creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000234428

2007년 8월
박사학위논문

위장관의 유전자 손상복구 인자에 대한 연구

-노화에 따른 DNA mismatch repair 단백질의 변화-

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 기 훈

위장관의 유전자 손상복구 인자에 대한 연구

-노화에 따른 DNA mismatch repair 단백질의 변화-

DNA repair factors in gastrointestinal system
-Mismatch repair proteins with age-

2007년 8 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 기 훈

위장관의 유전자 손상복구 인자에 대한 연구

-노화에 따른 DNA mismatch repair 단백질의 변화-

지 도 교 수 장 인 엽

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 4 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 기 훈

김 기 훈의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	유 호진	인
위 원	조선대학교	교수	임 용	인
위 원	조선대학교	교수	전 제열	인
위 원	서남대학교	교수	윤 상필	인
위 원	조선대학교	교수	장 인엽	인

2007년 6 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

위장관의 유전자 손상복구 인자에 대한 연구

-노화에 따른 DNA mismatch repair 단백질의 변화-

김 기 훈

목 차

도목차 ····· 1

영문초록 ····· 2

서 론 ····· 4

재료 및 방법 ····· 8

결 과 ····· 10

고 찰 ····· 12

결 론 ····· 16

사진부도설명 ····· 17

사진부도 ····· 18

참고문헌 ····· 20

도 목 차

Fig.1 ····· 18

Fig.2 ····· 19

영문초록

DNA repair factors in gastrointestinal system: Mismatch repair proteins with age

Kee-Hune Kim
Advisor : IN-Youb Chang, MD.Ph.D.
Department of Medicine,
Graduate School of Chosun University

DNA mismatch repair (MMR), as a member of DNA damage repair system, e mainteins genomic stability and suppresses tumorigenesis via the function in repair of post-replicative DNA errors. Chronic oxidative stress is generally believed to be a major etiologic factor in the aging process. Not only influences cellular signaling and oxidation of cellular proteins and lipids, but reactive oxygen species (ROS) have powerful effect, multiple damages, on both nuclear and mitochondrial genomes. This serious celluar injuries are mostly repaired via maily DNA base excision repair pathway and MMR. It is relatively well-known that 8-oxoG-DNA glycosylase (OGG1) and AP-endonuclease (APE1) in the initial steps of DNA base excision

repair, but not in MMR. So in order to ascertain the physiological role of the MMR in aging, we have investigated the changes of MMR proteins, Msh2 and Msh6, in postnatal aging colon of rat. We found that the amount of protein level of MMR was decreased with age in colon. This data is also confirmed that the immunostaining of mucosal epithelium and intestinal gland was weakened in aged rat colon by the immunohostochemical approach. Therefore, we propose that dysfunctional MMR with age may be associated with the increasing DNA damage and tumorigenesis,
Keywords : DNA mismatch repair, DNA damage, tumorigenesis, aging

I. 서 론

DNA 잘못 짝짓기(DNA Mismatch)는 복제 이상의 결과로 발생하는데 특히 dinucleotide들의 반복을 포함한 microsatellites 이상으로 대부분 발생한다. 따라서 DNA 잘못 짝짓기 수복(Mismatche repair ; MMR) 결함을 알 수 있는 중요한 지표는 유전자 불안정성(microsatellite instability; MSI)이다. 대장균에서는 잘못 짝짓기를 인식하고, 인식된 잘못 짝지어진 염기를 포함하는 DNA절편을 퇴화시키는데 관여하는 단백질들은 MutH, MutS, MutL 등 3개이다. 그외 몇몇 E. coli proteins 이 MMR이 완전하게 이루어지는데 필요하다. 한편 포유동물은 MutH 와MutL에 대한 유사체(homologues)는 있으나, MutS에 해당하는 것은 존재하지 않는다(Gu 등, 2002). 유전성 비폴립형 대장암(Hereditary non-polyposis colon cancer)은 MMR 유전자자가 돌연변이를 일으켜 발병하게 되는데, 가장 흔한 유전자는 hMSH2, MSH6, hMLH1,hPMS1/2 들이다. 또한 10-12% 의 산발적으로 발생하는 대장암에서 MMR 결함이 발견되지만, 이들 결함의 중요성에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않은 실정이다 (Jiricny와Nystrom-Lahti, 2000; Cald□s 등, 2004; Lawes 등, 2005). 하지만 MMR이 8-oxoG:A mismatches 의 수복에 관여한다는 여러 주장들(Ni 등, 1999; Gu 등, 2002; Mazurek 등, 2002)과, 또 이를 뒷받침하는 최근 보고(Colussi 등, 2002)에 의하면 msh2-/- 생쥐배아 섬유아세포에서 평상시 DNA 8-oxoG 와 H2O2 에 의해 유발되는 DNA 8-oxoG 수준이 모두 증가된다. 돌연변이 빈도, 돌연변이 형태에 대한 언급은 없었지만, 복제가 이루어진 후에 발생하는 A(아데닌)에 상응하는 8-oxoG(구아닌)을 제거하는 데 MMR이 관여할 것으로 예상하였다. 이러한 추측은 8-oxoG:C 보다는 8-oxoG이 포함된 잘못 짝지어진 DNA사슬(mismatched duplexes)에 hMutSα가 우선적으로 결합한다는 사실에 의해 뒷받침되고 있다(Mazurek 등, 2002).

