

2008년 2월

박사학위논문

노화에 따른 신경계의 유전자 손상복구 인자의
변화에 대한 연구

Changes of DNA repair factors with age in
nervous system

조선대학교대학원

의학과

김주영

노화에 따른 신경계의 유전자 손상복구 인자의
변화에 대한 연구

Changes of DNA repair factors with age in
nervous system

2008 년 2 월 일

조 선 대 학 교 대 학 원
의 학 과

김 주 영

노화에 따른 신경계의 유전자 손상복구 인자의
변화에 대한 연구

지도교수 장 인 엽

이 논문을 의학박사학위신청 논문으로 제출함.

2007년 10월 일

조선대학교대학원

의학과

김주영

김 주 영의 박사 학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 유 호진 인

위원 조선대학교 교 수 전 제열 인

위원 조선대학교 조교수 황 걸 인

위원 서남대학교 조교수 윤 상필 인

위원 조선대학교 교 수 장 인엽 인

2007 년 12 월 일

조선대학교대학원

목 차

도 목 차

표 목 차

영문초록

서 론

재료 및 방법

결 과

고 찰

결 론

참 고 문 헌

사진부도설명---

사 진 부 도

도 목 차

Fig. 1	-----	38
Fig. 2	-----	38
Fig. 3	-----	38
Fig. 4	-----	38
Fig. 5	-----	39
Fig. 6	-----	40

-Abstract-

Changes of DNA repair factors with age in nervous system

Joo-Young Kim

Advisor: In-Youb Chang, MD. Ph.D.

Department of Medicine,

Graduate School of Chosun University

There is a rapid loss of weight with age in human brain. That is related to the reduction of neuronal bodies, the loss of dendritie, the accumulation of mitochondrial damage, and the reduction in DNA repair activity. Once DNA sequence is lost, perfect recovery is impossible. This character of the DNA makes genetic fragments a major target for age-related decline. Cells comprise intricate DNA repair system to avert DNA damage. DNA repair system may itself be injured by age-related cellular process including reactive oxygen species. In this study we will survey the changes in DNA repair factors during aging in rat, including mismatch repair (MMR), base excision repair (BER), and double-strand break (DSB) repair. This paper shows that the level of Msh2 protein declines after 1 year of age significantly, which is one of the key enzyme involved in MMR. BER factor, MTH1 and OGG1 also are slightly reduced with age. In contrast to increased DSB damage(γ -H2AX), the

repair factors for DSB, Ku80 and DNA-PKCs, are reduced in aging rat brain. These results suggest that the increased DNA damage and the reduction of several DNA repair factors with age may play significant role in deterioration of neural system.

Key-wards : DNA repair factors, DNA damage, Brain, aging,

1. 서 론

사람 뇌는 60 세 이전에는 매년 0.1% 정도 중량이 줄어들다가, 그 이후에는 급격한 감소를 초래한다(Esiri, 2007). 노화에 따라 뇌에 나타나는 육안적 차이점은 뇌의 중량과 용적의 감소, 뇌실 크기의 증가, 뇌 고랑(sulcus)의 확대 등이다. 현미경적으로는 대뇌겉질, 해마, 소뇌 등에서 신경세포체의 감소, 신경세포의 위축, 형태 이상, 들신경섬유의 차단(deafferentation), 가지돌기의 소실, 미토콘드리아 손상의 축적, DNA 복구능력의 감소, 시냅스 밀도의 감소 등이 관찰된다 (Morrison and Hof, 1997; Raz and Rodrigue, 2006). 뿐만 아니라 뇌 영상을 통한 연구에서도 이러한 노화에 따른 뇌 용적이 감소됨이 확인되었다 (Coffey *et al*, 1992; Pfefferbaum *et al*, 1994). 백질은 거의 균일하게 감소가 나타나는 반면, 회색질은 이마엽, 마루엽, 줄무늬체에서 관자엽과 뒤통수엽에 비해 감소가 두드러지게 나타난다(Esiri, 2007). 또 정상적인 노화과정에서는 냄새에 관여하는 속후각겉질(entorhinal cortex)에 대한 영향은 거의 없다고 알려지고 있다(Insausti *et al*, 1998; Raz and Rodrigue, 2006). 50 세 이후에 신경세포의 크기가 감소하고, 가지돌기의 가지 숫자도 46% 정도 감소된다고 알려졌다(Jacobs *et al*, 1997). 최근 난소를 제거한 쥐에 여성 호르몬(estrogen)을 투여하면 혈관-뇌 장벽(blood-brain barrier)의 투과성이 증가된다는 보고(Bake and

Sohrabji, 2004)로 미루어, 이런 현상이 사람에게서도 일어난다고 가정하면, 노화의 일종인 폐경 후 여성들의 여성호르몬 복용이 신경퇴화를 촉진시키는 심각한 현상을 초래할 수도 있다. 이러한 투과성의 증가는 특히 해마에서 뚜렷이 나타나고 있어 기억력의 감퇴, 감정 또는 인지의 변화에 관여할 가능성이 제기되고 있다. 따라서 노화, 신경, 내분비 사이의 복잡하고 알려지지 않은 상호 영향력이 세포 항상성에 중대한 변화를 초래하는 것으로 추정되고 있다.

노화현상은 유기체에서 일어나는 진행적인 과정으로, 세포의 기능 및 대사에 복잡한 변화를 초래하고 때로는 치명적인 결과를 초래하기도 하지만, 발생기전은 정확히 밝혀져 있지 않다. 자유 라디칼 이론(free radical theory)이 이런 과정에 관여하는 것으로 추정하고 있는데, 활성산소(reactive oxygen species; ROS)에 의해 생성되는 지속적인 산화성 스트레스(chronic oxidative stress)가 노화에 관련이 있다고 알려지고 있다 (Harman, 1956; Beckman and Ames, 1998; Sohal *et al*, 2002; Stadtman, 2002). 최근 이러한 노화 또는 노화와 관련된 암발생, 신경퇴행성질환에서의 DNA 복제 스트레스(replication stress)에 의해 DNA 손상이 유발되어 이런 병적 상태와 관련이 있다는 주장이 제기되고 있다(Burhans and Weinberger, 2007). 세포에 유해자극이나 스트레스가 가해지면(ROS 가 대표적 유발 인자)가 세포에 가해지면, 세포는

불필요하거나 부적절한 복제를 하게 되는 DNA 복제 스트레스를 일으키게 된다.

