

파울러자유아메바의 접촉성 병인 기전에 관여하는 *nfa1* 유전자

The *nfa1* Gene Contributed on the Contact-dependent Pathogenic Mechanisms of *Naegleria fowleri*

신호준

아주대학교 의과대학 미생물학교실

Ho-Joon Shin, Ph.D.

Department of Microbiology, and Department of Molecular Science and Technology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

책임저자 주소: 442-749, 경기도 수원시 영통구 원천동 산5번지
아주대학교 의과대학 미생물학교실

Tel: 031-219-5076, Fax: 031-219-5079

E-mail: hjshin@ajou.ac.kr

투고일자: 2010년 6월 8일, 심사일자: 2010년 6월 20일, 게재확정일자: 2010년 6월 29일

Abstract

Free-living *Naegleria fowleri* is a causal agent of primary amoebic meningoencephalitis in mainly children and young adults. An *nfa1* gene, encoding 360 bp of nucleotides, was cloned from a *N. fowleri* cDNA library by SEREX method. By immunohistochemistry and a confocal microscope, Nfa1 protein was found in amoebic pseudopods, especially in food-cups, when amoeba was in contact with target cells. When an anti-Nfa1 antibody was added to the coculture system, the cytotoxicity of *N. fowleri* trophozoites onto target cells was decreased, and the severe morphological destruction of rat microglial cells cocultured with *N. fowleri* trophozoites was reduced. In a transfection system, an expression vector with an *nfa1* gene was successful transfected into nonpathogenic *N. gruberi*, and transgenic *N. gruberi* showed the increasing in vitro

cytotoxicity. The siRNA decreased the expression levels of *nfa1* mRNA and Nfa1 protein in transfected *N. fowleri* trophozoites. On the immunization of mice with the rNfa1 protein, the protective immunity of host was induced. Thus, mice showed the prolonged mean survival times in PAM-developed mice. In final, the *nfa1* gene and Nfa1 protein play an important role in the pathogenesis of *N. fowleri* infection.

Key Words: *Naegleria fowleri*; *nfa1* gene, Cytotoxicity, Protective immunity, Recombinant protein

서 론

자유생활아메바(free-living amoeba)는 토양과 담수에서 자유생활을 하며, 자연 환경에서는 세균들을 포식하며 살아가는 아메바들로서 현재까지는 자유아메바(*Naegleria* spp.), 가시아메바(*Acanthamoeba* spp.), *Balamuthia* 및 *Sappinia* 아메바 등이 보고되고 있다.¹ 자유아메바 속(genus *Naegleria*)에는 약 30여종 이상이 있는 것으로 보고되고 있으며,² 그 중 병원성이 강한 파울러자유아메바(*Naegleria fowleri*)는 인체, 마우스 및 다른 실험동물들에서 원발성 아메바성 수막뇌염(primary amoebic meningoencephalitis; PAM)을 유발한다.³⁻⁶ 2008년에 미국에서 캠핑을 갔던 학생들 중 6명이 집단으로 파울러자유아메바에 감염되어 PAM으로 사망하는 사건이 발생하여 사회를 혼란케 했었으며(세계일보, 2009년 7월 30일자), 현재까지 세계적으로 약 200 건 이상의 PAM 발생 환자가 보고되고 있는데,¹ 국내에서는 파울러자유아메바에 의한 PAM 환자 발생에는 아직 보고되고 있지 않다.⁷

파울러자유아메바는 35°C의 온도에서 최적으로 성장하며

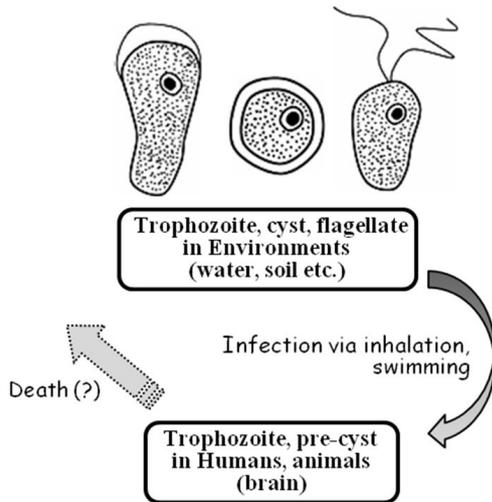


Fig. 1. Life-cycle of *Naegleria fowleri*.