hMSH2/hMSH6 이량체(heterodimer)인 hMutSα에서 hMYH와 hHSH6가 직접적으로 상호작용한다는 것이 최근 밝혀짐에 따라 MMR 단백질이 8-oxoG에 잘못 대응된 A의 제거에 관련된 것으로 추측되고 있다(Gu 등, 2002). 또한 PCNA가 hMYH뿐만 아니라 MMR 단백질과도 상호작용하여, 8-oxoG:A수복에 조정 역할을 수행하는 것으로 추측되고 있다(Gu 등, 1998; Gu 등, 2002). 또한 PCNA가 hMYH뿐만 아니라 MMR 단백질과도 상호작용하여, 8-oxoG:A수복에 조정 역할을 수행하는 것으로 추측되고 있다(Gu 등, 2002).

노화는 포유동물 뿐만 아니라 하등 진핵생물에 이르기까지 전반적으로 나타나는 진행적이고 공통적인 과정이다. 노화과정은 세포기능과 세포대사에 걸쳐 나타나는 복잡한 변화이지만 그 발생기전은 잘 알려져 있지 않다. 노화에 있어서 자유 라디칼 이론(free radical theory)에 따르면, 노화는 활성산소(reactive oxygen species; ROS)에 의해 생성되는 낮은 수준의 지속적인 산화적 손상(chronic oxidative stress)의 일종이다(Beckman과 Ames, 1998; Harman, 1956; Papaconstantinou, 1994; Sohal 등. 2002; Stadtman, 2002).

ROS는 2가지 주요 경로를 통하여 생리학적 효과를 유발시킨다. 첫째, 산화성 손상에 의해 세포항상성을 유지시키는데 관여하는 복합적 세포 전달 경로(multiple cellular signaling pathways)들이 활성화된다(Finkel과 Holbrook, 2000; Suh, 2002). 예를 들면 mitogen-activated protein kinase (MAPK)경로의 특정 p38과 SAPK/JNK 신호 전달 단백질들이 산화성 손상에 의해 활성화된다 (Finkel과 Holbrook, 2000; Hsieh 등, 2003; Papaconstantinou, 1994). Finkel과 Holbrook(2000)은 노화에 따른 이들 kinases 활성 및 노화관련질환과 연계성의 변화에 대해 보고하였다.

ROS의 그외 생물학적 효과는 핵산, 단백질, 지질 을 포함한 거의 모든 세포 구성 요소들의 반응성에 좌우된다. 산화성 단백질, 특히, protein carbonyls, 이 노화에 비례하여 증가한다고 알려지고 있다(Beal, 2002). 이와 유사하게

ROS는 불포화지방산을 산화시켜 분해시키고, 4-hydroxynonenal과 malondialdehyde를 생성시킨다(Traverso 등, 2003). 이들 지방산 분절들(fatty acid fragments)은 노화 동물들에게 유의성 있게 증가한다(Iqbal 등, 1999). 단백질과 지방산의 산화가 발생하지만, ROS에 따른 가장 치명적인 결과는 유전자 독성(genotoxicity)이다. ROS가 DNA 염기가 다양한 산화성 손상을 일으키고, 염기의 소실 및 DNA나선구조의 파괴 (base loss and DNA strand breaks)를 초래하게 된다(Mitra 등. 1997; Mitra, 2001; Mitra 등. 2002). 8-oxoguanine (8-oxoG)과 5-hydroxyuracil (5-HU)과 같은 산화된 염기와 무염기 부위(abasic (AP, apurinic/apyrimidinic) sites)들은 실질적인 돌연유발성질을 가지게 되어, 분열세포들에서 돌연변이를 초래하게 된다. 최종 분화가 끝나고 더 이상 분열하지 않는 상태의 세포에서도 역시 돌연변이 유발 염기병변과 잘못 유도된 AP sites는 truncated polypeptides을 포함한 여러 비기능성 돌연변이 단백질들을 생성시키게 된다. 조절 요소(regulatory elements)의 돌연변이와 DNA 나선구조의 파괴에 의해서 mRNA생성이 공격받게 되어, 야생형 단백질(wild-type proteins)들의 이상이 초래된다. 따라서 노화-의존성 DNA손상 축적은 세포생리 및 세포대사에 영구적인 영향을 미치게 된다(Suh, 2002).