ROS의 세포에 대한 영향은 세포전달경로(cellular signal pathways)들의 활성화, 세포 구성 요소들의 반응 등을 통하여 작용하는데, mitogen-activated protein kinase (MAPK) 경로의 p38 단백질이나, SAPK/JNK 신호 전달 단백질들을 비롯한 세포 항상성 관련 여러 세포 전달 경로들이 활성화되는데, 노화에 따라 이런 경로들 뿐만 아니라, 노화관련 단백질들의 활성도가 변화한다고 알려지고 있다(Papaconstantinou, 1994; Finkel and Holbrook, 2000; Suh, 2002; Hsieh *et al.*, 2003). 거의 모든 세포 구성 요소들의 ROS에 반응에 관련되어있지만, 특히 노화에 비례하여 증가하는 산화성 단백질(protein carbonyls 등 포함; Beal, 2002), ROS에 의해 산화되는 불포화 지방산 분절들(unsaturated fatty acid fragments)이 노화 동물들에서 유의성 있게 증가한다(Iqbal *et al.*, 1999; Suh, 2002; Traverso *et al.*, 2003). 이는 ROS에 DNA 염기의 다양한 산화성 손상, 염기의 소실(base loss), DNA 이중가닥손상(DNA strand breaks: DSB)를 초래하게 된다(Mitra *et al.*, 1997; 2002; van Gent *et al.*, 2001). 8-oxoguanine (8-oxoG) 과 5-hydroxyuracil (5-HU)과 같은 산화된 염기와 무염기 부위(abasic sites 또는, apurinic/aprimidinic sites; AP)들에 의해 분열 도중 돌연변이가 초래되게 된다. 따라서 ROS가 세포에

가해지면 가장 치명적인 결과인 유전자독성(genotoxicity)이 초래된다. 분화가 끝나 더 이상 분열하지 않는 상태의 세포, 즉 노화세포에서도 돌연변이 유발가능성이 있는 염기병변과 무염기 부위에 의해 기능저하 또는 소실된 돌연변이 단백질들을 생성시키게 된다. 여러 조절인자의 돌연변이 및 DNA 이중가닥손상 에 따라, mRNA생성 이상, 단백질들의 이상이 연속적으로 발생한다. 이러한 사실들로 고려하여 볼 때 노화에 따른 DNA손상의 축적은 정상적인 세포생리와 대사에 복구되기 어려운 손상을 미치게 된다(Suh, 2002).

ROS는 모든 생명체에서 지속적으로 생성된다. 정상적으로는 ROS에 유도된 것들을 포함한 모든 손상들은 수복되거나 세포죽음으로 유도되어 인체에 치명성을 가하지 못하게 예방이 이루어진다. 만약 이런 ROS들에 의해 신경계에 DNA손상 축적이 계속되면 치매(Alzheimer's disease), 파킨슨 씨 병, 운동장애, 감각장애, 신경계 종양 등 여러 신경계 관련 질환들의 발병에 관여하게 된다(Gorbunova *et al.*, 2007; Wilson and McNeill, 2007).

여러 가지 DNA 수복 경로가 존재하지만, 크게 나누어 보면, 잘못 짝지어진 DNA염기쌍을 수복시키는 잘못 짝짓기 수복(mismatch repair; MMR), 산화성 염기손상, 단일DNA가닥 손상, AP 등의 복구를 담당하는 DNA염기절제 수복(DNA base excision repair; BER)가 있다(Mitra *et al.*, 1997; 2002). 어떤 손상은 뉴클레오티드 절제수복(nucleotide excision

repair; NER)에 의해 복구되며, 이중DNA가닥 손상은 상동성 재조합(homogenous recombination), 또는 비상동성 말단 결합(non-homogenous end joining)등의 재조합 수복(recombination repair)에 의해 복구가 이루어진다(Sunesen *et al*, 2002; Intanno *et al.*, 2003; Skinner and Turker, 2005). 하지만 노화에 따른 유전자 손상 중 신경계의 DNA손상 및 복구에 대한 정확한 보고는 많지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 노화에 따른 흰쥐 뇌에서 노화 단계별 DNA 복구인자의 변화를 여러 DNA 복구 경로 별로 구분하여 알아보고자 면역조직화학염색과 단백질 정량 방법으로 실험을 실시 하였다.

II. 실험재료 및 방법

동물조직

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

면역조직화학염색

(1) 동물조직의 절편제작 및 염색

실험동물을 ether 로 깊게 마취시켜 희생시킨 다음, 뇌를 적출하여 paraformaldehyde 으로 4°C에서 24 시간 고정하였다. 냉동절편을 얻기 위해 조직을 30% sucrose 가 함유된 phosphate buffered saline(PBS)에서 탈수시켜 냉동에 따른 조직손상을 최소화하여 10-15 μ m 두께로 잘라 슬라이드에 부착시켰다. 파라핀 조직 절편은 고정 후 통상의 ethanol 탈수, xylene 투명 등을 거쳐 파라핀으로 포매 한 후 잘라서 슬라이드에 부착시켰다. PBS 로 수 차례 세척하여 고정액을 제거하고, 0.3% Triton X-100 이 함유된 PBS 를 실온에서 1 시간, 1% bovine serum albumin(BSA)가 함유된 PBS 를 실온에서 1 시간 각각 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. 실험에 사용된 1 차 항체는 다음과 같다. 잘못 짝짓기 수복(mismatch repair; MMR)인자 MSH2 항체 (1: 100, BD Bioscience, USA), MSH6 항체 (1:100, BD Bioscience, USA); DNA 염기절제수복(DNA base excision repair; BER) 인자 MTH1, endonuclease III homologue 1 (NTH1), AP

endonuclease(APE), 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) (이상 모두 1:1,00, Santa Cruz biotechnology, USA); DNA 이중가닥 손상수복(double strands break repair; DSBR) 인자 Ku70, Ku80, DNA-PKs(이상 모두 1:1,00, Santa Cruz biotechnology, USA).

1 차 항체를 4°C에서 24 시간 반응시킨 후. PBS 로 세척시킨 다음, 2 차 항체인 chicken anti-rabbit IgG-HRP conjugated(1:200, Chemicon, USA)을 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후 3-3' diaminobezidine(DAB, Sigma, USA)로 발색하였다. 대조군은 1 차 항체들을 생략하고 2 차 항체만 반응시킨 조직을 사용하였다.

Western blotting

흰쥐 뇌를 드라이아이스와 isopentane 이 혼합된 용액에서 급속히 냉각시킨 냉동상태로 보관시켜 다음 실험에 사용하였다. 조직 0.5mg 을 300 μ l 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 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1mM NaVO₄, and 5mM NaF)으로 30 분 동안 0° C 에서 용해시킨 후 균질화(Homogenization) 시켰다. Ultra-sonicator 를 이용해서 세포를 파괴시켜 원심분리시키고(18,000rpm, 4°C 15min), 상층액을 재차 원심분리하였다(18,000rpm, 4°C 10min). 5 분 동안 열판에서 가열한 후, 전기영동을 위해 단백질 농도를 Bio-Rad dye-binding

microassay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 결정하였는데, 20 μ g의 단백질을 10% SDS polyacrylamide gels 로 전기영동시킨 후 단백질을 Hybon ECL membranes(Amersham-Pharmacia, Biotech)로 옮겨서 염색을 하였다. 1 차 항체는 면역조직화학염색에서 사용한 항체와 동일하게 사용하였다. 항체의 농도는 모두 1: 1000 으로 사용하였다. 염색된 단백질을 enhanced chemiluminescence detect system(iNtRON, Biotech, Seoul, Korea)을 이용하여 특정 단백질의 발현 여부를 확인하였다

III. 결 과

본 실험에서 흰쥐의 뇌를 대상으로 출생 직후(P1)부터 노화(P120w)에 이르기까지 노화에 따른 DNA 수복인자들의 변화를 관찰하였다. 본 실험에서 알아낸 결과는 웨스턴블롯의 단백질 정량방법과 면역조직화학염색방법으로 조사하였는데, 노화 쥐의 신경조직에서 MSH2, Ku80, DNA-PKCs, MTH1 OGG1 등은 연령에 따라 감소하였고, Ku70 은 오히려 증가하였다, 그 외 나머지는 거의 변화가 없었는데, 특히 APE 는 모든 연령에 걸쳐 높은 발현 수준으로 지속 됨을 알 수 있었다. 뇌부위 별 발현 상태는 전체 뇌에 걸쳐 다양하게 나타났지만, 소뇌, 해마, 뇌결질 순서로 잘 관찰되었다.