40~50°C 에서도 생존이 가능하다. 크기가 7~20 μm이고 운동성이 매우 활발한 아메바형 시기(amoeboid stage), 10~18 μm 정도의 크기를 갖고 이중막의 원형 모양인 포낭형 시기(cystic stage)와 일시적인 편모를 갖는 편모형 시기(flagellate stage)로 구성되는 생활사를 가지고 있다(Fig. 1).^{3,8}

파울러자유아메바는 온도, 환경, 영양상태 등에 따라 영양형(trophozoite)에서 포낭(cyst)으로 바뀌는데 이를 포낭형성과정(encystation) 이라고 하며, 반대로 살기 좋은 환경에서는 포낭형에서 영양형으로 전환되는데 이를 탈낭과정(excystation)이라 한다.⁶ 포낭형성 과정에서 먹이 부족과 건조로부터 자신을 보호하는 역할로써 포낭화된다(encysting) 파울러자유아메바는 하나의 핵(nucleus)과 세포질 내 공포(cytoplasmic vacuoles), 식포(food vacuoles), 수축포(contractile vacuoles)들을 많이 갖고 있으며, 그 중 리보핵산단백질(ribonucleoprotein)을 포함한 소포는 아마도 자가포식소체(autophagosome)형 공포들일 것이라 하였다.⁹ 이중 막의 자가포식소체가 생성되면 라이소솜(lysosome)과 융합되어 단백질과 세포질 내 구성성분들을 분해하게 된다. 자가 포식(autophagy)은 진핵세포의 진화과정에서 보존되어 내려온 단백질 분해 경로(protein degradation pathway)인데, 이런 단백질 분해 경로는 제한된 영양 상태에 있는 세포의 생존에 반드시 필요하다.¹⁰ 자가포식 작용에 대한 연구들은 아직 초보단계이지만 중요한 제3의 병인기전으로 취급하기도 한다. 포낭형성은 항생제의 약효를 저해시키는 주요 기작으로 이용되는데, 아메바 감염증의 치료에 있

어 포낭형성은 효과적인 아메바증(amoebiasis) 치료를 저해하게 되며, 반대로 포낭형성을 억제하면 아메바 감염증 질환 치료에 더 좋은 치료 효과를 기대 할 수 있다.¹¹

파울러자유아메바에 의한 PAM(원발성 아메바성 수막뇌염)은 아메바에 오염된 물에서 수영 또는 수상 레포츠를 즐길 때 아메바의 영양형이 인체에 감염되어 발생하는 것으로 알려져 있다.¹²⁻¹⁵ Cerva 및 Novak (1968)의^{12, 13} 보고에 따르면 체코슬로바키아에서 16명의 PAM환자가 발생하였는데 같은 수영장에서 감염되었다고 하였다. 최근의 PAM 발병례는 가정의 수도물 공급과도 연관이 있는 것으로 보고 되고 있다.⁹

주요 감염 경로는 인체의 비강(nasal cavity)을 통해서 이루어지는데, 비강에 들어온 아메바의 영양형이 비강 점막(mucosal membrane)을 침입하고 그 후에 후신경(nasal nerve)을 통하여 후엽(olfactory bulb)과 뇌막을 침범하면서 수막뇌염으로 발전시켜 감염 후 7~10내에 사망에 이르게 한다.⁹ PAM을 일으키는 아메바의 주요 감염부위는 중추신경계(central nervous system)이며, 감염 후 증상은 격심한 두통, 식욕부진, 메스꺼움, 구토, 고열(38~40°C), 사지의 기능장애, 뇌막자극의 징후, 그리고 뇌염을 동반한 극심한 증상을 일으킨다. PAM은 진행 정도가 매우 빠르고 감염부위의 특수성 때문에 진단이 어려워 사망률이 95%이상에 이르고 있으며, 현재까지 적절한 치료와 예방법은 미비한 상태이다.^{1, 4, 16}

자유아메바의 병원성 유발기전(pathogenic mechanisms)은 아직 정확히 밝혀져 있지 않은데, 숙주세포에 아메바의 접착(adhesion)이 일어난 다음 숙주세포사멸을 유도하는 세포병변 효과(cytopathic effect)가 일어난다고 보고되었다.^{17, 18} 파울러자유아메바는 후신경을 통해서 중추신경계로 들어 갈 수 있는데, sucker-like appendage (food-cup과 동일한 구조로 간주함) 또는 amebostome이라는 구조물을 이용한 식세포작용(phagocytosis)과 효소(enzyme) 등을 분비하는 세포용해(cytolysis) 과정에 의해서 신경 조직을 파괴한다.^{6, 7, 9, 19-22} 숙주세포의 fibronectin을 통해 파울러자유아메바가 부착하는데, integrin-like protein 및 protein kinase C가 관여 한다는 것이 보고 되었다.²³ 세포용해에 관여하는 병인 요소(virulence factor)로써는 phospholipases,²⁴⁻²⁶ neuraminidases,²⁷ pore forming enzymes,²⁸⁻³⁰ protease^{31, 32} 등이 보고 되고 있다. 한편 Fritzing 등 (2006)은 보체(complement)의 막공격복합체

(membrane attack complex) 및 여러 가지 세균의 독소에 의한 pore-forming protein의 공격으로부터 아메바의 막을 보호하는 CD59-like protein을 클로닝하였다. 그 외의 여러 보고된 논문들을 정리하면 파울러자유아메바의 병인기전으로는 다음과 같은 가설이 가능하다(Fig. 2).