ROS는 모든 생명체에서 지속적으로 생성된다. DNA손상 축적이 계속 증가하면 치명적이기 때문에, ROS에 유도된 것들을 포함한 모든 손상들은 수복되어 그런 치명성을 가하지 못하게 예방이 이루어진다. 유핵 및 진핵생물 모두에서 복합적 DNA 수복 경로는 산화성 염기, 단일DNA나선 손상, AP sites 등은 DNA염기절제 수복경로(DNA base excision repair (BER) pathway)를 통해 복구된다(Mitra 등, 1997; Mitra, 2001; Mitra 등, 2002). 어떤 손상의 복구는 또한 뉴크레오티드 절제수복경로에 관여하는 단백질들(proteins of the nucleotide excision repair(NER) pathway)의 작용에 의해 이루어진다(Sunesen 등, 2002). 하지만 노화에 따른 유전자 손상 중 DNA 잘못 짝짓기에 대한 손상 및 복구에 대한 정확한 보고는 거의

없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 노화에 따른 흰쥐 큰창자 에서 DNA 잘못 짝짓기 복구인자의 역할을 알아보고자 MSH2 와 MSH6의 변화를 조사하였다.

II. 실험재료 및 방법

동물조직

본 실험에 사용된 조직은 출생 1일(P1), 1주(P1w), 4주(P4w), 10주(P10w), 28주(P28w), 50주(P50w), 100주(P100w), 120주(P120w)된 흰쥐 큰창자 조직 들을 각각 사용하였다.

면역조직화학염색

(1) 동물조직의 냉동절편제작 및 염색

실험동물을 ether로 깊게 마취시킨 후 paraformaldehyde으로 4℃에서 24시간 고정한 후, 조직을 30% sucrose가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에서 탈수시켜 냉동에 따른 조직손상을 최소화하여 10-15 ㎛ 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. PBS로 수 차례 세척하여 고정액을 제거하고, 0.3% Triton X-100이 함유된 PBS를 실온에서 1시간, 1% bovine serum albumin(BSA)가 함유된 PBS를 실온에서 1시간 각각 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. 제 1항체는 anti-Msh2(1:100 in PBS, BD Bioscience, USA)와 anti-Msh6(Upstate, 1:100 in PBS, BD Bioscience, USA)를 4℃에서 24시간 반응시켰다. PBS로 수 차례 세척한 후 2차 항체인 chicken anti-rabbit IgG-HRP conjugated(Chemicon, USA)을 1:200으로 희석하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 3-3' diaminobezidine(DAB,Sigma, USA)로 발색하였다. 대조군으로는 제 1항체들을 생략하고 2차 항체만 반응시킨 조직을 사용하였다.

Western blotting

신선 큰창자 조직을 드라이아이스와 isopentane이 혼합된 용액에서 급속히 냉각시킨 냉동상태로 보관시켜 다음 실험에 사용하였다. 조직 0.5mg을 300

㎕ 용해 완충액 (lysis buffer; 20mM Hepes, pH 7.4, 2mM EGTA, 50mM-glycerol phosphate, 1% triton X-100, 10% glycerol, 1mM dithiothreitol(DTT), 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 10㎍/ml leupeptin, 10㎍/ml aprotinin, 1mM Na3VO4, and 5mM NaF)으로 30분 동안 0° C에서 용해시킨 후 균질화(Homogenization) 시켰다. Ultra-sonicator를 이용해서 세포를 파괴시켜 원심분리시키고(18.000rpm, 4℃ 15min), 상층액을 재차 원심분리하였다(18,000rpm, 4℃ 10min). 5분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를 Bio-Rad dye-binding microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하였는데, 20㎍의 단백질을 10% SDS polyacrylamide gels로 전기영동 시킨 후 단백질들을 Hybon ECL membranes(Amersham-Phamacia, Biotech)로 옮겨서 염색을 하였다. anti-p53(1:1,000, 4℃, 24h; Santa Cruz biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA)과 anti-γ-H2AX(1:1,000, 4℃, 24h; Upstate, NY, USA)를 1차 항체로 각각 사용하였다. 염색된 단백질을 enhanced chemiluminescence detect system(iNtRON, Biotech., Seoul, Korea)을 이용하여 특정단백질의 발현여부를 확인하였다