(1) 노화에 따른 흰쥐 뇌에서 DNA 수복인자들의 단백질 발현 변화

A. 잘못 짝짓기 수복 (mismatch repair; MMR)인자들의 변화

노화에 따른 신경계 MMR 인자 MSH2 와 MSH6 의 단백질 발현 수준은 감소하였다(**Fig. 1**). 이들 인자 중 MSH2 단백질의 발현은 출생 후 8 주에 비해 1 년에서 감소 수준이 현저하였으며 2 년에서는 또 다시 감소하여 발현 수준이 거의 검출되지 않았다. MSH6 결과는 MSH2 단백질에 비해 젊은 쥐에서의 발현 수준도 낮았고, 노화 흰쥐에서 감소 수준의 폭도 크지 않았다. 이러한 뇌에서의 결과는 흰쥐 큰창자 에서의 MSH2 와 MSH6 의 감소 현상과 유사한 반응을 보였다(자료생략)

B. DNA 이중가닥 손상수복(DSBR) 인자들의 변화

DNA 이중가닥 손상수복에 관여하는 DNA 재조합수복(Recombination repair: RR) 인자 Ku70, Ku80, DNAPKs 들의 노화에 따른 단백질 발현을 조사한 결과, Ku80 과 DNAPKs 노화에 따라 감소하였고, Ku70 은 오히려 증가하였다(**Fig. 2**). Ku80 은 출생 8 주에 비해 1 년에서 발현이 점차 감소하다가, 2 년에서는 젊은 흰쥐의 뇌에 비해 현저히 감소하는 양상을 보인 반면, DNAPKs 는 1 년에서부터 급격한 감소를 보였다. 이러한 노화에 따른 RR 의 감소는 DNA 이중가닥 손상 표지자인 γ -H2AX 의 발현증가와 함께 관찰되었다(자료생략).

C. DNA 염기절제수복(DNA base excision repair; BER) 인자들의 변화

노화에 따른 신경계 BER 인자 MTH1, NTH1, APE, OGG1 들 중 MTH1 와 OGG1 은 약간 감소하였지만, 젊은 쥐에서의 발현 수준도 낮았고, 노화 흰쥐에서 감소 수준의 폭도 크지 않았다. NTH1 와 APE 는 변화가 없었는데, 특히 APE 는 젊은 쥐와 늙은 쥐 모두에서 본 실험에 발현 측정에 이용된 단백질 중 가장 높은 발현 수준을 보였다(**Fig. 3**).

(2) 노화에 따른 흰쥐 뇌에서 DNA 수복인자들의 조직학적 변화

A. 잘못 짝짓기 수복인자들의 변화

MSH2 와 MSH6 의 신경계에서 면역조직화학적 소견은 면역반응이 핵에서 잘 관찰되었던 반면 세포질에는 관찰되지 않았다(**Fig. 4**). MSH2 과 MSH6 단백질의 염색성은 출생 후 8 주에 비해 2 년에서 현저하게

감소하였는데 이러한 조직학적 결과는 단백질 발현이 감소하는 소견과 일치함을 나타내었다.

B. DNA 이중가닥 손상수복인자들의 변화

DSBR 에 관여하는 DNA 재조합수복(Recombination repair: RR) 인자 Ku80 와 DNAPKCs 는 노화 쥐에서 젊은 쥐에 비해 감소하였던 반면, Ku70 의 염색성은 변화가 없거나 오히려 증가하는 경향을 보였다(**Fig. 5**). 노화에 따른 RR 의 감소와 더불어 DNA 이중가닥 손상 표지자인 γ -H2AX 의 면역염색성 및 양성반응세포수가 증가되었다(자료생략).

C. DNA 염기절제수복인자들의 변화

신경계 BER 인자 MTH1 과 OGG1 이 핵에 염색되는 정도는 노화에 따라 약간 감소하였으며, APE 와 NTH1 은 젊은 쥐와 노화 쥐 사이에 별 차이가 없었다. 이들 중 출생부터 노화에 이르기 까지 가장 염색성이 강하게 나타난 것은 APE 였으며, 해마에서는 세포질에, 소뇌에서는 핵과 세포질 모두에 나타나는 것이 특징이었다(**Fig. 6**). OGG1 의 발현이 매우 높은 경우는 해마, 뇌겉질의 피라미드 신경세포, 소뇌의 조롱박세포였다.

IV 고 찰

본 실험에서 DNA 복제이상으로 인해 잘못 짝지어진 DNA 염기쌍을 수복시키는 DNA 잘못짜짓기 수복(mismatch repair: MMR), DNA 이중가닥 손상을 복구시키는 DNA 재조합 수복(recombination repair), 산화성 염기손상, 단일 DNA 가닥 손상, AP sites 등을 복구시키는 DNA 염기 절제수복(DNA base excision repair; BER) 등의 DNA 수복 인자들이 흰쥐 중추신경계 뇌에서 노화에 따라 변화하는 상태를 단백질 발현 및 조직학적 변화를 통하여 알아보았다. 그 결과 노화에 따라 수복인자들이 감소, 증가 또는 변화가 없음을 알 수 있었으며, 젊은 쥐뿐만 아니라 노화 쥐에서도 뇌조직 내 발현이 아주 낮은 수준으로 나타나는 것을 발견하였다. 이러한 DNA 손상 수복인자들의 노화에 따른 감소는 DNA 손상이 노화에 따라 축적되는 현상을 초래하게 되어, MSI 및 돌연변이 발생이 증가되고 나아가 노화에 따른 여러 퇴행성 신경질환 및 종양 발생의 주요 발병 원인으로 작용할 가능성이 높다고 여겨진다

DNA 잘못짜짓기 수복 (MMR)

노화 뇌조직에서 MMR 인자인 MSH2 와 MSH6 의 발현이 감소되었는데 특히 MSH2 단백질의 발현의 감소는 젊은 쥐에 비해 1년, 2년 노화 쥐로 현저하게 감소하였으며, 2년에서는 또 다시 감소하여 발현 수준이 거의