첫번째 병인기전은 접촉성 병인기전(contact-dependent pathogenic mechanism)으로 아메바 세포질의 분출 형태인 food-cup 구조체나 amoebostome 구조체들을 형성하여 표적세포에 부착하여 세포파괴를 유발하는 과정이다(Fig. 2A). 두번째 병인 기전은 비접촉성 병인기전(contact-independent pathogenic mechanism)으로 수용성(soluble) 용해물질(cytolytic factor)들을 분비하여 표적세포를 파괴하는 과정이다(Fig. 2B). 마지막 세번째는 엄격하게 말해 표적세포에 대한 병인기전은 아니지만 아메바의 생존에 제 3의 중요한 기전으로 알려지고 있는 자가포식(autophagy) 과정이다(Fig. 2C).

최근에는 분자생물학적 기술들이 발전하면서 아메바의 병

인 기능을 담당하는 유전자들의 클로닝이 가능하게 되었는데, Fig. 2에서 보듯이 본 연구자 등에 의해 파울러자유아메바로부터는 *nfa1*, *hsp70* 및 *actin* 유전자 등이 클로닝되어 병원성과의 연관성 등 생물학적 특성들이 밝혀졌다.^{22, 33, 34} 본 논문에서는 파울러자유아메바의 첫번째 병인기전인 접촉성 병인기전에 관여하는 유전자로 보고된 *nfa1* 유전자(*Naegleria fowleri*로 부터 첫 번째로 클로닝되어 학명의 첫 글자들을 따서 명명됨)에 대해 고찰하고자 한다.

본 론

Shin 등³³은 *N. fowleri*의 cDNA library를 구축하고 *N. fowleri*에 대한 감염혈청 및 면역혈청을 생산하였으며, 그것들을 이용하여 immunoscreening을 통해 새로운 유전자를 클로닝하였는데(SEREX Method, serum reaction method라 불리움), *N. fowleri*의 위족(pseudopodia) 특

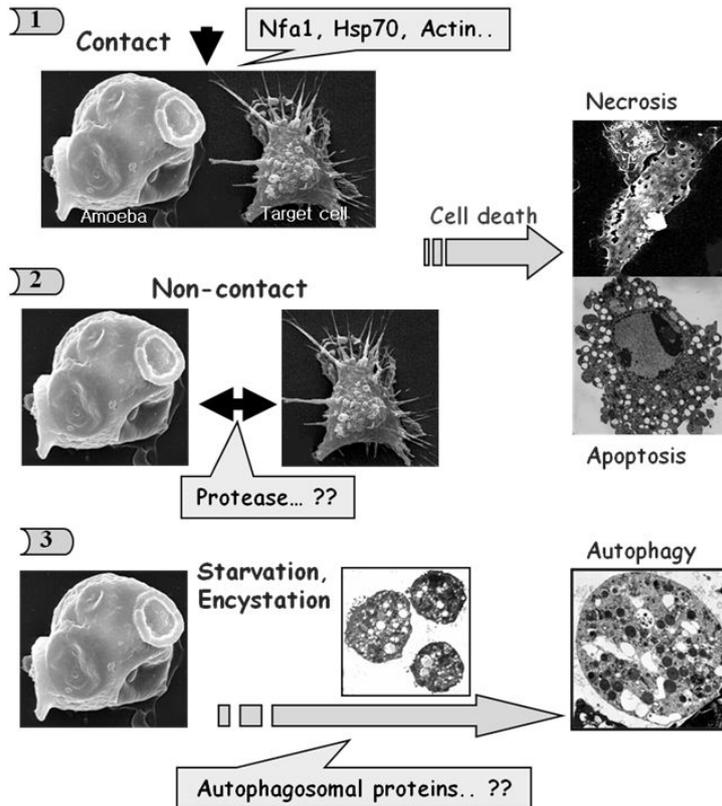


Fig. 2. Three hypothetical mechanisms for *Naegleria fowleri* pathogenesis. (A) Contact-dependent mechanism. (B) Contact-independent mechanism. (C) Autophagy mechanism.

히, food-cups에 특이적으로 발현하는 것을 확인하여 *nfa1* 유전자로 명명하였다.

1. 분자생물학적 특성

새로이 클로닝된 *nfa1* 유전자의 분자생물학적 특성 (molecular and biological characterization)을 알아보고자 염기서열 분석(sequencing data), 기존의 유사 유전자들과의 상동성 비교(homology search) 및 재조합 단백질 (recombinant protein; rNfa1 protein)을 생산하였다.

1) *nfa1* 유전자의 염기서열 분석

파울러자아메바로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자는 atg를 시작코돈(start codon)으로, taa를 종료코돈(stop codon)으로 이용하는 120개의 아미노산(360bp의 DNA 염기서열)을 갖고 있었다.³³ 또한, 발현 벡터(expression vector)인 TOPO 벡터에 *nfa1* 유전자를 클로닝하고 *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 얻은 재조합 단백질(recombinant protein; rNfa1 protein)을 생산하는 시스템을 갖추었다.