III. 결　　과

본 실험에서 DNA 손상반응에서 잘못 짝지어진 DNA염기쌍을 수복시키는 물질인Msh2와 Msh6를 대상으로 출생 직후(P1)부터 노화(P120w)에 이르기까지 큰창자 조직에서 발현 변화를 관찰하였다. DNA 손상수복 단백질인 Msh2와 Msh6의 발현은 출생 직후부터 28주(P28w)까지는 별 변화없이 지속적으로 발현이 유지되었으나, 50주(P50w)이후 감소하기 시작하여 100주(P100w)와 120주(P120w)에서는 매우 감소하였다

1. 출생후 발달(노화)에 따른 큰창자에서 Msh2와 Msh6 발현의 면역조직화학적 변화

A. Msh2발현의 변화

•출생 1일부터 출생 28주

Msh2면역반응은 점막고유층과 참자샘을 비롯한 점막층 전층에서 전반적으로 나타났으나, 창자샘의 바닥부(basal area)와 속공간의 상피층에서 강하게 나타났다(Fig. 1A; arrows). 핵과 세포질 모두에서 나타났으나, 세포질에서 더 강하게 나타났으며, 이러한 반응은 출생 1일부터 28주까지 변화없이 관찰되었다.

•출생 50주부터 출생 120주

역시 핵과 세포질 모두에서 나타났으며, 출생 50주부터 점막고유층에서 발현이 약간 감소되기 시작하였고, 출생100주와 120주에서는 창자샘에서도 확연히 감소하였다(Fig. 1A).

B. Msh6발현의 변화

•출생 1일부터 출생 28주

Msh6면역반응은 Msh2면역반응과 비슷하게 점막고유층과 참자샘을 비롯한 점막층에서 전반적으로 나타났고, 창자샘 바닥부와 속공간 상피층에서 강하

게 나타났다(Fig. 1B; arrows). 역시 핵과 세포질 모두에서 나타났으나 세포질에서 더 강하게 염색되었다.

•출생 50주부터 출생 120주

출생 50주부터 점막 고유층과 창자샘에서 발현이 확실히 감소됨이 관찰되어, 출생100주와 120주에서는 점막 전체에서 확연히 감소하였다(Fig. 1B).

Msh2발현과 차이점은 Msh6발현이 출생 50주부터 두드러지게 감소하기 시작하여, 출생100주와 120주에서는 확연히 감소함이었다.

2.Msh2와 Msh6 단백질 발현의 변화

노화에 따른 단백질 정량(Western blot)을 실시한 결과 출생 10주와 50주의 비교에서는 차이를 보이지 않았으며, 50주와 100주 사이에 감소가 두드러지게 나타났다(Fig.2). 이러한 단백질 정량의 결과는 면역조직화학염색의 결과와 거의 일치하였다. Msh2와 Msh6 단백질의 발현 감소는 약간 차이를 보였는데, Msh2발현 감소에 비해 Msh6 단백질에서 크게 감소하였다.

IV. 고　　찰

본 실험에서 DNA 복제 이상으로 인해 잘못 짝지어진 DNA염기쌍을 수복시키는 물질인Msh2와 Msh6 발현이 큰창자 조직에서 출생 28주까지는 별 변화없이 지속적으로 발현이 유지되었으나, 50주 이후 감소하기 시작하여 100주 이상 노화 상태에서는 매우 감소함을 밝혀내었다. 이는 노화에 따른 세포기능의 저하에 따른 것으로 추정되지만, 이에 따른 MMR의 저하, MSI의 증가, 여러 종양의 발생과 관련이 있는 것으로 사료된다.