검출되지 않았다. 본 실험에서 염색하여 관찰한 결과는 포유동물 뇌조직에서의 MSH2 와 MSH6 의 면역조직염색에 대한 보고들(Marietta *et al.*, 1998; Belloni *et al.*, 1999)과 유사하였는데 소뇌에서 발현이 가장 강한 반응을 보였다. 이러한 본 실험 결과는 본 연구진들이 노화에 따른 흰쥐 큰창자 Msh2 와 Msh6 발현이 50 주 이후 감소하기 시작하여 100 주 이상 노화 상태에서는 매우 감소함을 밝혀낸 소견과 비슷한 결과였다(자료 미 발표). 이는 노화에 따라 MMR 돌연변이나 기능저하에 따른 종양발생의 가능성을 제시한 여러 보고들(Geisler *et al.*, 2003; Felton *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2007)과 관련이 있는 것으로 사료된다. 복제과정의 이상(replication error)으로 발생하는 A-G 잘못 짝짓기(A-G mismatch), T-C 잘못 짝짓기(T-C mismatch) 등을 복구하는 MMR 시스템은 MSH2, MSH6 외에 MLH1, PMS1/2 등이 여기에 해당한다. 이들의 주된 역할은 유전자 안정성을 도모하고, 종양발생을 억제하는 작용인데(Mazurek *et al.*, 2002; Gu *et al.*, 2002), 이들이 노화에 따라 수복 능력이 감소되고, DNA 손상 축적이 증가됨에 따라 세포 기능의 이상 초래하게 된다. Msh2 과 Msh6 발현 차이점은 Msh2 는 출생 50 주부터 급격히 감소하여, 출생 100 주 이상 노화 쥐 뇌에서는 거의 사라진다는 것이다. 따라서 노화가 진행됨에 따라 생길 수 있는 여러 문제점에 Msh2 의 소실 또는 저하가 더욱 밀접하게 관련되어 있는 것으로 사료된다. 최근 복제이상으로 노화를

촉진시킨 T- 림프세포 또는 거강한 사람에서 배양을 거듭할수록 MSI 가 증가되고, MMR 발현이 감소된다고 보고되었다(Krichevsky *et al.*, 2004; Neri *et al.*, 2007). 하지만 아직도 노화에 따른 MMR 의 발현 변화 및 기능의 변화에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

MMR 의 기능저하는 대장결장암의 발병 및 예후와 관련되고, 최근 보고들에 의하면 MSI 과발현과 MMR 저하가 한꺼번에 일어나면 난소암의 발병이 증가되고, 비소세포 폐암(non-small cell lung cancer) 환자에서 특정 MMR 돌연변이는 예후 및 치료 효과와 관련이 깊은 것으로 보고되고 있다.(Lanza *et al.*, 2006; Felton *et al.*, 2007; Hsu *et al.*, 2007). 신경세포들은 이미 분열이 끝난 상태(postmitotic neurons)인데도 복제에 따른 DNA 이상을 수정하는 잘못짜짓기수복이 필요한 것인지는 잘 알려져 있지 않은 실정이지만, 분열이 정지된 신경세포에서 잘못 짜짓기가 발생하는 원인은 산화성 DNA 손상의 과정에 발생하거나, DNA 수복 합성 중 polymerase(특히 DNA polymerase β)의 잘못 된 기능에 의해 것으로 보고되고 있다(David *et al.*, 1997). 하지만 분열이 정지된 신경세포에서 여전히 미토콘드리아 DNA 의 BER 기능이 매우 활발하다는 사실(Mandavilli, *et al.*, 2000; LeDoux and Wilson, 2001; Bohr, 2001)과 관계가 있는 것으로 추측된다. 실제로 5-메틸시토신의 탈아민화(deamination of 5-methylcytosine)에 의해 생성되는 G-T

잘못 짝짓기는 BER 에 의해서 바로 G-C 짝짓기로 수정된다(Brooks *et al.*, 1996).

따라서 단백질 정량에서는 현저한 차이를 보이지만, 면역조직염색 결과 핵에서의 차이는 단백질 정량에서 나타난 것과 같이 확연히 나타나지 않는 이유가 될 수 있으리라 사료된다. 신경세포생존에 잘못 짝짓기 수복인자들이 필요한데 노화에 따라 감소하여 신경세포의 죽음이 유발되고, 심한 경우에는 신경퇴행성 질환이 유발되는 것으로 사료된다.

DNA 재조합 수복(RR)

유전체는 염색체 DNA 손상에 의한 돌연변이 위험을 항상 가지고 있는데, 그 중 DNA 이중가닥손상(double strand breaks; DSBs)은 수복되지 않으면 세포죽음이나 염색체 이상을 초래하는 심각한 DNA 손상이다. 이런 DSBs 를 복구시키기 위해 DNA 재조합 수복시스템이 존재하는데, 손상된 DNA 를 상동성 재조합(homologous recombination; HR) 또는 비상동성 재조합(nonhomologous end-joining; NHEJ) 방식으로 복구하는데, 둘 중 하나라도 잘못되면 유전자 불안전성, 면역결핍 및 종양민감성(tumor susceptibility) 등이 나타난다. DSBs 수복능력이 결핍되면 염색체 전좌(translocation)를 초래하기 쉽고,

세포항상성을 유지하는데 필수적인 요소들의 균형이 깨져 유전자 증폭(DNA amplification)의 발생을 초래하게 된다. 이러한 전좌와 유전자 증폭은 종양유전자의 활성화를 유도하여 세포형질전환 및 종양형성에 주요한 기작으로 작용한다(Koike *et al.*, 1999; Khanna and Jackson, 2001; Sunesen *et al.*, 2002; Gullo *et al.*, 2006). 종양에 대해 민감성을 갖는 유전자는 문지기(caretakers)와 감시자(gatekeepers) 두 가지로 분류할 수 있는데 각각 DNA 수복과 세포사멸 및 증식에 관계한다. Ku86 와 p53 은 기능적으로 밀접하게 연관되어 있는 대표적인 문지기-감시자 쌍에 해당되는데. 이런 두 가지 기능이 소실되면 종양발생 가능성이 증가된다(Kinzler and Vogelstein, 1997). Ku80 은 염색체가 재배열되는 것을 억제함으로써 게놈완전성을 유지시키는 문지기유전자로 작용하는데 결핍되면, 심각한 염색체 이상을 초래하지만, 암에 대한 반응은 저하된 상태일지라도 여전히 기능을 수행하게 된다. 만약 p53 의 소실과 Ku86 의 소실이 동시에 발생하면 종양발생을 촉진하고, 특정 암에서는 COX-2, PGE2, Bcl-2, Ku 등의 상호작용을 통하여 암세포 증식과 진행에 밀접한 관련이 있는 것으로 여겨지고 있다(Sheng *et al.*, 1998; Difilippantonio *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 2000; Pucci *et al.*, 2001; Lim *et al.*, 2002).

본 실험에서 DNA 이중가닥손상의 복구에 관여하는 DNA 재조합수복인자 Ku80 와 DNAPKCs 는 노화에 따라 감소함을 관찰하였는데 이런 결과는 종양발생과 면역활성도가 노화에 따라 감소하는 현상들과 관련성이 있는 것으로 사료된다. 반면, 본 실험 결과 나타난 Ku7 발현이나 염색성은 변화가 없거나 오히려 증가하는 경향을 보였는데, Ku70 과 Ku80 은 구조적으로 이성체(heterodimer)를 이루어 존재하는데 Ku80 이 선택적으로 감소함에 따라 Ku70 단백질 양이 증가하게 되는 것으로 사료된다. 본 연구자가 허파조직에서 Ku70 과 Ku80 의 발현이 모두 노화에 따라 감소하는 결과(자료 미발표)와 비교하여 보았을 때 Ku70 과 Ku80 의 증가 및 감소가 상이한 결과를 나타내는 현상으로 보아 돌연변이를 초래할 수 있는 재조합 수복 인자들의 발현은 조직마다 각각 다른 분포나 기능을 가지는 조직특이성을 나타낸다고 사료된다.

