

Glycation propagator에 의한 DNA damage 증가

손태건¹ · 광이섭* · 진영완

동의대학교 레저스포츠학과, ¹부산대학교 약학과

Received January 26, 2004 / Accepted April 18, 2004

Increased DNA Damage Induced by Glycation Propagator. Tae-Gen Son, Yi-Sub Kwak and Young-Wan Jin. *Dept. of Leisure and Sports, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea, ¹Dept. of Pharmacy, Pusan National University* – Glyoxal or methylglyoxal was incubated with catalase in 0.24 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) at 37°C. Dicarbonyls modify and inactivate catalase. Plasmid DNA that is directly incubated with glycation propagators, glyoxal and methylglyoxal, showed different DNA mobility shift compared to normal plasmid DNA. When plasmid DNA is added in Fenton reaction with glycated catalase, plasmid DNA was significantly strand broken and 8-hydroxydeoxyguanosine production was time dependently increased. These results suggest that glycation of antioxidant is synergistic effect to oxidative stress.

Key words – glyoxal, glycation, Fenton reaction, DNA damage

Maillard 반응의 초기반응으로써 non-enzymatic glycosylation인 glycation반응은 glucose와 단백질의 amino group 간에 일어나는 비효소적 축합 반응이다[3,22]. 생체 내에 존재하는 glucose를 비롯한 많은 종류의 환원당 및 α -hydroxy aldehyde 또는 ketose들은 carbonyl compound으로써 free amino group을 가지는 아미노산 및 단백질을 glycation 반응을 일으켜 단백질 등의 생체 고분자들의 기능을 손상시키는 것으로 예상되고 있다[13,2]. 특히, glucose와 fructose등의 체내 환원당과 단백질간의 반응은 당뇨병증, 노화현상들과 관련 지어 연구가 집중되고 있다. 1912년 단백질의 생합성을 연구하고 있던 프랑스의 생화학자인 Maillard가 아미노산과 환원당의 갈색화 반응을 보고한 이래, 주로 식품분야에서 연구되어져 왔던 Maillard 반응이 의학, 생리학 분야의 연구자들에게 주목을 받게 된 것은 1960년대 후반부터였다. Hemoglobin[19], albumin[31], antithrombin[30], HDL, LDL[16]등의 혈장 단백질은 항상 glucose에 노출되어 있어 glycation 반응을 쉽게 받는 것으로 알려져 있고, 이러한 혈장 단백질 이외에도 insulin 등의 hormone 및 Cu, Zn-superoxide dismutase (Cu, Zn-SOD[7,8,12,24,25], lysozyme, myosin ATPase[35], β -N-acetyl-glucosaminidase[4], cathepsin B 등의 효소들도 glycation 반응에 의해 손상을 받는 것으로 보고되고 있다. 생체내의 glycation 반응에 관여하는 glucose 유연물질은 생체 내에 다수 존재하며, 이들과 단백질의 glycation 반응을 통하여 3-deoxyglucosone과 glyoxal, methylglyoxal 등의 다수의 dicarbonyl 화합물이 생성되고, 또한 glucose를 비롯한 단당류와 glyceraldehyde 등과 같은

α -hydroxy-aldehydes 또는 ketones 그리고 glucose adduct 및 glycation 반응의 중간 생성물인 amadori 산물에 의해서도 glyoxal, methylglyoxal 등의 α -ketoaldehyde가 생성됨이 알려지고 있다[6,23,32,36]. α -dicarbonyl 화합물 중에서 glyoxal, methylglyoxal이 생체 내 주요 glycation propagator이며 methylglyoxal이 glyoxal보다 반응성이 높은 것으로 보고되고 있다[5]. 이는 dicarbonyl으로써 유전자 발현 이상, 구조 및 기능 단백질과 효소 등의 기능저하 등을 초래하여 체내 각 조직 및 기관, immune system 및 repair system 등을 손상시키는 것으로 알려져 있다.

