

간질환, 심혈관질환 및 당뇨병 등 관련 risk factor인 ADMA(asymmetric dimethylarginine)의 혈중 또는 체액 농도 측정을 위한 RI protein chip 시스템 개발

Development of RI protein chip system for measurement of ADMA as risk factor of liver disease, cardiovascular disease and diabetes

KAERI
고려대학교

제 출 문

한국원자력연구원장 귀하

본 보고서를 2008, 2009 연도 “간질환, 심혈관질환 및 당뇨병 등 관련 risk factor인 ADMA(asymmetric dimethylarginine)의 혈중 또는 체액 농도 측정을 위한 RI protein chip 시스템 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 05. 19

과 제 명 : 간질환, 심혈관질환 및 당뇨병 등 관련 risk factor인 ADMA(asymmetric dimethylarginine)의 혈중 또는 체액 농도 측정을 위한 RI protein chip 시스템 개발

KAERI

과제책임자 : 박길홍

참 여 자 : 안신애
최현미
정경아
장연수

요 약 문

I. 제 목

국문 : 간질환, 심혈관질환 및 당뇨병 등 관련 risk factor인 ADMA(asymmetric dimethylarginine)의 혈중 또는 체액 농도 측정을 위한 RI protein chip 시스템 개발

영문 : Development of RI protein chip system for measurement of ADMA as risk factor of liver disease, cardiovascular disease and diabetes

II. 연구개발의 목적 및 필요성

목적

간질환, 심혈관질환 및 당뇨병 등 여러 질환 관련 risk factor로 대두되고 있는 ADMA(asymmetric dimethylarginine)의 혈중 또는 체액 중 농도를 보다 간편하고 특이적이고 효율적으로 측정함으로써 관련 질병들의 진단과 예후를 손쉽게 예측하기 위하여 방사선동위원소를 이용한 RI protein chip 시스템을 개발한다.

필요성

○ ADMA(asymmetric dimethylarginine)는 NOS(nitric oxide synthase)의 내재성 경쟁적 억제자임 (Cam et al., 2003; Dowling et al., 1998; Leiper and Vallance, 2003; MacAllister et al., 1994; Sydow et al., 2005; Ueda et al., 2003; Vallance et al., 1992; Wells and Holian, 2007). 체액 중 ADMA 수준의 증가는 atherosclerosis, hypercholesterolemia, chronic heart failure, hypertension (Baylis, 2006; Dowling et al., 1998; Eid et al., 2007; Gardiner et al., 1993; Vallance and Leiper, 2004; Vallance et al., 1992; Welch and Wilcox, 1997; Wells and Holian, 2007) 등의 여러 질병과 연관되어 있음. ADMA가 순환계 질병에서 위험인자로 작용하기 때문에 혈중 또는 체액 중 농도를 측정함으로써 관련 질병들의 가능성과 진행정도를 예측하고 진단할 수 있음 (Achan et al., 2003; Boger et al., 1998; Chan and Chan 2002; Sydow et al., 2003; Tarnow et al., 2004; Teerlink, 2005; Valkonen et al., 2005).

○ 당뇨병의 발병기전에도 ADMA가 관련되어 있음이 보고되고 있음(Abbasi et al., 2001; Altinova et al., 2007; Asagami et al., 2003; Evans et al., 2002; Lin et al., 2002; Masuda et al., 1999; Palm et al., 2007; Stuhlinger et al., 2002; Tarnow et al., 2004; Xiong et al., 2003, 2005)

○ 단백질의 posttranslational modification 중 arginine methylation의 중요성이 날로 증가하고 있는데, 이 과정에 의하여 dimethylarginine이 생산됨 (Boisvert et al., 2003).

○ 우리는 이전 연구를 통해 간의 재생 초기에 arginine methylation이 급격히 증가했다가 증식속도가 감소하면서 전체적으로 다시 methylation이 감소하거나 원래 상태로 거의 회복되는 것을 관찰하였음 (An et al., 2009; Kwon et al., 2004)

○ 당뇨병에서 세포와 혈장 내 dimethylarginine이 증가하는 것이 관찰되었으며, 비만, insulin resistance 및 endothelial dysfunction 등이 type 2 당뇨와 밀접히 연관되어 있음 (Chan and Chan, 2002).

○ ADMA는 새로이 주목받는 type 2 당뇨의 위험인자로서 NOS를 억제하여 endothelial dysfunction을 유발함 (Stuhlinger et al., 2002).

○ ADMA는 methylated protein들의 proteolysis에 의하여 형성되며 신장에 의하여 제거되거나 dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)에 의하여 분해됨 (Cam et al., 2003).

○ 사람 혈관 내피세포나 신장 tubular cells 등이 ADMA 합성 및 대사의 주된 장소임 (Palm et al., 2007).

○ 인간유전체 프로젝트의 완성과 더불어, 생물 산업계 전반에서 유전자 분석이나 단백질 분석을 위한 DNA chip 또는 protein chip 등의 초소형 분석 시스템에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 이러한 바이오칩은 2013년에 250억불이라는 막대한 세계시장을 형성할 것으로 예측되고 있어, 우리나라에서도 바이오산업의 대표적 제품으로 육성 개발할 필요가 강력히 대두되고 있음.