본 실험에서 Ku80 과 같이 감소하는 경향을 보이는 DNA-PKCs 역시 DSBs 복구에 중요한 인자이며, Ku80 이 DNA-PK 의 활성도를 조절하는 작용을 수행하므로(Muller *et al*, 1998), Ku80/ DNA-PKCs 발현의 감소를 보이는 본 실험 소견은 더욱 노화에 따른 신경종양이나 신경퇴행성 질환 발생이 증가하는 현상에 대한 RR 의 관련 가능성을 높여주고 있다. 또 배양 섬유아세포에서 NHEJ 의 효율은 나이가 들수록 감소하고, 늙은 세포에서 말단결합은 DNA 삭제(deletion) 손상이나 점 돌연변이(point mutation)

발생과 관련된 것으로 밝혀졌다(Seluanov *et al.*, 2004). 노화세포에서 말단결합은 비효율적으로 되고, DNA 이상을 초래하기 쉬운 상태로 변한다는 사실을 의미한다. 그 이유는 잘 밝혀져 있지 않지만, Ku 는 노화세포의 핵 속에 축적되어 복구되지 않은 상태로 존재하는 DNA 손상초점(foci)에 붙잡혀있는 것으로 여겨진다(d' Adda di Fagagna *et al.*, 2003; Sedelnikova *et al.*, 2004). 또 HR 은 복제적으로 노화에 들어간 세포에서는 존재하지 않기 때문에 이런 감소가 HR 증가에 따른 현상이라고 보기는 힘든 상황이다. 또 많은 보고들에서 포유동물세포주기 G1/G0 상태에서 DSBs 를 복구하기 위한 주된 경로는 NHEJ 라고 주장하였다(Rothkamm *et al.*, 2003; Saleh-Gohari and Helleday , 2004; Sonoda *et al.*, 2006).

종양의 발생 및 진행뿐만 아니라 종양의 치료 측면에서 볼 때, 항암치료요법은 DNA 가닥손상을 유도하여 DNA 를 표적으로 손상시키게 되는데, 종양세포들이 정상세포에 비해 유전자 손상 복구 과정의 중요성이 훨씬 크기 때문에, 항암 치료시 유전자복구 경로를 차단하였을 때, 더욱 민감한 치료효과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다(Kashishian *et al.*, 2003, 14). 따라서 Ku 단백질과 DNA-PK 를 비롯한 재조합 수복시스템의 기능저하에 따른 유전자 불안정성의 증가를 통하여 종양생성을 유발하고. 반면 암세포에서의 Ku 과발현은 과도한 DNA 수복을

조장하여, 항암제에 대한 저항성을 증대시켜 악성 종양으로 변화시킨다. 즉 발현과잉 과 발현저하 모두 암발생에 관여한다.

DNA 염기절제수복 (BER)

노화에 따라 ROS 가 축적 됨에 따라 산화성 염기의 생성, 단일 DNA 나선 손상발생, AP 부위(sites) 생성 등이 증가하게 되는데 이들은 DNA 염기절제수복(DNA base excision repair: BER)을 통해 복구된다. 따라서 BER 은 DNA 염시에 문제가 생겼을 때 손상된 염기를 인식하고, 잘라내는 DNA glycosylase 에 의해 시작되어 short patch repair(한 개의 뉴클리오티드의 결함을 복구)와 long patch repair(2-8 개의 뉴클리오티드의 결함을 복구)방식으로 DNA 합성과 연결을 통하여 DNA 잘라진 틈을 메움으로써 수복시킨다(Sunesen *et al.*, 2002). 본 연구에서 BER 대상으로 선정하여 조사한 복구요소들의 주요 작용은 다음과 같다. OGG1 은 산화성 손상을 받은 8-oxoG 과 다른 염기들(C,T,G)과의 잘못된 결함을 수복하고, NTH1 은 산화되거나 조각난 피리미딘(pyrimidine)을 복구시키며, MTH1 은 8-oxoGTP 를 복구시키고, APE 는 무염기부위(AP)를 인식, 복구시킨다 (Mitra *et al.*, 1997; 2002; Sunesen *et al.*, 2002).

본 실험 결과, BER 인자 MTH1 와 OGG1 은 노화에 따라 약간 감소하였지만, 본래 젊은 쥐에서의 발현 수준도 낮았고, 노화 흰쥐에서 감소 수준의 폭도 크지 않았다. NTH1 와 APE 는 변화가 없었는데, 특히

APE 는 젊은 쥐와 늙은 쥐 모두에서 본 실험에 발현 측정에 이용된 단백질 중 가장 높은 발현 수준을 보였다. 따라서 BER 인자들은 노화에 따라 변화가 작게 일어나는 것을 알 수 있었다. 즉 연령이 증가하여도 꾸준히 발현되어 염기손상을 복구할 수 있다고 추정된다.

APE/Ref1 은 다기능 효소이다. 염기절단수복과정에서 DNA glycosylase 작용에 의해 손상된 염기를 잘라내면, 다음 과정으로 필수적인 AP endonuclease 활성도를 가질 뿐 아니라, 전사 요소인 fos 와 jun 을 위한 산화환원 감지 인자(redox-sensing factor: Ref)로 작용하기도 한다(Flaherty *et al.*, 2001). APE/Ref1 mRNA 발현 정도는 해마, 소뇌, 시상하부 등에서 특히 높게 나타난다고 알려지고 있으며(Wilson *et al.*, 1996). 또한 면역세포화학 염색시 해마신경세포에 APE/Ref1 가 많이 존재하고, 다른 뇌부위와 달리 세포질에 존재하고, 소뇌의 과립세포(granule cell)와 조롱박세포(Purkinje cell)에서는 핵과 세포질 모두에서 염색 된다고 보고하였는데(Duguid *et al.*, 1995), 이러한 소견은 본 실험의 염색 결과와 일치하였다. 세포질에서 이 단백질의 존재는 아직 밝혀지지 않았지만 미토콘드리아 DNA 와 관련되어 있는 것으로 추정된다. 미토콘드리아 DNA 수복능력은 노화와 관련되어 감소 또는 증가하고, 꼬리핵-조가비핵(caudate-putamen)과 소뇌에서의 내인성 미토콘드리아 DNA 손상은 22 일 된 쥐보다 1 년 된 쥐에서 더 높다고 주장하였다

(Mandavilli *et al.*, 2000). 미토콘드리아가 특정 형태의 DNA 회복을 수행할 수 있다는 증거들이 이런 미토콘드리아 DNA 의 중요성 부각을 가능하게 한다(Mandavilli, *et al.*, 2000; LeDoux and Wilson, *et al.*, 2001; Bohr, 2001)

APE1 가 알츠하이머씨 병의 노인성 반점(senile plaques)에서 높게 발현되는 것은, 이런 반점 형성에 APE1 가 중요한 역할을 하는 것으로 추정된다(Tan *et al.*, 1998). APE 는 신경세포의 손상회복과 신경세포 보호 작용과 관련이 있으며(Kruman *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2007), 퇴행성 뇌질환인 근육위축가쪽경화증(amyotrophic lateral sclerosis; ALS) 환자의 뇌와 척수에서 발현율이 증가하는 것으로 밝혀지고 있다(Shaikh and Martin 2002; Davydov *et al.*, 2003).