Catalase (hydrogen-peroxide: hydrogen peroxide oxidoreductase, EC 1, 11, 1, 6)는 1819년 Thenard[34]에 의해 다양한 조직에서 H₂O₂-cleaving activity가 있는 것으로 밝혀진 이후 1901년 O. Loew[15]에 의해 세상에 널리 알려진 효소이다. 당뇨병 또는 모든 당뇨 합병증 환경에서 glucose의 농도가 높아지게 되면 당이 amino group을 가진 protein과 반응하게 되는 glycation 반응이 일어난다. 따라서 당에 의해 non-enzymatic 변형된 protein은 구조적, 기능적 변화를 갖게 되고, 특히 glycation protein의 아미노산 잔기 중에서 lysine과 arginine잔기가 더 큰 손상을 받는 것으로 보고되었고, catalase도 amino acid sequences 중에서 lysine과 arginine잔기를 11-12% 정도 함유하고 있는 효소이다. 따라서 glycation propagator인 glyoxal 또는 methylglyoxal과 catalase를 반응시킬 경우 catalase는 구조적인 변형과 아울러 기능적인 면에서도 많은 변화를 가져 올 것으로 판단된다. 다시 말해 catalase의 glycation은 H₂O₂를 효과적으로 H₂O와 O₂로 전환시켜주지 못하므로 생체 내 H₂O₂의 농도가 높아지게 된다. 농도가 높아진 H₂O₂는 생체 내 free meta lion과 반응하여 Fenton reaction에 의해 매우 반응성이 큰 hydroxyl radical을 생성하게 된다. 특히 생체 내에서 hydroxyl radical에 의해 손상

***Corresponding author**

Tel : +82-51-890-2213, Fax : +82-51-890-2643

E-mail : ysk2003@deu.ac.kr

이 되기 쉬운 주요 분자는 핵산이고 reactive oxygen species (ROS)에 의한 DNA의 변형은 다양한 형태로 나타난다[21].

Hydroxyl radical이 DNA에 어떠한 손상을 주는지에 대해 최근 여러 보고들이 있으나 크게 purine 및 pyrimidine 염기들의 화학적 변화인 base modification과 deoxyribose의 손상이 유도됨으로서 궁극적으로 backbone이 붕괴되는 DNA 가닥 절단으로 확인할 수 있다[11,18,20,33]. DNA base modification은 8-hydroxyadenine, 8-hydroxyguanine과 이 손상물의 환이 열린 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine, 2,6-diamino-4-hydroxy-5 formamidopyrimidine 등과 cis-thymine glycol (Tg), 5-hydroxy-cytosine 등 약 20개 정도의 염기 손상 물이 DNA의 ionizing radiation으로부터 확인되었다.

특히 DNA base 변형의 주요 adduct로서 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OH-dG)을 확인할 수 있다[15,27,29,34]. Ames[26] 등에 의하면 정상적인 DNA의 경우에도 nuclear DNA의 경우 130,000 base 당 1개 정도의 8-OH-dG가 있다고 보고하고 있고 mitochondria를 다양한 oxidant 환경에 노출시켰을 때 8-OH-dG의 증가를 확인하였다. 그는 mitochondrial DNA에서 8-OH-dG가 크게 증가한 것은 DNA repair system의 문제와 아울러 mitochondria에 histone이 없는 것으로 보고 있으며 이런 결과들이 mitochondrial DNA의 높은 mutation 비율의 원인으로 보고 있다.

이러한 연구결과에 근거하여 본 연구에서는 glycation propagator로 매우 반응성이 큰 것으로 확인된 glyoxal, methylglyoxal과 catalase를 반응시켜 non-glycation catalase와 glycation catalase의 활성변화를 확인하며, 또한 non-glycation catalase와 glycation catalase를 Fenton reaction system에 첨가시켰을 때 DNA damage의 차이를 agarose gel electrophoresis에 의한 DNA 가닥 절단의 확인 (물리적인 방법)과 HPLC-EC를 통해 8-OH-dG 생성 증가 (화학적인 방법)를 확인하려 한다.

실험 재료 및 방법

실험 재료

Bovine catalase와 dicarbonyl로는 40% glyoxal 용액, 6.5 nm methylglyoxal 용액을 Sigma사(USA)로부터 구입하여 사용하였다. calf thymus DNA, standard 8-hydroxydeoxyguanosine과 deoxyguanosine은 Sigma사(USA)로부터 구입하였고 plasmid DNA는 Lab에서 mini-preparation하여 사용하였다. 그 외의 시약은 특급 시약을 사용하였다.

실험 방법

Catalase와 dicarbony (Methylglyoxal, glyoxal)과의 glycation 반응 조건

미생물 번식을 막기 위해 3 nm sodium azide 함유하고 있

는 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4)에 catalase는 5 mg/ml로 Methylglyoxal 과 glyoxal은 10 nm 되도록 용해시켜 37°C에서 반응시켰다. 반응액을 시간대별로 얻어 -20°C에서 보관하여 이후 실험에 사용하였다.