2) 상동성 비교

파울러자아메바의 *nfa1* 유전자의 DNA 염기서열을 GeneBank 에 등록(Accession number AF230370) 한 후 기존에 클로닝된 유전자들로 DNA 염기서열의 상동성을 비교한 결과, 여러 생물체의 myohemerythrin 유전자들과 26~43%의 상동성을 갖고 있었다.³³ Myohemerythrin은 O₂ 운반 단백질로 알려져 있는데, Nfa1 단백질이 myohemerythrin 단백질과 높은 상동성을 보인 것은 아니지만, *nfa1* 유전자가 아메바의 생존에 중요한 역할을 담당할 것이라는 것을 그 당시 제시하였다.

3) Nfa1재조합 단백질

클로닝된 *nfa1* 유전자를 발현 벡터인 TOPO 벡터에 클로닝하고, *E. coli* 발현 시스템을 이용하여 얻은 재조합 단백질 (rNfa1 protein)은 13.1 kDa의 분자량을 갖고 있었다(순수 정제에 유용하기 위해 Tag 단백질을 붙인 Tag-fusion단백질은 17.1 kDa 임) (Fig. 3A).

2. 면역세포학적 특성

파울러자아메바로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자의 면역세포학적 특성(immunocytological characters)을 알아보고

자 항-Nfa1항체(anti-Nfa1 antibody)를 생산하였으며, 면역세포조직화학적 실험(immunocytochemistry)을 시행하였다.

1) 항-Nfa1항체 생산

클로닝된 *nfa1* 유전자를 발현하여 얻은 재조합 단백질 (rNfa1 protein)을 마우스의 복강 내로 1차 접종에서는 rNfa1 50 mg과 complete adjuvant를 1:1(v/v)로 섞어서 주입하였으며, 3주 간격으로 2, 3차에서는 rNfa1 25 mg과 incomplete adjuvant를 1:1 (v/v)로 섞어서 주입하였고, 3주후 마지막 4차에서는 rNfa1 25 mg과 생리식염수를 1:1 (v/v)로 섞어서 주입하였다. 3차 주입이 끝난 후 마우스의 혈액을 채취하여 항체의 형성을 확인한 뒤 항-Nfa1 다클론항체(polyclonal antibody)로 사용하였다.^{20, 33} Nfa1 단백질에 대한 단클론항

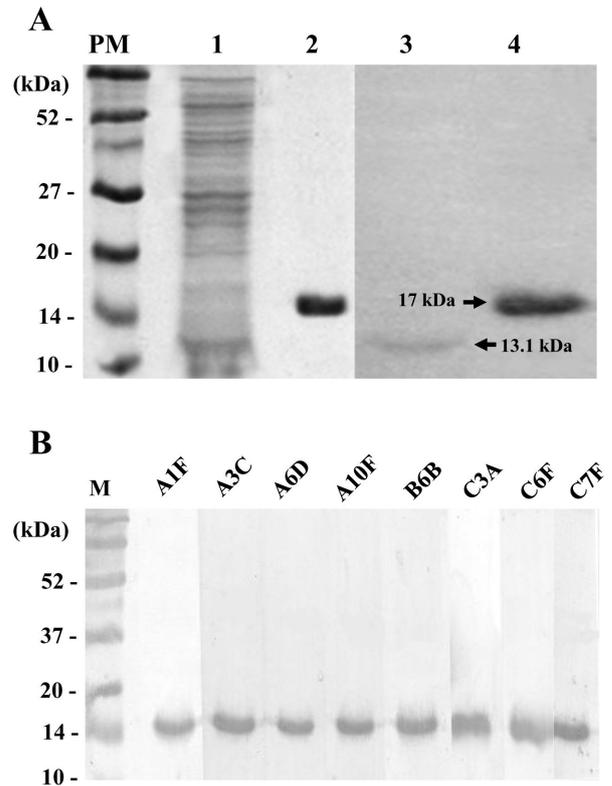


Fig. 3. SDS-PAGE and western blotting results. A) Lane 1 and 2 show a *N. fowleri* lysate and a recombinant His-tag fusion Nfa1 protein. Lane 3 and 4 show reacting bands by western blotting using an anti-Nfa1 polyclonal antibody. B) All lanes show band patterns of recombinant His-tag fusion Nfa1 proteins with anti-Nfa1 monoclonal antibody produced from various hybridoma clones. PM, prestained marker.

체 (monoclonal antibody)의 생산은 세포융합(cell fusion) 기술인 hybridoma technique을 이용하였으며, 생산된 다클론항체와 단클론항체 모두 13.1 kDa의 항원대에 반응을 보였다(Fig. 3B).^{20, 21}

