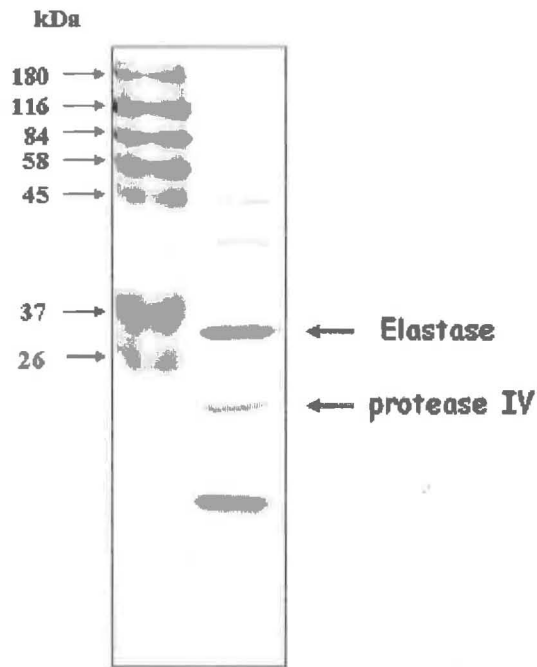


Fig. 3.

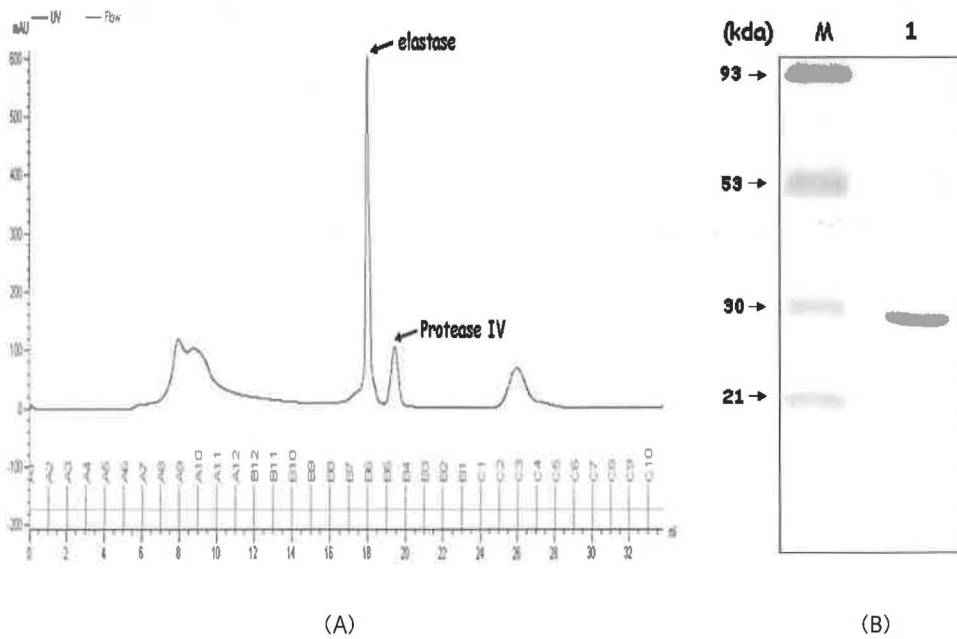
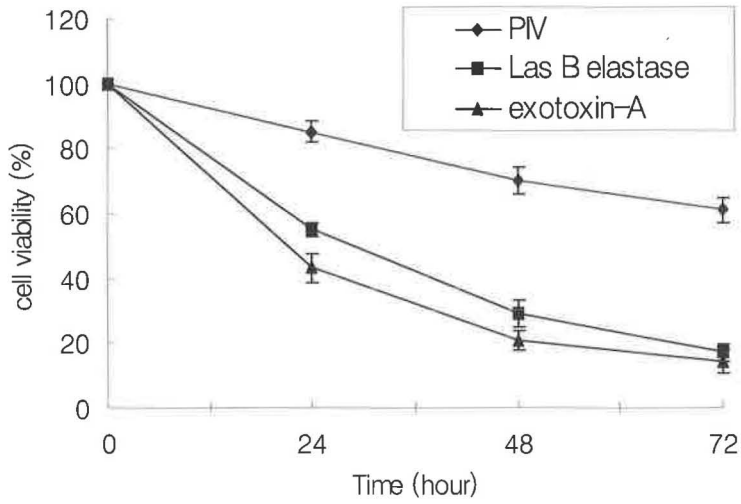
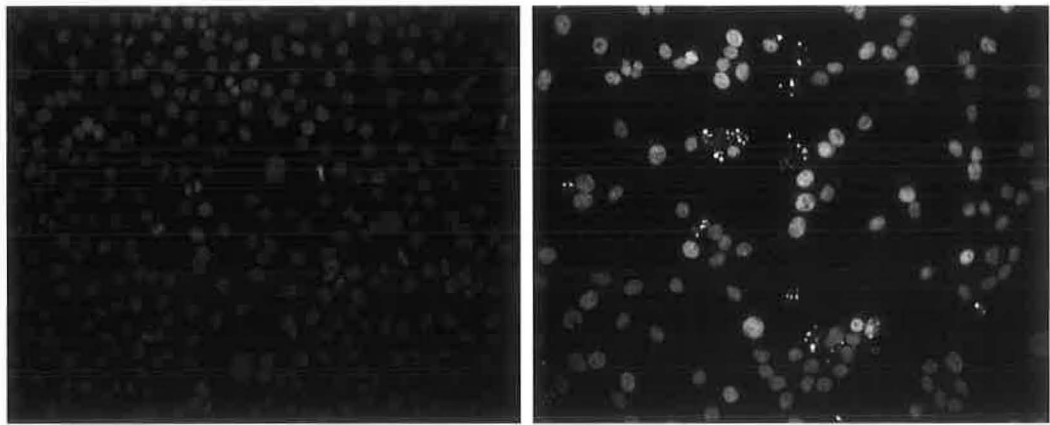