단백질 측정

시간대별로 얻은 반응액을 Bradford assay로 단백질 농도를 측정하여 보정하였다.

Catalase 활성측정

Catalase 활성측정은 Al Giaibone의 방법을 응용하여 catalase에 의해 hydrogen peroxide의 감소량을 240 nm에서 UV spectrophotometer를 이용하여 측정하였다. 20 nm peroxide 용액 (Al Ciaiborne은 240 nm에서 최초 hydrogen peroxide의 흡광도를 0.86으로 추천) 2.8 ml에 catalase 0.2 ml를 첨가시켰을 때 흡광도의 감소량을 측정하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여 실시하였다.

Fenton reaction에서 8-OH-dG 생성측정

Fenton reaction에서 생성된 hydroxyl radical이 특히 deoxyguanosine의 C-8 위치를 공격해 생성된 8-OH-dG의 생성을 HPLC-UVD와 ECD를 이용해 확인하는 방법이다[26,27,29]. Fenton reaction에 non-glycated catalase와 glycation catalase를 첨가하고, calf thymus DNA를 가하여 37에서 2시간 반응시킨다. 반응시킨 후 DNA sample을 SEVAQ로 처리해 DNA와 catalase를 분리한 후 DNA층만 ethanol침전시킨다.

침전시킨 DNA는 beland 방법을 이용하여 가수분해시켜 nucleoside level로 잘라준다. 가수분해시킨 DNA를 HPLC에 주입시켜 260 nm의 UV 흡광도에서 deoxyguanosin의 peak를 확인할 수 있고 electrochemical detector +0.8V에서 8-OH-dG의 peak를 확인할 수 있다.

결 과

Non-glycated catalase와 glycated catalase의 활성 차이 확인

정상 catalase 그리고 glyoxal 또는 methylglyoxal과 반응시켜 만든 catalase의 활성을 확인하기 위해 240 nm에서 spectrophotometer를 이용해서 H₂O₂ 소모되는 정도를 확인하였다(Fig. 1). 정상 catalase는 catalase 활성이 1일에서 20일로 경과함에 따라 18.6, 17.7, 17.5, 16.6 (units/mg)으로 매우 미미하게 감소하였다. 반면 glyoxal과 반응시킨 catalase의 경우는 반응 시간이 1일에서 10일로 경과함에 따라 16.8, 14.8, 7.7 (units/mg)으로 활성이 크게 감소하였다. 특히 반응 시간 20일에서는 catalase의 활성이 거의 모두 상실된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 구조적인 차이에서도 확인할 수 있었다. 전기영동의 결과에서 glycation protein의 dimer, trimer 등과 같은 중합은 확인 할 수 없었지만 정상 catalase와 비교하

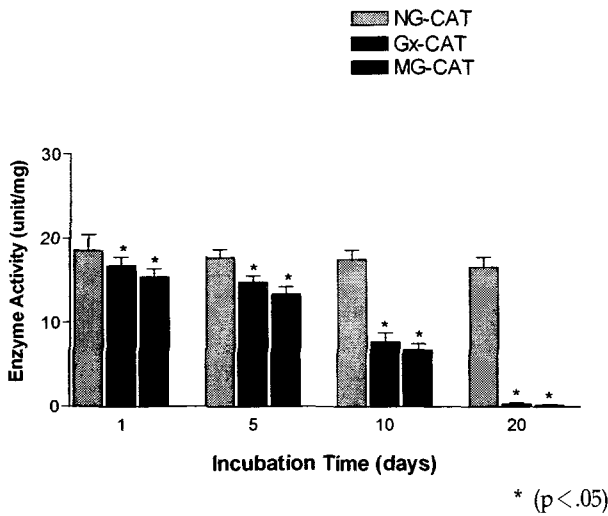


Fig. 1. Comparison of catalase activity incubated with glyoxal or methylglyoxal. NG-CAT: non-glycated catalase. Gx-CAT: glycated catalase by glyoxal. MG-CAT: glycated catalase by methylglyoxal.