뇌의 서로 다른 부분에서 8-oxo-G Glycosylase (OGG1)단백질의 이종과 mRNA 발현이 해마, 뇌겉질(특히 겉질성 피라미드 신경세포), 소뇌(특히 조롱박세포), 시상하부, 뇌줄기 부위에서 매우 높은 것으로 보고 하였는데 이러한 결과는 본 실험 결과와 일치하였다(Verjat *et al.*, 2000).

신경퇴행성 알츠하이머씨 질환에서 해마, 관자엽 일부, 마루엽 일부에서 OGG1 활성도가 감소한다고 보고되었으며, 미토콘드리아 OGG1 이 알츠하이머씨 질환 뇌의 주요 부분(속후각영역, entorhinal cortex)에서 발현이 감소된 것 확인 되었다(Lovell *et al.*,2000;lida et al., 2002;

Mao *et al.*, 2007). 또 다른 신경퇴행성 질환인 파킨스씨 병에서는 흑색질 부위의 미토콘드리아 OGG1 의 유사형태가 높게 발현 된다고 알려져 있다(Fukae *et al.*, 2005). 이러한 결과들로 미루어 이런 퇴행성 질환을 일으키는 산화성 스트레스뿐만 아니라, 이러한 질환들의 발생으로부터 보호 작용을 하는 DNA 수복시스템의 기능 여부도 질환 발생의 주요한 원인이라고 사료된다

이런 병리학적인 소견들을 보이고 있긴 하지만, 앞으로 BER 에 대한 더 많은 연구들이 수행되어야 할 몇 가지 이유는 다음과 같다. 지금까지 이유는 잘 밝혀져 있진 않지만 대부분 뇌의 BER 인자들의 발현수준이 다른 조직에 비해 낮다는 것인데, 현재로는 신경세포들은 이미 분열이 끝난 상태인 것과 관련된 현상으로 추측된다. 최근 밝혀진 바로 미토콘드리아 DNA 의 BER 기능이 매우 활발하여, 경우에 따라서는, 특히 신경세포생존에 있어서는, 핵 BER 보다 더 중요시 되고 있는데, 이들이 노화에 따라 감소하는 것으로 사료된다. 하지만 이런 새로운 주장들은 앞으로 확인되어야 할 문제들을 많이 가지고 있기 때문에 지금으로선 추정에 불과할 뿐이다. 또 노화에 따라 BER 능력감소가 초래되는 이유는 단백질 소실 때문이 아니라, 단백질 불활성화(변성) 때문이라는 주장도 제기되고 있다. 따라서 좀 더 확실한 단백질 표적을 정한 후 단백질 분자들의 기능과 화학적 구성을 분석하는 것이 중요한 열쇠가 될 것으로 여겨지고 있다(Wilson and McNeill, 2007).

ROS 의 생성에 의해 DNA 손상 축적은 세포에 치명적이기 때문에 이들 손상을 수복하는 예방 시스템이 존재한다. DNA 수복 시스템의 뇌에서의 발현 양상은 전체 뇌에 걸쳐 시스템 별로 다양하게 나타났지만, 전체 적으로 소뇌, 해마, 뇌겉질 순서로 잘 관찰되었는데, 그 배경으로는 각 수복 인자의 장기 또는 부위별, 세포별 특이성이 존재할 가능성이 있고, 소뇌와 해마가 잘 발현되는 이유는 조직학적으로 같은 종류의 신경세포들이 밀집되어 있는 특성을 가지고 있기 때문이라고 사료된다.

V 결 론

본 실험에서는 DNA 잘못짜집기 수복(mismatch repair: MMR), DNA 재조합 수복(recombination repair), DNA 염기 절제수복(DNA base excision repair; BER) 등의 DNA 수복 인자들이 흰쥐 중추신경계 뇌에서 노화에 따라 노화에 따라 수복인자들이 감소, 증가 또는 변화 없음을 알 수 있었으며, 이러한 DNA 손상 수복인자들의 노화에 따른 변화는 DNA 손상이 노화에 따라 축적되는 현상과 관련되어, 노화에 따른 여러 퇴행성 신경질환 및 증양 발생의 주요 발병 원인이 될 수 있다고 사료된다. 향후 여기에 대한 집중적인 연구가 이루어짐으로써 노인성 치매 등을 포함한 여러 뇌 관련 질환들의 원인과 치료에 획기적인 전기를 마련할 수도 있을 것으로 기대된다

참 고 문 헌

Bake S and Sohrabji F: 17- β estradiol differently regulates blood-brain barrier permeability in young and aging female rats. *Endocrinology* 145: 5471-5475, 2004

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

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

Belloni M, Uberti D, Rizzini C, Jiricny J, Memo M: Induction of two DNA mismatch repair proteins, MSH2 and MSH6, in differentiated human neuroblastoma SH-SY5Y cells exposed to doxorubicin. *J Neurochem.* 72(3):974-9, 1999

V.A. Bohr: Mitochondrial DNA repair. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 68, pp. 255-256, 2001,

Brooks PJ, Marietta C, Goldman D: DNA mismatch repair and DNA methylation in adult brain neurons. *J Neurosci* 1:16(3):939-45. 1996

Burhans WC, Weinberger M: DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res.* 2007 [Epub ahead of print]

C.E. Coffey, W.E. Wilkinson, L.A. Parashos, S.A.R. Soady, R.J. Sullivan, L.J. Patterson, G.S. Figiel, M.C. Webb, C.E. Spritzer and W.T. Djang : Quantitative cerebral anatomy of the aging human brain. *Neurology* 42: 527-536, 1992

Choi SA, Kim EH, Lee JY, Nam HS, Kim SH, Kim GW, Lee BI, Heo JH: Preconditioning with chronic cerebral hypoperfusion reduces a focal cerebral

ischemic injury and increases apurinic/aprimidinic endonuclease/redox factor-1 and matrix metalloproteinase-2 expression. *Curr Neurovasc Res.* May;4(2):89-97, 2007

d' Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP: A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.*426:194-198, 2003

David P, Efrati E, Tocco G, Krauss SW, Goodman MF: DNA replication and postreplication mismatch repair in cell-free extracts from cultured human neuroblastoma and fibroblast cells. *J Neurosci* 15:17(22):8711-20, 1997

V. Davydov, L.A. Hansen and D.A. Shackelford: Is DNA repair compromised in Alzheimer' s disease?. *Neurobiol Aging* 24: 953-968, 2003

Difilippantonio M J, Zhu J, Chen H T, Meffre E, Nussenzweig M C, Max E E, Ried T and Nussenzweig A: DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 404: 510-514, 2000

Duguid JR, Eble JN, Wilson TM, Kelley MR.: Differential cellular and subcellular expression of the human multifunctional apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) DNA repair enzyme. *Cancer Res.* 55: 6097-6102, 1995.

Esiri MM: Ageing and the brain. *J. Pathol.* 211: 181-187, 2007.

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

D.M. Flaherty, M.M. Monick and G.W. Hunninghake: AP endonucleases and the many functions of Ref-1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25: 664-667, 2001.

Fukae, M. Takanashi, S. Kubo, K. Nishioka, Y. Nakabeppu, H. Mori, Y. Mizuno and N. Hattori: Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Acta Neuropathol (Berl)* 109: 256-262, 2005.

Gorbunova V, Seluanov A, Mao Z, Hine C: Changes in DNA repair during aging: *Nucleic Acids Res.* 2007[Epub ahead of print]

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 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.