2) 면역세포조직화학적 특성

파울러자유아메바로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자의 항원성 정도(antigenicity) 및 세포 내 분포 위치(cellular localization)를 알아 보고자 anti-Nfa1 다클론항체와 peroxidase를 발색효소로 사용한 immunolocalization 실험결과,³³ 비병원성인 그루버자유아메바(*Naegleria gruberi*)의 영양형과는 전혀 반응하지 않았으나 파울러자유아메바의 영양형과는 잘 반응하여 종-특이성(species-specific)을 보여주었다. 한편 *in vivo* 실험으로 마우스에 파울러자유아메바를 감염시켜 얻은 실험적 PAM이 발생된 마우스의 뇌조직에서 보면 anti-Nfa1 항체는 파울러자유아메바의 영양형에 잘 반응되어 차후 진단적 항체로써의 이용가치를 보여주었다.³⁵ TEM 전자현미경을 사용한 관찰에서 보면,³⁵ Nfa1 단백질은 아메바의 위족과 식포(food cup) 주위에 주로 분포하는 단백질로 위족활동과 연관이 있는 것으로 보고 하였다. 공초점 현미경(confocal microscope)을 이용한 관찰에서 보면,²⁰ Nfa1 단백질은 아메바의 위족 특히, 왕성한 식세포작용(phagocytosis)과 연관이 있는 food-cup에 잘 발현되고 있었으며, 표적세포가 있을 때 특히 food-cup에 잘 발현되는 것으로 보아 파울러자유아메바의 병원성과의 연관성을 보여주었다.

3. 병원 유전자로써의 특성

파울러자유아메바로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자가 아메바의 병원성 어떤 연관성이 있는지를 알아보고자 *in vitro* 세포독성(cytotoxicity) 실험, 유전자 복제감염(gene transfection) 실험 및 유전자 발현억제(gene knock-down) 실험을 시행하였다.

1) 항-Nfa1항체와 *in vitro* 세포독성

파울러자유아메바의 영양형(trophozoite)은 표적세포들 즉, CHO 세포(Chinese hamster ovary cells), 대식세포(macrophage) 및 신경소교세포(microglial cell)들을 강력하게 파괴시킴으로써 높은 세포독성을 갖고 있다.^{20, 21, 35-38} 이러한 *in vitro* 세포독성 실험에 있어서 항-Nfa1 다클론항체 또는 단클론항체를 공동배양시스템(coculture system, 같은 배양기 용기 내에 아메바의 영양형들과 표적세포들을 혼합하여 배양하는 것)에 투여하면, 파울러자유아메바 영양형들의 표적세포들에 대한 세포독성은 감소된다.^{20, 21, 36} 전자현미경 관찰(TEM, SEM)을 통한 세포독성 실험에서 보면,³⁸ 공동배양시스템에 항-Nfa1 항체를 처리했을 때 아메바 영양형들의 모양이 약간 움추러 들어 표적세포에의 부착능력이 떨어짐이 관찰되었다.

2) 형질전환(transgenic) 아메바

클로닝된 *nfa1* 유전자의 병원성과 관련유무를 확인하기 위하여, 비병원성 자유생활아메바인 그루버자유아메바(*N. gruberi*)로 *nfa1* 유전자를 transfection 하는 유전자 복제감

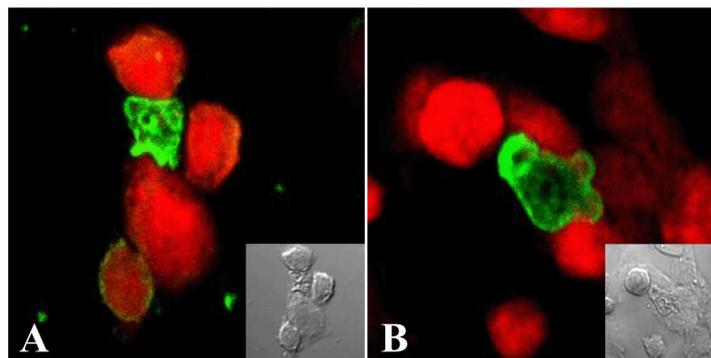


Fig. 4. Confocal microscopic findings of the Nfa1 protein in *Naegleria fowleri* trophozoites cocultured with CHO cells (red color) for 3 hr (A) and 6 hr (B). Strong fluorescent signals were shown in the food-cups of the *N. fowleri* trophozoite (×400).

염(gene transfection) 시험을 수행한 결과, *nfa1* 유전자를 갖고 있는 transfection vector가 그루버자유아메바의 세포질로 잘 transfection 됐음을 형광현미경으로 그리고 *nfa1* 유전자가 염색체내로 들어간 것을 PCR을 통해 확인하였으며, 형질전환된 그루버자유아메바(transgenic *N. gruberi*)는 표적세포에 대한 세포독성이 약간 증가하였다.^{39, 40}

3) 유전자 발현억제(gene knock-down)

파울러자유아메바의 *nfa1* 유전자 발현이 아메바자체에서 억제되었을 때 아메바의 세포독성에 어떤 변화가 있는지를 알아보려고, double-stranded⁴¹ 및 antisense RNA³⁷와 RNAi (RNA interference) 간섭을 기초로 한 siRNA를 이용하여 파울러자유아메바의 영양형(*N. fowleri* trophozoites) 내로 주입시켰다. 실험 결과 *nfa1* 유전자의 발현이 knockdown 된 것이 관찰되었으며, 표적세포에 대한 세포독성을 확인한 결과 *nfa1* 유전자의 발현이 억제된 파울러자유아메바의 세포독성이 저하됨이 관찰되어, 클로닝된 *nfa1* 유전자가 아메바의 병원성과 관련이 있음을 보고하였다.