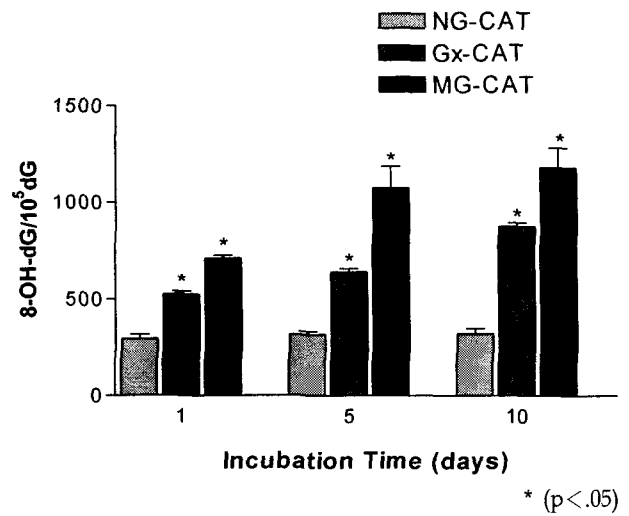


Fig. 2. The formation of 8-OH-dG on Fenton reaction with different catalases. NG-CAT: non-glycated catalase. Gx-CAT: glycated catalase by glyoxal. MG-CAT: glycated catalase by methylglyoxal.

였을 때 glyoxal과 methylglyoxal과 반응시킨 catalase의 경우는 심하게 modification과 degradation됨을 확인할 수 있었다.

Fenton reaction에서의 8-OH-dG의 생성 확인

Hydroxyl radical을 생성시킬 수 있는 Fenton reaction에 calf thymus DNA와 정상 catalase를 반응시킨 후 다시 DNA만을 침전 시키고, 가수분해 시켜 HPLC에 주입시켰다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 정상 catalase에 비해 glyoxal과 methylglyoxal과 반응시킨 catalase에서 DNA 손상의 지표인 8-OH-dG의 생성이 증가함을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 연구 조건에서 정상적인 catalase에 비해 glycation된 catalase가 hydroxyl radical을 효과적으로 제거해 주지 못하여 초래하는 것으로 볼 수 있다. 앞선 catalase 활성 실험 결과와 마찬가지로 8-OH-dG 생성 실험에서도 glyoxal과 반응시킨 catalase가 methylglyoxal과 반응 시킨 catalase보다는 H₂O₂를 더 효과적으로 제거해 주는 것으로 나타났지만 정상적인 catalase에 비해서는 현저히 H₂O₂ 제거 능력이 떨어지는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 catalase와 glycation propagator들과의 반응 시간 의존적인 양상을 보였다.

결 론

본 연구에서는 glycation 반응 과정 동안 다양한 경로를 통해 생성되는 중간 생성물 중 glycation propagator로 알려진 glyoxal, methylglyoxal과 반응시킨 catalase의 활성 변화를 일련의 *in vitro* 실험을 통해 확인하였다.

먼저 glyoxal 또는 methylglyoxal과 함께 반응시킨 cata-

lase가 glycation 반응에 의해 반응시간 의존적으로 catalase 활성이 저하됨을 확인 하였다. 효소가 glyoxal 또는 methylglyoxal과 직접 반응할 경우 효소의 비활성에 기여한다고 하는 연구보고가 있었으며[9], 이러한 반응은 단백질 또는 효소의 active site의 Lys, His, 또는 Arg과 같은 잔기들과 직접 반응하여 나타나는 결과라고 알려져 있다[10].

Glyoxal 또는 methylglyoxal을 DNA와 직접 반응시킨 실험에서 DNA mobility의 차이를 보였다. Glyoxal 또는 10 nm 이상 농도의 methylglyoxal과 DNA를 6시간 동안 반응시킨 후 DNA의 mobility 정도를 확인한 결과, glyoxal 또는 methylglyoxal이 DNA의 여러 아미노 그룹과 반응하여 정상 DNA와는 다른 mobility를 보였다. 항산화 효소인 catalase를 glyoxal 및 methylglyoxal과 반응시켜 비활성시켰을 때 fenton reaction 상에서 생성되는 hydroxyl radical의 저해 효과를 DNA 손상 정도로 확인하였다. Fenton reaction 상에서 정상 catalase와 반응시킨 DNA에 비해 glyoxal 또는 methylglyoxal로 glycation시킨 catalase와 반응시킨 DNA에서 DNA 손상 지표인 8-OH-dG의 생성 정도가 현저히 증가함을 확인 하였다. 결론적으로 glycation 반응을 통해 나타나는 항산화 효소(catalase)의 비활성화는 oxidative 환경을 심화시키는 것으로 보인다.