ROS의 생성에 의해 DNA손상 축적은 세포에 치명적이기 때문에 이들 손상들을 수복하는 예방시스템이 존재한다. 산화성 염기, 단일DNA나선 손상, AP sites 등은 DNA염기절제수복경로(DNA base excision repair (BER) pathway)를 통해 복구된다(Mitra 등, 1997; Mitra, 2001; Mitra 등, 2002). 이들 중 일부 손상의 복구는 또한 뉴크레오티드 절제수복경로에 관여하는 단백질들(proteins of the nucleotide excision repair(NER) pathway)의 작용에 의해 이루어진다(Sunesen 등, 2002). 이중나선구조 손상(Double-strand breaks: DSBs)는 방사선조사, 항암제 투여 등에 의해 초래되는 심각한 DNA손상 형태로, 단순 DSBs는 세포자멸사로 유도되거나(Rich 등, 2000), 심각한 염색체 변이를 초래하기도 한다(van Gent 등, 2001). DNA 이중가닥손상 복구의 방식은 상동성재조합(homologous recombination: HR)과 비상동성 말단결합(non-homologous end joining: NHEJ)의 2가지 주 경로를 가지고 있다. NHEJ는 염기배열(sequence)의 상동성에 관계없이 끊어진 말단을 재결합시키는 기작인 반면, HR은 손상되지 않은 동종의 DNA모형으로 부터 완전한 정보를 복사하여 정확한 DNA 수복을 수행한다(Khanna와 Jackson, 2001; van Gent 등, 2001). 이외에 심각한 DNA 손상을 초래하는 형태가 복제과정의 이상(replication error)으로 발생되는 A-G 잘못짝짓기(A-G mismatch), T-C 잘못짝짓기(T-C

mismatch) 등이다. 이러한 이상을 복구하는 것이 잘못짝짓기 수복시스템(mismatch repair system)으로 MSH2, MSH6, MLH1, PMS1/2 등이 여기에 해당한다. 이를 통하여 유전자 안정성을 도모하고, 종양발생을 억제한다(Gu 등, 2002; Mazurek 등, 2002). 특히 노화에 따른 수복 능력의 감소로 인한 DNA 손상의 축적은 세포 기능의 이상을 초래하게 되고, 주된 복제후 수복경로(postreplicative correction pathway)에 해당하는 MMR은 microsatellite instability(MSI)를 모니터링 한 결과 노화에 따라 감소한다고 알려지고 있다. 복제 이상으로 노화를 촉진시킨 T- 림프세포에서 배양을 거듭할수록 MSI가 증가되고, MutL이 발현이 감소된다고 보고되었다(Neri 등, 2007). 하지만 아직도 노화에 따른 MMR의 발현변화 및 기능의 변화에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

MMR의 기능저하가 지금까지 알려진 바로는 대장결장암(colorectal cancer)의 발병 및 예후와 관련이 깊다고 것이었는데, 최근 보고들에 의하면 MSI가 과발현(MSI-H)되고 MMR저하되면 난소암의 발병이 증가되고, 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer)에서는 특정 MMR돌연변이 형태에서 환자의 예후 및 치료효과와 관련이 깊은 것으로 보고되고 있다(Geisler 등, 2003; Lanza 등, 2006; Felton 등, 2007; Hsu 등, 2007).

지금까지 MMR의 돌연변이와 관련이 있는 것으로 잘 알려진 유전성 비폴립성 대장직장암은 린치증후군 제1형과 제2형(Lynch syndrome types I and II)으로 또한 알려져 있는데. 제1형은 대장직장암이 있는 경우, 제2형은 자궁속막암 또는 위암 등의 대장 이외의 암과 관련된 경우를 일컫는다. 최근 MMR유전자의 두 대립유전자 모두 돌연변이를 초래하여(biallelic mutations), 비교적 젊은 20-40세에 뇌종양, 혈액종양, 또는 소화관종양 등 광범위하게 종양이 발생하여 이런 경우를 기존의 린치증후군 제1형, 제2형과 구분하여 린치증후군 제3형으로 분류하기도 한다(Felton 등, 2007).

이러한 보고들과 본 실험 결과와 비교하여 보면, 본 실험에서 출생 직후부터 출생 28주까지의 흰쥐 큰창자에서 비교적 높은 수준으로 Msh2와 Msh6발현