Gullo C, Au M, Feng G, Teoh G: The biology of Ku and its potential oncogenic role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1765(2): 223-34, 2006

Harman D: Aging: a theory based on free radical and radiation biology. *J. Gerontol.* 11: 298-300, 1956

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 (g1SV12-6T > C) is a prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 11: [Epub ahead of print] 2007

R. Insausti, K. Juottonen, H. Soininen, A.M. Insausti, K. Partanen, P. Vainio, M.P. Laakso and A. Pitkanen: MR volumetric analysis of the human entorhinal, perirhinal, and temperopolar cortices. *Am J Neuroradiol* 19: 659-671, 1998.

Intano GW, Cho EJ, McManis CA, Walter CA: Age-related base excision repair activity in mouse brain and liver nuclear extracts. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 58(3):205-11, 2003

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

Kashishian A, Douangpanya H, Clark D, Schlachter S T, Eary C T, Schiro J G, Huang H, Burgess L E, Kesicki E A and Halbrook J: DNA-dependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer. *Mol Cancer Ther* 2: 1257-1264, 2003

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

Kinzler K W and Vogelstein B: Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386: 761-763, 1997

Klein A, Miera O, Bauer O, Golfier S and Schriever F: Chemosensitivity of B cell chronic lymphocytic leukemia and correlated expression of proteins regulating apoptosis, cell cycle and DNA repair. *Leukemia* .14: 40-46, 2000

Koike M, Awaji T, Kataoka M, Tsujimoto G, Kartasova T, Koike A and Shiomi T: Differential subcellular localization of DNA-dependent protein kinase components Ku and DNA-PKcs during mitosis. *J Cell Sci* 112: 4031-4039, 1999

Krichevsky S, Pawelec G, Gural A, Effros RB, Globerson A, Yehuda DB, Yehuda AB: Age related microsatellite instability in T cells from healthy individuals. *Exp Gerontol.* 39(4):507-15, 2004

Kruman II, Schwartz E, Kruman Y, Cutler RG, Zhu X, Greig NH, Mattson MP: Suppression of uracil-DNA glycosylase induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 279: 43952-43960, 2004

LeDoux SP and Wilson GL: Base excision repair of mitochondrial DNA damage in mammalian cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68: 273-284, 2001

Iida, A. Furuta, K. Nishioka, Y. Nakabeppu and T. Iwaki: Expression of 8-oxoguanine DNA glycosylase is reduced and associated with neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease brain. *Acta Neuropathol (Berl)* 103: 20-25, 2002.

Lim J W, Kim H and Kim K H: Expression of Ku70 and Ku80 mediated by NF-kappa B and cyclooxygenase-2 is related to proliferation of human gastric cancer cells. *J Biol Chem* 277: 46093-46100, 2002

Lovell MA, Xie C, Markesbery WR: Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res.* 855(1):116-23, 2000

B.S. Mandavilli, S.F. Ali and B. Van Houten: DNA damage in brain mitochondria caused by aging and MPTP treatment. *Brain Res.* 885: 45-52, 2000.

Mao G, Pan X, Zhu BB, Zhang Y, Yuan F, Huang J, Lovell MA, Lee MP, Markesbery WR, Li GM, Gu L: Identification and characterization of OGG1 mutations in patients with Alzheimer's disease. *Nucleic Acids Res.* 35(8): 2759-2766, 2007.

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

Marietta C, Palombo F, Gallinari P, Jiricny J, Brooks PJ: Expression of long-patch and short-patch DNA mismatch repair proteins in the embryonic and adult mammalian brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 53(1-2):317-20, 1998.

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, 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

Morrison JH and Hof PR: Life and death of neurons in the aging brain, *Science* 278: 412-419, 1997.

Muller C, Dusseau C, Calsou P and Salles B: Human normal peripheral blood B-lymphocytes are deficient in DNA-dependent protein kinase activity due to the expression of a variant form of the Ku86 protein. *Oncogene*16: 1553-1560, 1998

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

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.

A. Pfefferbaum, D.H. Mathalon, E.V. Sullivan, J.M. Rawles, R.B. Zipursky and K.O. Lim: A quantitative magnetic resonance imaging study of changes in brain morphology from infancy to late adulthood. *Arch Neurol* 51: 874-887, 1994.

Pucci S, Mazzarelli P, Rabitti C, Giai M, Gallucci M, Flammia G, Alcini A, Altomare V and Fazio V M: Tumor specific modulation of KU70/80 DNA binding activity in breast and bladder human tumor biopsies. *Oncogene* 20: 739-747, 2001.

N. Raz and K.M. Rodrigue: Differential aging of the brain: patterns, cognitive correlates and modifiers. *Neurosci Biobehav Rev* 30: 730-748, 2006.

Rothkamm K, Kruger I, Thompson LH, Lobrich M: Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol Cell Biol* 23: 5706-5715, 2006.

Saleh-Ghafari N, Helleday T: Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res* 32: 3683-3688, 2004.

Sedelnikova OA, Horikawa I, Zimonjic DB, Popescu NC, Bonner WM, Barrett JC: Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 6:168-170, 2004.

Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V: DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(20): 7624-9. 2004

A.Y. Shaikh and L.J. Martin: DNA base-excision repair enzyme apurinic/apyrimidinic endonuclease/redox factor-1 is increased and competent in the brain and spinal cord of individuals with amyotrophic lateral sclerosis, *Neuromolecular Med* 2: 47-60, 2002.

Sheng H, Shao J, Morrow J D, Beauchamp R D and DuBois R N: Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells. *Cancer Res* 58: 362-366, 1998.

Skinner AM, Turker MS: Oxidative mutagenesis, mismatch repair, and aging. *Sci Aging Knowledge Environ.* (9): re3, 2005

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

Sonoda E, Hohegger H, Saberi A, Taniguchi Y, Takeda S: Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair (Arist)* 5: 1021-1029, 2006

Stadtman E: Importance 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 FM, Dianov GL , Bohr VA.: Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product. *Oncogene* 21: 3571-3578, 2002

Z. Tan, N. Sun and S.S. Schreiber: Immunohistochemical localization of redox factor-1 (Ref-1) in Alzheimer' s hippocampus. *Neuroreport* 9: 2749-2752, 1998

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.

Verjat T, Dhénaut A, Radicella JP, Araneda S: Detection of 8-oxoG DNA glycosylase activity and OGG1 transcripts in the rat CNS. *Mutat Res* 460: 127-138, 2000.

Wilson TM, Rivkees SA, Deutsch WA, Kelley MR: Differential expression of the apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/ref-1) multifunctional DNA base excision repair gene during fetal development and in adult rat brain and testis. *Mutat Res* 362: 237-248, 1996.

Wilson DM and McNeill DR: Base excision repair and the central nervous system. *Neuroscience*, 145:1187-1200, 2007

Explanation of Figures

Figure 1. Western Blot analysis for mismatch repair (MMR) protein in rat brain with age. The level of MSH2 protein in aged brain was significantly reduced, compared with young. The level of MSH6 protein in young brain was relatively low, but revealed down-regulated with age. Actin was used as control.

Figure 2. Western Blot analysis for recombination repair (RR) protein in rat brain. The level of Ku80 and DNA-PKCs expression was slightly down-regulated with age, but Ku70 was up-regulated. Actin was used as control

Figure 3. Western Blot analysis for base excision repair (BER) protein in rat brain. The level of MTH1 and OGG1 protein expression was slightly reduced with age, but not in case of APE and NTH. The level of APE expression was relatively high both in young and aged brain. Actin was used as control.