요 약

Glycation 반응은 glucose와 amino group 간에 일어나는 비효소적 축합 반응인 maillard 반응의 초기 반응으로 non enzymatic glycation 이라고도 한다. 생체내 glycation 반응

을 통해 다수의 dicarbonyl 화합물이 생성 되고, 이들 dicarbonyl들 중에서 매우 반응성이 큰 것으로 확인된 glyoxal과 methylglyoxal과 catalase를 반응 시켜 glycation catalase의 활성 변화를 확인 하였다. Non-glycated catalase에 비해 glycation catalase에서 구조적인 modification과 degradation이 일어났으며, glycation 반응 시간에 따라 활성이 크게 저하되는 것으로 확인 할 수 있었다. 특히 glycation 반응 시간 20일 경과 이후 glycation catalase 경우 활성이 거의 상실한 것으로 나타났다. Glyoxal과 methylglyoxal의 농도를 달리 해서 DNA와 반응 시켜 glycation propagator에 의한 직접적인 DNA damage를 확인 한 결과 Glyoxal과 methylglyoxal의 농도와 반응 시간에 따라 DNA mobility shift의 차이를 나타냈다. Fenton reaction 조건에 glyoxal과 methylglyoxal에 의해 활성이 저하된 catalase를 첨가 시켜 8-OH-dG의 생성을 확인한 결과 두 glycation propagator와의 반응 시간 의존적으로 8-OH-dG의 생성이 증가함을 보였다.

이상의 결과를 통해 glyoxal과 methylglyoxal의 antioxidant의 glycation은 oxidative stress의 증사를 유발해 생체내 활성 산소로부터 방어 기작에 심각한 문제를 야기하는 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- Brain, L. C., A. A. Booth., P. Todd., B. G. Hudson., and R. G. Khalifah. 2003. Unusal susceptibility of heme proteins to damage by glucose during non-enzymatic glycation. *Biophysical Chemistry* **105**, 743-755.
- Brownlee, M., 1955: Advanced Protein Glycosylation in diabetes and aging. *Annu. Rev. Med* **46**, 223.
- Cerami, A. 1985. Hypothesis glucose as a mediator of aging. *J. Am. Geria. Soc* **33**, 626.
- Dolhofer, R., A. Siess and O. H. Wieland. 1982. Inactivation of bovine kidney B-N-Acetyl-D-glucosaminidase by nonenzymatic glycosylation. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. Bd* **363**, 1427-1436.
- Eum, S.Y. 1998. Studies on Glycation Propagator under physiological condition. Ph. D. thesis, Dept. of Food Eng Biotechnology. Yonsei University. Seoul, Korea.
- Hayashi, T and M. Namiki. 1986. Role of sugar fragmentation in early stage browning of amino acid. *Agric. Biol. chem* **50**, 1965.
- Hong, Y. A and J. H. John. 1997. glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *J. Biochem* **382**, 599-605.
- Junichi, F., M. Theingi., O. Ayako., K. Hideaki and T. Naoyuki. 1996. Oxidative stress caused by glycation of Cu, Zn-superoxide dismutase and its effects on intracellular components. *Nephrol. Dial. Transplant.* **11** (Supp15), 34-40.
- Kang, J. H. 2003. Oxidative damage of DNA by the reaction of amino acid with methylglyoxal in the presence of Fe (III) *International journal of biological macromolecules* **33**, 43-48.
- Kang, J. H. 2003. Oxidative damage of DNA induced by methylglyoxal in vitro. *Toxicology. Letters* **145**, 181-187.
- Kasai, H and S. Nishimura. 1984. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic acids research* **12**(4), 2136-2145.
- Katsura, A., M. Shiro., F. Shigeru., I. Hidenobu., I. Kiyoshi and T. Naoyuki 1987. Glycation and Inactivation of Human Cu-Zn-Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem* **262**(35), 16969-16972.
- Kistal, B. S and B. P. Yu. 1992. An emerging hypothesis: Synergistic induction of aging by free radicals and Maillard reaction. *J. Gerontol* **44**, B107-B114.
- Kwon, S. J., K. Kim., H. Kim., I. K. Yoon., and J. W. Park, 1993. Strand breaks in DNA induced by a Thiol/Fe (III)/O₂ mixed Function oxidase system and its protection by a yeast antioxidant protein. *biochemical and Biophysical Research communication* **192**(2), 772-777.
- Loew, O. 1901. U. S. Dept. Agr. Report **68**(47).
- Lyons, T. J. 1992. Lipoprotein glycation and its metabolic on sequences. *Diabetes* **41** (Suppl. 2), 67-73.
- Maritim, A. C., R. A. Sanders., and J. B. Watkins. 2003. Diabetes, Oxidative stress, and antioxidants: A Review. *J. Biochem. Molecular. Toxicology.* **17**(1): 24-38.
- Mark, K. S., J. W. Park., C. C. Kenneth., J. G. Carlos., and N. A. Bruce. 1990. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatograph with electrochemical detection. *Method of enzymology*, **186**, 521-531.
- McDonald, M. J., R. Shapiro., M. Blechman., H. F. Bunn and R. W. Noble. 1979. Functional properties of the glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J. Biol. Chem* **254**, 702-707.
- Mello-Filho, A. C., R. Meneghini. 1991. Iron is the intracellular metal involved in the production of DNA damage by oxygen radicals. *Mutat. Res.* **251**, 109-113.
- Meneghini, R. 1997. Iron homeostasis, oxidative stress, and DNA damage. *Free radical Biology and Medicine* **23**(5), 783-792.
- Monnier, V. M, 1989: Toward maillard reaction in aging. In *The maillard reaction in aging, Diabetes and Nutrition*, Baynes, J. W. and Monnier, V. M, Alan R. Liss Inc. New york, 1-22.
- Nagaraj, R. H., I. N. Shipanova and F. M. Faust. 1996. Protein cross-linking by Maillard reaction-Isolation, Characterization, and in vivo detection of a lysine-lysine Cross-link derived from methylglyoxal. *J. Biol Chem* **271**, 19338-19345.
- Naoyuki, T., K. Hideaki., N. I. Kazi., H. Sakuo., M. Theingi. 1995. Glycation of Metal-Containing Proteins such as Cu, Zn-superoxide Dismutase, Ceruloplasmin, and Ferritin: Possible Implication for DNA Damage in vivo. *Dialysis-Related Amyloidosis Contrib Nephrol*, **112**, 18-23.
- Ookawara, T., N. Kawamura., Y. Kitagawa and N. Taniguchi. 1992. Sitespecific and random fragmentation of Cu,