4. 숙주의 방어면역

파울러자유아메바로부터 클로닝된 *nfa1* 유전자가 아메바의 food-cups을 이용한 식세포작용에 연관되어 있으며 그로 인해 아메바의 병원성에 중요한 역할을 담당하고 있음이 관찰되어, 파울러자유아메바 감염 시 숙주의 방어면역(protective immunity)을 보기 위해 재조합 rNfa1 단백질을 마우스에 면역시킨 후 실험적 PAM을 유발시켜 마우스의 사망률을 관찰함으로써 숙주로서의 마우스의 방어면역을 알아보려고 하였다(Fig. 5).

1) 면역글로블린 항체(immunoglobulin antibody)

재조합 rNfa1 단백질을 마우스의 복강으로 주입하여 면역시킨 후, 면역여부를 알아보기 위해 마우스의 혈청에서 면역

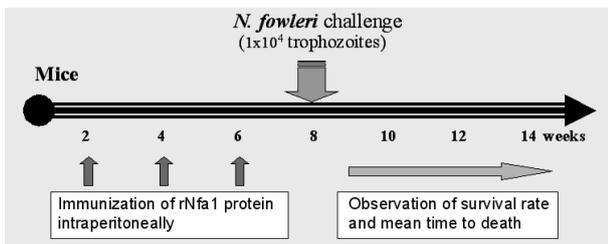


Fig. 5. Flow-chart of immunization and infection schedule.

글로블(immunoglobulin) 항체를 측정하였는데, 정상적인 마우스의 혈청보다 재조합 rNfa1 단백질로 면역된 마우스의 혈청에서 IgG (immunoglobulin G)의 수치가 높아져 있음을 알 수 있었다(Fig. 6).

2) 실험적 수막뇌염(experimental PAM)에 의한 마우스의 평균사망일

파울러자유아메바의 rNfa1 단백질을 마우스에 면역시킨 후 실험적 PAM을 유발하여 마우스들의 사망일을 관찰하였는데, 건강한 마우스 그룹에서는 평균 사망일이 15.0일이었고, 아메바 재조합 rNfa1 단백질만으로 면역시킨 마우스 그룹에선 평균 사망일이 25.0일 이었으며, 면역을 돕기 위해 rNfa1 단백질을 adjuvant를 같이 혼합하여 면역시킨 마우스 그룹에서는 평균 사망일이 24.4일이었다(Fig. 7). 따라서 파울러자유아메바의 감염에 대한 Nfa1 단백질의 전처리(면역)가 숙주에서의 항체 형성을 유도하여 마우스의 평균 사망일을 늘린 결과를 보여주어 숙주의 방어면역이 유도 되었음을 알 수 있었다.

결론

파울러자유아메바(*N. fowleri*)는 인체, 마우스 및 다른 실험동물들에서 원발성 아메바성 수막뇌염(PAM)을 유발한다. 자유아메바의 병원성 유발기전은 아직 정확히 밝혀지지 않았지만, 숙주세포에 아메바의 접촉(adhesion)이 중요하다고

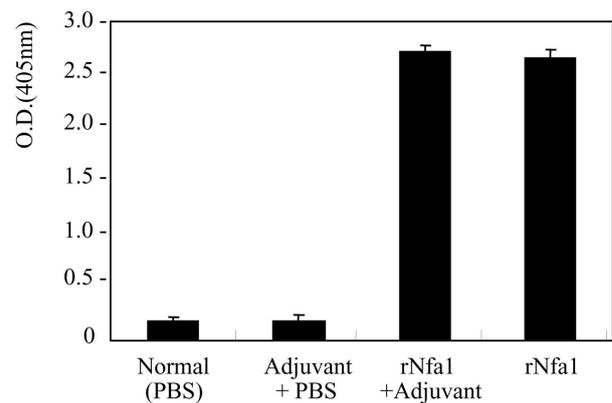


Fig. 6. Serum IgG level in mice immunized with the rNfa1 protein. rNfa1, recombinant Nfa1 protein; PBS, phosphate buffered saline.

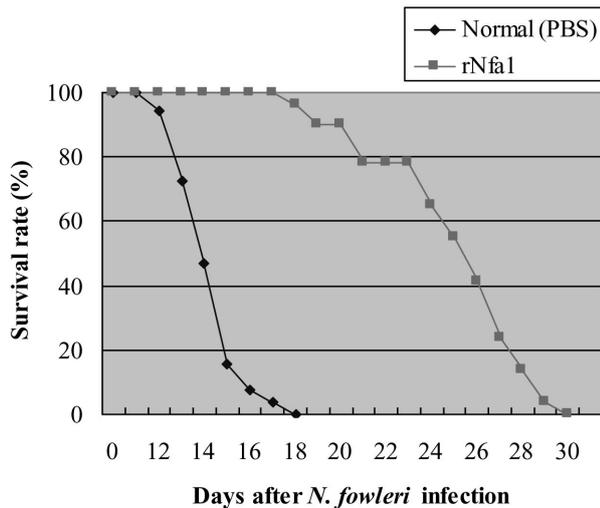


Fig. 7. Survival rate in mice infected intraperitoneally with *N. fowleri* trophozoites post immunization with the rNfa1 protein.