Figure 4. Immunohistochemistry for the mismatch repair factors, MSH2 and MSH6 in the rat hippocampus. Immunoreactivity (IR) for the MSH2 and MSH6 was localized in nucleus of neurons, and diminished with age. (A-B) MSH2 IR showed intense staining in dentate gyrus of young rat (8 weeks old; A), and significantly reduced in aged (100

weeks old; B). (C-D) MSH6 also showed reduced immunoreactivity in CA1 of hippocampus, but not so much as MSH6.

Figure 5. Immunohistochemistry for the recombination repair factors, Ku80 and DNA-PKCs in rat brain. Immunoreactivity(IR) for the Ku80 and DNA-PKCs was diminished with age. (A-B) Ku80 IR showed intense staining in cerebellar cortex of young rat(A), and significantly reduced in aged(B). DNA-PKCs IR also showed reduced immunoreactivity in cerebral cortex(C-D), but not so much as Ku80.

Figure 6. Immunohistochemistry for the base excision repair factors, MTH1, OGG1 and APE in rat brain. Immunoreactivity (IR) for the MTH1 and OGG1 was slightly diminished in aged brain. MTH1 (A-B) and OGG1 IR(C-D) were slightly reduced in aged cerebral of rat, but not APE in cerebellar cortex (E-F). The intensity of APE IR was high both in young and aged brain compared with other BER factors.

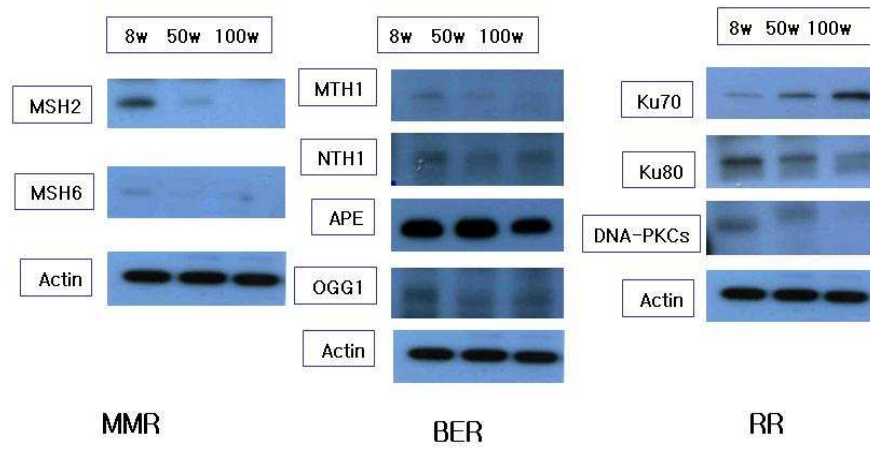
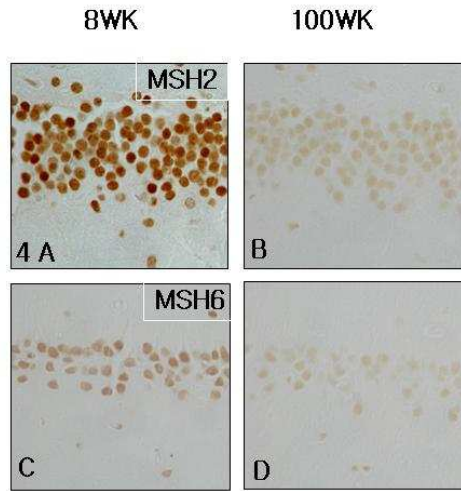
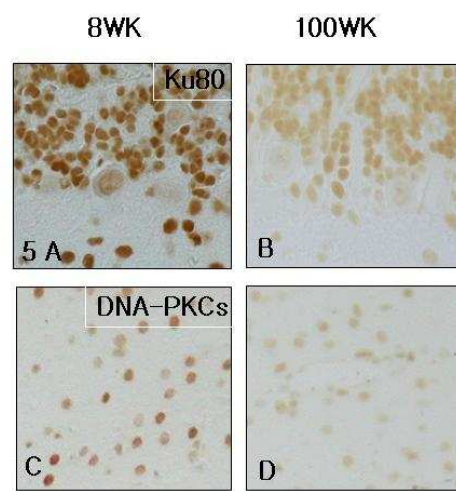


Figure 4



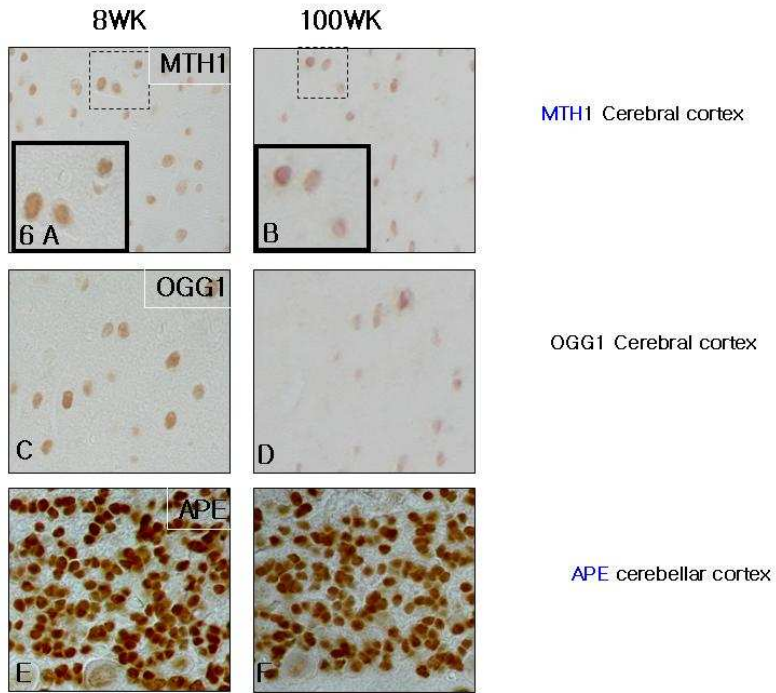
MSH2/6 in rat Dentate gyrus and CA1 of hippocampus

Figure 5



Ku 80 in Cerebellum and DNA-PKCs in cerebral cortex

Figure 6



저작물 이용 허락서

학 과	의	학 번	20047399	과 정	박사
성 명	한글: 김주영 한문 : 金 柱 榮 영문 : Joo-Young Kim				
주 소	전북 부안군 부안읍 봉덕리 583 부안 성모병원				
연락처	063)580-8150	E-MAIL			
논문 제목	한글 : 노화에 따른 신경계의 유전자 손상복구 인자의 변화에 대한 연구				
	영어 : Changes of DNA repair factors with age in nervous system				
<p>본인이 저작한위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 -조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.</p> <p style="text-align: center;">- 다 음 -</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 저작물의 DB 구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에서의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치의 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 허락하였을 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. <p style="text-align: center;">동의여부: 동의(O) 반대 ()</p> <p style="text-align: center;">2007년 12 월 27 일</p> <p style="text-align: center;">저작자: 김주영 (인)</p> <p style="text-align: center;">조선대학교 총장 귀하</p>					