이 유지되는 것을 면역조직화학염색과 웨스턴 블롯으로 관찰할 수 있었다. 이러한 MMR단백질의 유지는 젊은 층에서 종양 발생의 빈도가 낮은 현상에 관련되는 것으로 추측된다. MMR단백질의 발현이 50주 이후 감소되는 경향을 보이고 100주에 이르러서는 유의성있게 사라지는 경향을 보였는데, 이러한 소견은 노화에 따라MMR돌연변이나 기능 저하에 따른 종양 발생의 가능성을 제시한 여러 보고들(Geisler 등, 2003; Lanza 등, 2006; Felton 등, 2007; Hsu 등, 2007)과 관련이 있는 것으로 사료된다. Msh2발현과 차이점은 Msh6발현은 출생 50주부터 급격히 감소하여, 출생100주와 120주에서는 확연히 감소한다는 것이다. 따라서 노화가 진행됨에 따라 Msh6보다는 Msh2 발현이 더욱 MMR유지에 중요한 단백질로 사료된다. 형태학적으로 볼 때, 젊은 흰쥐 큰창자에 강하게 염색되었던 점막 창자샘 기저부위와 상피층 속공간 인접부의 발현 양상이 출생 50주 이후 소실되는 현상이 관찰되었다. 이러한 소견으로 미루어 Msh2와 Msh6는 큰창자의 점막상피 상피, 점막 창자샘에 특이적으로 유전자 돌연변이 억제에 관여하는 것으로 추측된다. 한편, Msh2발현과 Msh6 발현 양상이 비슷하지만, Msh6의 발현이 Msh2에 비해 노화의 초기에 감소하는 것을 면역조직화학염색 및 단백질 정량으로 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 양상은 Msh2의 단백질 양과 면역염색 정도가 Msh6에 비해 어릴 때부터 높은 상태였기 때문에 이러한 결과가 노화에 따른 MMR감소, MSI 초래, 종양 형성 등으로 이어지는 일련의 과정에 어떠한 영향을 미치는 가에 대한 판단은 좀 더 많은 데이타들을 얻은 후에야 가능할 것으로 사료된다.

젊은 세포와 노화 세포 사이의 수복효소 유도효율의 차이점에 의해 DNA손상의 수복정도에 영향을 미친다. 이러한 영향은 핵과 미토콘드리아 모두에서 발생하며, 산화성 손상이 노화에 따라 증가하는 현상과 관련이 깊은 것으로 추정된다. DNA 수복단백질의 공유결합 변형(즉, 아세틸화)이 산화성 염기병변의 제거/수복 뿐만 아니라 전사조절에도 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다. 앞으로 노화세포에서 DNA 수복단백질의 공유결합 변형의 발생 기

전, DNA 수복효소들의 유도 및 다음 단계의 유도과정 사이의 통합에 대한 의문점들을 밝혀내는 과제가 노화의 연구에 중요한 전환점이 될 것으로 보인다. 이러한 것들이 밝혀지면, DNA손상을 줄이고 수복을 유도하는 유전적 또는 약물적 방법의 개발을 촉진하게 되어 노화의 지연 및 종양발생의 억제를 시킬 수 있을 것으로 기대된다.