보고되었다. 파울러자유아메바로부터 처음 클로닝된 *nfa1* 유전자는 파울러자유아메바의 cDNA library로 부터 파울러자유아메바에 대한 감염혈청 및 면역혈청을 이용하여 immunoscreening을 통해 클로닝된 새로운 유전자이다. 클로닝된 *nfa1* 유전자는 360 bp의 DNA 염기서열을 갖고 있으며 13.1 kDa의 분자량을 갖는 단백질을 발현하고 있다. Immunocytochemistry 실험결과, 파울러자유아메바의 위족(pseudopodia) 특히, food-cups에 특이적으로 발현하여 아메바의 접촉성 병인기전과 연관성을 보였으며, 항-Nfa1 항체의 처리는 표적세포들에 대한 파울러자유아메바의 세포독성을 감소시켰다. 비병원성인 그루버자유아메바(*N. gruberi*)에 *nfa1* 유전자를 복제감염(transfection) 시키면 형질전환된 그루버자유아메바는 높아진 세포독성을 보였으며, siRNA 등으로 파울러자유아메바 자체에서 *nfa1* 유전자 발현을 억제시키면 파울러자유아메바의 세포독성은 감소하였다. 재조합 rNfa1 단백질을 마우스의 복강 내로 여러 번 주입하면 파울러자유아메바에 대한 면역항체가 잘 생성되며, 면역된 마우스에 실험적으로 파울러자유아메바의 영양형들을 감염시켜 PAM을 유도하면 재조합 rNfa1 단백질로 면역된 마우스들은 평균 생존기간이 연장되었다. 종합하여 보면, 클로닝된 *nfa1* 유전자는 파울러자유아메바의 접촉성 병인기전에 중추적인 역할을 담당하며 더 나아가서는 아메바의 병인 규명과 PAM의 진단, 치료 및 예방에 매우 유용하고 중요한 유전자이다.

References

1. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol 2007;50:1-26.
2. De Jonckheere JF. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. Protist 2004;155:89-103.
3. John DT. Primary amebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. Annu Rev Microbiol 1982; 36:101-23.
4. Ma P, Visvesvara GS, Martinez AJ, Theodore FH, Daggett PM, Sawyer TK. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. Rev Infect Dis 1990;12:490-513.
5. Marciano-Cabral F, Cabral GA. The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. FEMS Immunol Med Microbiol 2007;51:243-59.
6. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 2004;34:1001-27.
7. Shin HJ, Im KI. Pathogenic free-living amoebae in Korea. Korean J Parasitol 2004;42:93-119.
8. Page FC. Rosculus ithacus Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellulidae) and the amphizoic tendency in amoebae. Acta Protozoologica 1974;13:143-55.
9. Marciano-Cabral F. Biology of *Naegleria* spp. Microbiol Rev 1988;52:114-33.
10. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Dev Cell 2004;6:463-77.
11. Moon EK, Chung DI, Hong YC, Kong HH. Autophagy protein 8 mediating autophagosome in encysting *Acanthamoeba*. Mol Biochem Parasitol 2009;168:43-8.
12. Cerva L, Novak K. Epidemic occurrence of amebic meningoencephalitis. Cas Lek Cesk 1968;107:873-6.
13. Cerva L, Novak K. Amoebic meningoencephalitis: 16