Fig. 4.



(A)



control

YD-9 cells treated 1 µg/ml PIV

(B)

Fig. 5.

- ABSTRACT -

Extraction of protease IV from *Pseudomonas aeruginosa* by FPLC and its cytotoxic effect on oral squamous carcinoma cells

Byung-Chan Koo, Mu-Hyung Lee, Hyun-Ho Kwak, Bong-Soo Park, Gyoo-Cheon Kim*

Department of Oral Anatomy, School of Dentistry, Pusan National University

Oral squamous carcinoma (OSC) cell is responsible for the majority of malignancies in the oral cavity. The majority of oral OSC could be treated by a wide surgical resection and/or radiation therapy but showed the lowest 5-year survival rate among the major cancers. After reports on regression of cancer in humans and animals infected with microbial pathogens date back more than 100 years, much effort has been spent over the years in developing wild-type or attenuated bacterial and purified bacterial proteins for the treatment of cancer.

Pseudomonas aeruginosa has extracellular virulence factors such as exotoxin A, exoenzyme S, elastase, protease IV (PIV) and alkaline protease. *Pseudomonas aeruginosa* has been reported to induce apoptosis in epithelial cells, endothelial cells and macrophage. My laboratory found that the extracellular products of *Pseudomonas aeruginosa* (EPPA) have a preferential cytotoxic effect on human oral squamous carcinoma cells compared with human osteosarcoma cells such as HOS and MG63. In order to find the key agent which has such a effect, I and collaborators have extracted many kinds of proteins by various methods and studied its cytotoxic effect on OSC cells. I observed many peaks of proteins from EPPA through FPLC and performed to extract 26 kDa PIV from them.

Because the pattern of PIV peak was distinct from other peaks, it was convenient to extract PIV through FPLC without using the gene cloning. When I perform protein electrophoresis with extracted PIV, no other bands found except 26 kDa PIV band, suggesting that extracted PIV was highly pure. Although the cytotoxic effect of extracted PIV was lower than exotoxin-A and Las B elastase from *Pseudomonas aeruginosa*, PIV led OSC cells to apoptosis by means of Hoechst stain.