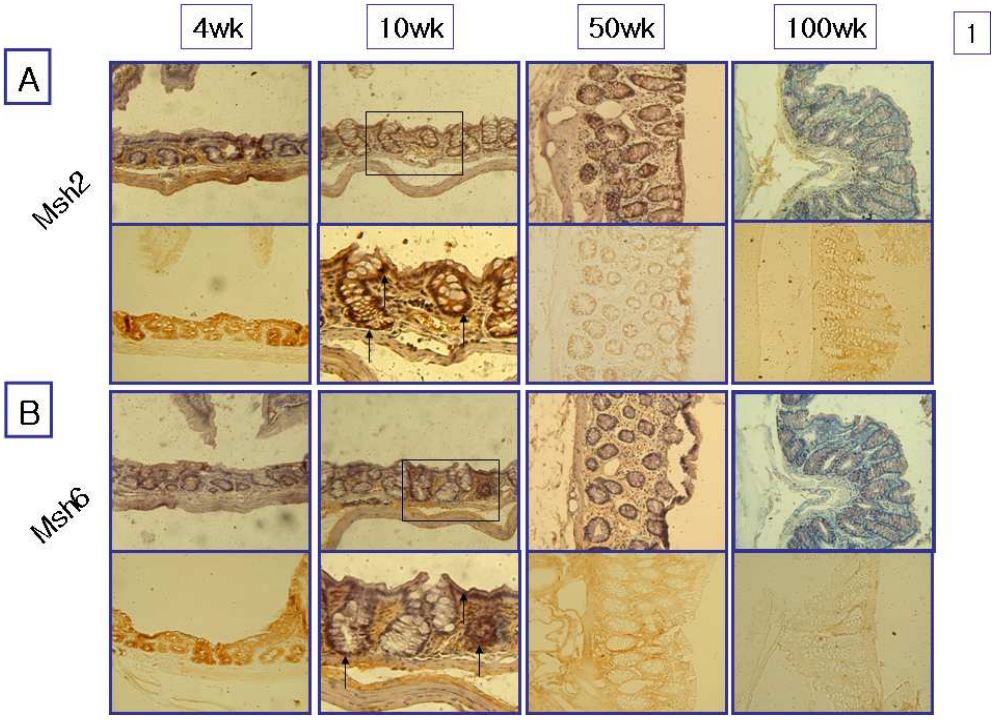
IV. 결　론

흰쥐를 대상으로 노화에 따라 DNA 복제 이상으로 인해 잘못 짝지어진 DNA 염기쌍을 수복시키는 물질인 Msh2와 Msh6 발현이 큰창자 조직에서 출생 28주 별 변화없이 지속적으로 발현이 유지되었으나, 50주 이후 감소하기 시작하여 100주 이상 노화 상태에서는 감소하였다. 노화에 따른 세포기능의 저하, 그리고 이에 따른 잘못짝짓기 수복(MMR)의 저하, 유전자 불안정성의 증가로 인하여 여러 종양의 발생과 관련이 있는 것으로 사료되며, 이를 확진하기 위한 더 많은 자료가 필요하다고 사료된다.

Legends for Figures

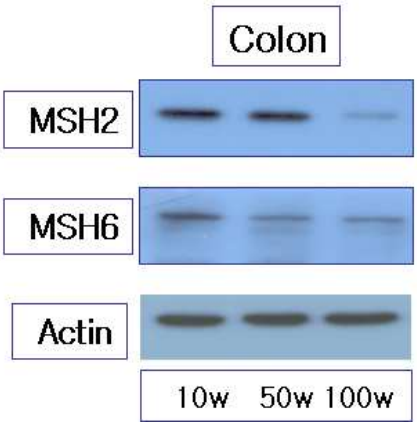
Figure 1. Decreased Msh2(A) and Msh6(B) expression with age in rat colon mucosa. Immunoreactivity for Msh2 and Msh6 were exhibited the relatively strong at young age in rat colon mucosa especially in intestinal gland and epithelial border(arrows of 10 weeks), in contrast , that of old age showed markedly diminished immunostaining. The changes of Msh6 with age was more dramatic than Msh2. Rectaangle shows the area of magnification.

Figure 2 . Decreased Msh2 and Msh6 expression with age in protein assay. Diminision of Msh2 and Msh6 expression was confirmed in old rat colon by western blot assay. The decreasing pattern of Msh2 and Msh6 was similar, but Msh6 was earlier and more significant than Msh2.


4wk
10wk
50wk
100wk
1
A
Msh2
B
Msh6

2

Western Blot for MMR protein analysis in SD rat



References

Beal MF : Oxidatively modified proteins in aging and disease, Free Radic. Biol. Med. 32 ;797-803, 2002

Beckman KB and Ames BN : The free radical theory of aging matures, Physiol. Rev. 78 ; 547-581, 1998

Cald□s T, Godino J, Sanchez A, Corbacho C, De la Hoya M, Lopez Asenjo J, Saez C, Sanz J, Benito M, Ramon Y Cajal S, Diaz-Rubio E: Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. : Oncol Rep. 12(3):621-9, 2004

Colussi C, Parlanti E, Degan P,. Aquilina, Barnes D, Macpherson P, Karran P, Crescenzi M, Dogliotti E and Bignami M: The mammalian mismatch repair pathway removes DNA 8-oxodGMP incorporated from the oxidized dNTP pool. Curr. Biol. 12: 912-918, 2002

Felton K, Gilchrist D, Andrew S: Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? Clin Genet. 71(6):499-500, 2007

Finkel T, Holbrook NJ : Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing, Nature 408 ; 239-247, 2000

Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE: Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma. Cancer. 15;98(10):2199-206. 2003

Gu LY, Hong Y, McCulloch S, Watanabe H, Li GM : ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA

in mismatch repair. Nucleic Acids Res. 26 ; 1173-1178, 1998
Gu YS, Parker A, Wilson TM, Bai HB, Chang DY, Lu, AL: Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog 2/human MutS homolog 6. J. Biol. Chem. 277 ; 11135-11142, 2002
Hasty P, Campisi J, Hoeijmakers J, van Steeg H , Vijg J: Aging and genome maintenance: lessons from the mouse?, Science 299 ;1355-1359, 2003
Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation biology, J. Gerontol. 11 ; 298-300, 1956
Hill JW, Hazra TK, Izumi T, Mitra S : Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair, Nucleic Acids Res. 29 ; 430-438, 2001
Hsieh CC, Rosenblatt JI, Papaconstantinou J: Age-associated changes in SAPK/JNK and p38 MAPK signaling in response to the generation of ROS by 3-nitropropionic acid.Mech Ageing Dev. 124(6):733-46, 2003.
Hsu HS, Lee IH, Hsu WH, Kao WT, Wang YC: Polymorphism in the hMSH2 gene (gISV12-6T > C) is a prognostic factor in non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 11; [Epub ahead of print] 2007
Ikeda S, Biswas T, Roy R, Izumi T, Boldogh I, Kurosky A, Sarker AH, Seki S, Mitra S : Purification and characterization of human NTH1, a homolog of Escherichia coli endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue, J. Biol. Chem. 273 ; 21585-21593 , 1998