- fatalities. *Science* 1968;160:92.
14. Cerva L, Novak K. Amebic meningoencephalitis in Czechoslovakia. (Preliminary report on the first 16 detected cases). *Cesk Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1968; 17:65-6.
 15. Craun GF, Calderon RL, Craun MF. Outbreaks associated with recreational water in the United States. *Int J Environ Health Res* 2005;15:243-62.
 16. Barnett ND, Kaplan AM, Hopkin RJ, Saubolle MA, Rudinsky MF. Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri*. clinical review. *Pediatr Neurol* 1996;15:230-4.
 17. De Jonckheere JF. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl Environ Microbiol* 1980;39:681-5.
 18. van Klink F, Alizadeh H, Stewart GL, Pidherney MS, Silvany RE, He Y, McCulley JP, Niederkorn JY. Characterization and pathogenic potential of a soil isolate and an ocular isolate of *Acanthamoeba castellanii* in relation to *Acanthamoeba* keratitis. *Curr Eye Res* 1992;11:1207-20.
 19. Marciano-Cabral F, Zoghby KL, Bradley SG. Cytopathic action of *Naegleria fowleri* amoebae on rat neuroblastoma target cells. *J Protozool* 1990;37:138-44.
 20. Kang SY, Song KJ, Jeong SR, Kim JH, Park S, Kim K, Kwon MH, Shin HJ. Role of the Nfa1 protein in pathogenic *Naegleria fowleri* cocultured with CHO target cells. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:873-6.
 21. Lee YJ, Kim JH, Jeong SR, Song KJ, Kim K, Park S, Park MS, Shin HJ. Production of Nfa1-specific monoclonal antibodies that influences the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* trophozoites on microglial cells. *Parasitol Res* 2007;101:1191-6.
 22. Sohn HJ, Kim JH, Shin MH, Song KJ, Shin HJ. The *Nf-actin* gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol Res* 2010;106:917-24.
 23. Han KL, Lee HJ, Shin MH, Shin HJ, Im KI, Park SJ. The involvement of an integrin-like protein and protein kinase C in amoebic adhesion to fibronectin and amoebic cytotoxicity. *Parasitol Res* 2004;94:53-60.
 24. Cursons RT, Brown TJ. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J Clin Pathol* 1978;31:1-11.
 25. Cursons RT, Brown TJ, Keys EA. Virulence of pathogenic free-living amoebae. *J Parasitol* 1978;64: 744-5.
 26. Barbour SE, Marciano-Cabral F. *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *Biochim Biophys Acta* 2001;1530:123-33.
 27. Eisen D, Franson RC. Acid-active neuraminidases in the growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and in sonicates of rabbit alveolar macrophages. *Biochim Biophys Acta* 1987;924: 369-72.
 28. Young JD, Lowrey DM. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 1989;264:1077-83.
 29. Herbst R, Ott C, Jacobs T, Marti T, Marciano-Cabral F, Leippe M. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoon *Naegleria fowleri*. *J Biol Chem* 2002; 277:22353-60.
 30. Herbst R, Marciano-Cabral F, Leippe M. Antimicrobial and pore-forming peptides of free-living and potentially highly pathogenic *Naegleria fowleri* are released from the same precursor molecule. *J Biol Chem* 2004; 279:25955-8.
 31. Mat Amin N, Najmiah Mustafa N, Md Arshad N. Detection of *Hartmannella* sp., a free-living amoeba from Sungai Setiu, Terengganu. *Trop Biomed* 2004;21:77-80.
 32. Kim JH, Yang AH, Sohn HJ, Kim D, Song KJ, Shin HJ. Immunodominant antigens in *Naegleria fowleri* excretory-secretory proteins were potential pathogenic factors. *Parasitol Res* 2009;105:1675-81.
 33. Shin HJ, Cho MS, Jung SU, Kim HI, Park S, Kim HJ, Im KI. Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *J Eukaryot Microbiol* 2001;48:713-7.
 34. Song KJ, Song KH, Na BK, Kim JH, Kwon D, Park S,

- Pak JH, Im KI, Shin HJ. Molecular cloning and characterization of a cytosolic heat shock protein 70 from *Naegleria fowleri*. Parasitol Res 2007;100:1083-9.
35. Cho MS, Jung SY, Park S, Kim KH, Kim HI, Sohn S, Kim HJ, Im KI, Shin HJ. Immunological characterizations of a cloned 13.1-kilodalton protein from pathogenic *Naegleria fowleri*. Clin Diagn Lab Immunol 2003; 10:954-9.
36. Jeong SR, Kang SY, Lee SC, Song KJ, Im KI, Shin HJ. Decreasing effect of an anti-*Nfa1* polyclonal antibody on the in vitro cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. Korean J Parasitol 2004;42:35-40.
37. Jung SY, Kim JH, Song KJ, Lee YJ, Kwon MH, Kim K, Park S, Im KI, Shin HJ. Gene silencing of *Nfa1* affects the in vitro cytotoxicity of *Naegleria fowleri* in murine macrophages. Mol Biochem Parasitol 2009;165:87-93.
38. Oh YH, Jeong SR, Kim JH, Song KJ, Kim K, Park S, Sohn S, Shin HJ. Cytopathic changes and pro-inflammatory cytokines induced by *Naegleria fowleri* trophozoites in rat microglial cells and protective effects of an anti-*Nfa1* antibody. Parasite Immunol 2005;27:453-9.
39. Jeong SR, Lee SC, Song KJ, Park S, Kim K, Kwon MH, Im KI, Shin HJ. Expression of the *Nfa1* gene cloned from pathogenic *Naegleria fowleri* in nonpathogenic *N. gruberi* enhances cytotoxicity against CHO target cells in vitro. Infect Immun 2005;73:4098-105.
40. Song KJ, Jeong SR, Park S, Kim K, Kwon MH, Im KI, Pak JH, Shin HJ. *Naegleria fowleri*: functional expression of the *Nfa1* protein in transfected *Naegleria gruberi* by promoter modification. Exp Parasitol 2006;112:115-20.
41. Jung SY, Kim JH, Lee YJ, Song KJ, Kim K, Park S, Im KI, Shin HJ. *Naegleria fowleri*: *Nfa1* gene knock-down by double-stranded RNAs. Exp Parasitol 2008;118: 208-13.