- Zn-superoxide dismutase by glycation reaction. *J. Biol. Chem* **267**, 18505-18510.
26. Park, J. W., C. C. Kenneth and Ames. B. N. 1989. Detection of DNA adducts by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Carcinogenesis* **10**(5), 827-832.
 27. Park. J. W., A. F. Robert. 1997. Glutathione/Fe³⁺/O₂-mediated DBA Strand breaks and 8-hydroxydeoxyguanosine formation. *BBA*, 263-268.
 28. Philip, E. M., R. T. Dean., and M. J. Davies. 2002. Inactivation of cellular enzymes by carbonyls and protein-bound glycation/glycoxidation products. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **403**, 259-269.
 29. Richard, C., J. W. Park and B. N. Ames. 1988. Normal oxidative damage to mitochondrial DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci* **85**, 6465-6467.
 30. Sakurai, T., J. P. Bissel and F. Bunn. 1988. Nonenzymatic glycation of antithrombin III in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* **964**, 340-347.
 31. Shaklai, N., R. Garlick and H. F. Bunn. 1988. Nonenzymatic glycosylation of human serum albumin alters its conformation and function. *J. Biol. Chem* **259**, 3812-3817.
 32. Shin, D. B., R. Yang., W. C. Shin and S. H. Oh. 1990. Formation of dicarbonyl compound from protein reducing sugar reaction system. *Kor. Biochem. J* **23**, 382.
 33. Standstorm, B. E., M. Granstorm and S. L. Marklund. 1994. Powerful transition-metal ion chelator that inhibit copper-, but potentiates iron-driven, fenton-type reactions. *Free. Radic. Biol. Med* **16**, 177-185.
 34. Thenard. L. J. 1819. *Ann. Chim. Phys* **11**, 85.
 35. Watanabe, H., M. Ogasawara., N. Suzuki., Nishizawa and K. Ambo. 1992. Glycation of myofibrillar protein in aged rat and mice. *Biosci. Biotech. Biochem* **56**, 1109-1112.
 36. Wolff, S. P., M. J. C. Crabbe and P. J. Thornalley. 1984. The autoxidation of glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Experientia* **40**, 244.