Iqbal M, Giri U, Giri DK., Alam MS, Athar M : Age-dependent renal accumulation of 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)-modified proteins following parenteral administration of ferric nitrilotriacetate commensurate with its differential toxicity: implications for the involvement of HNE-protein adducts in oxidative stress and carcinogenesis, Arch. Biochem. Biophys. 365 ; 101-112, 1999

Jiricny J and Nystrom-Lahti M: Mismatch repair defects in cancer. Curr. Opin. Genet. Dev. 10 ;157-161, 2000

Khanna KK and Jackson SP: DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, Nat Genet 27: 247-254,2001.

Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L: Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. J Clin Oncol. 20;24(15):2359-67. 2006

Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB: The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. Br J Cancer. 22;93(4):472-7. 2005

Mazurek A, Berardini M, Fishel R: Activation of human MutS homologs by 8-oxo-guanine DNA damage. J. Biol. Chem. 277 ; 8260 -8266, 2002

Mitra S, Hazra TK, Roy R , Ikeda S, Biswas T, Lock J, Boldogh I , Izumi T : Complexities of DNA base excision repair in mammalian cells, Mol. Cells 7 ; 305-312, 1997.

Mitra S: DNA glycosylases: specificity and mechanisms, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 68 ;189-192,2001

Mitra S, Izumi T, Boldogh I, Bhakat KK , Hill JW , Hazra TK : Choreography of oxidative damage repair in mammalian genomes,

Free Radic. Biol. Med. 33 ; 15-28 , 2002

Neri S, Pawelec G, Facchini A, Mariani E: Microsatellite instability and compromized mismatch repair gene expression during in vitro passaging of monoclonal human T lymphocytes. Rejuvenation Res. 10(2):145-56, 2007

Ni TT, Marsischky GT, Kolodner RD: MSH2 and MSH6 are required for removal of adenine misincorporated opposite 8-oxo-guanine in S. cerevisiae. Mol. Cell 4 ; 439-444, 1999

Papaconstantinou J : Unifying model of the programmed (intrinsic) and stochastic (extrinsic) theories of aging. The stress response genes, signal transduction-redox pathways and aging, Ann. NY Acad. Sci. 719 ; 195-211,1994.

Rich T, Allen RL, Wyllie AH: Defying death after DNA damage, Nature. 12;407: 777-783, 2000

Sohal RS, Mockett RJ, Orr WC : Mechanisms of aging: an appraisal of the oxidative stress hypothesis, Free Radic. Biol. Med. 33 : 575-586, 2002

Stadtman E : Imoportance of individuality in oxidative stress and aging, Free Radic. Biol. Med. 33 ; 597-604, 2002

Suh Y : Cell signaling in aging and apoptosis., Mech. Ageing Dev. 123 : 881-890, 2002

Sunesen M, Stevnsner T, Brosh Jr RM, Dianov GL , Bohr VA.: Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product, Oncogene 21 ; 3571-3578 , 2002

Traverso N, Patriarca S, Balbis E, Furfaro AL, Cottalasso D, Pronzato MA, Carlier P, Botta F, Marinari UM , Fontana L : Anti malondialdehyde-adduct immunological response as a possible marker

of successful aging, Exp. Gerontol. 38 ;1129-1135, 2003
van Gent DC, Hoeijmakers JH, Kanaar R: Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. Nat Rev Genet,2(3):196-206,2001.

저작물 이용 허락서

학 과	의학과	학 번		과 정	박사
성 명	한글: 김 기 훈 한문 : 영문 : Kee-Hune Kim				
주 소	광주광역시 동구 대인동 198-3 새 금호빌딩				
연락처			E-MAIL		
논문제목	**한글 :** 위장관의 유전자 손상복구 인자에 대한 연구 -노화에 따른 DNA mismatch repair 단백질의 변화- **영문:** DNA repair factors in gastrointestinal system: Mismatch repair proteins with age				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(O) 반대( )

2007 년 8 월

저작자: 김 기 훈(인)

조선대학교 총장 귀하