○ ADMA는 현재 ELISA kit으로 측정할 수 있으나 수입에 의존하고 있으며, 국내에서 RI-바이오칩이 개발되면 보다 효율적이고 저렴한 측정이 가능함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

○ 이번 연구에서는 당뇨의 발병기전에서 간, 신장, 지방조직, 혈액 등의 protein arginine methylation 및 ADMA 대사의 변화를 관찰하고 NOS 및 DDAH(dimethylarginine dimethylaminohydrolase)의 영향을 연구하여 ADMA가 관련된 당뇨병의 발병기전을 연구함.

○ 이 과정에서 ADMA의 수준을 RI protein chip 기술을 이용하여 보다 간편하고 특이적이고 효율적으로 측정하고자 함. 실험실 수준에서 방사성 동위원소로 label한 후 ADMA가 특이적으로 결합할 수 있는 protein chip상에서 농도를 측정함. Protein chip을 이용할 경우 다량의 샘플을 손쉽게 그리고 동시에 측정이 가능하므로 기존의 HPLC 또는 ELISA 보다 더욱 믿을 만한 데이터를 얻을 수 있

음.

- 이를 위해서 아래의 연구를 수행함.
- RI 적용 ADMA acylation의 반응조건 확립
- RI-labelled succinylated ADMA 항체 제작
- 칩 상의 anti-succinylated ADMA 항체와 RI-labelled ADMA의 반응조건 및 검출기술 확립
- RI 바이오칩 시스템 개발
- RI 바이오칩을 이용한 ADMA 농도 측정의 정확성 평가 및 ADMA 혈중 농의 표준치 확립

IV. 연구개발결과

- 당뇨 발병기전에서 ADMA 및 protein arginine methylation의 역할 연구 : 당뇨 쥐의 당뇨발생과정에서 혈청, 간, 신장, 지방조직 단백질의 arginine methylation의 변화와 ADMA, DDAH, NOS 수준의 변화를 관찰하였음.
- 당뇨쥐인 db/db mice는 당뇨 발생과정에서 고도비만과 fasting hyperglycemia를 나타내었음.
- 당뇨 발생과정에서 혈청과 조직 내 ADMA 수준과 nNOS의 발현이 증가하였으며 DDAH1과 PRMT1(protein arginine methyltransferase 1)의 발현은 감소하였음.
- DDAH 발현의 감소가 ADMA 증가와 관련되어 있는 것으로 사료됨.
- 간과 지방조직의 arginine methylation 양상이 당뇨 발생과정에서 변화하였음 : 간에서는 분자량 75KDa, 60KDa, 52KDa 단백질들이 변화하였으며 지방조직에서는 분자량 38KDa and 25KDa 단백질이 변화하였음.
- 따라서 arginine methylation이 당뇨의 pathogenesis에서 특정한 역할을 할 것으로 사료되었음.
- 또한 DDAH1과 ADMA가 비만 및 당뇨의 발생과 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되었음.
- ADMA 검출 RI 바이오칩 시스템 개발
- ADMA 검출 RI 바이오칩 시스템 컨셉 구축 : ADMA를 succinylation 시키는 반응조건을 확립한 후 succinylated ADMA에 대한 antibody 제작 중.
- Anti-succinylated ADMA antibody 제작 : 항체 제작 및 anti-succinylated ADMA antibody로 도포된 protein chip을 제작.

V. 연구개발결과의 활용계획 및 건의사항

당뇨 및 여러 endothelial dysfunction 관련 질병들의 위험 요인으로 대두되고 있는 ADMA, DDAH1 등의 혈중 농도 및 체액 중 농도의 임상적 중요성을 제고하여 관련 질병에 대한 진단효율을 증가시킬 것으로 기대됨.



SUMMARY

I. Project Title

Development of RI protein chip system for measurement of ADMA as risk factor of liver disease, cardiovascular disease and diabetes

II. Objective and Importance of the Project

ADMA (asymmetric dimethylarginine) is an endogenous competitive NOS (nitric oxide synthase) inhibitor. Elevation of ADMA level in body fluid is related to various diseases including diabetes mellitus, atherosclerosis, hypercholesterolemia, chronic heart failure, and hypertension. Thus, ADMA concentration in blood or tissue fluid can give estimation and diagnosis of risks and progress of related diseases. An essential component of posttranslational modification of protein is arginine methylation, and this is a major source of dimethylarginines. Type 2 diabetes is closely associated with obesity, insulin resistance and endothelial dysfunction that are accompanied by increased levels of intracellular and plasma dimethylarginines. Thus, ADMA is a novel risk factor for type 2 diabetes that inhibits NOS and causes endothelial dysfunction. It is formed during proteolysis of methylated proteins and removed by renal excretion or metabolic degradation by dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH). Several cell types, including human endothelial and tubular cells are capable of synthesizing and metabolizing ADMA. Our goal was to elucidate the role for ADMA and protein arginine methylation in the pathogenesis of diabetes and develop RI protein chip system for easy determination of ADMA levels in blood or tissues.

III. Scope and Contents of Project

We have observed the changes of ADMA, DDAHs, NOSs and arginine methylation of organ proteins of serum, adipose tissue, liver and kidney during the development of diabetes in diabetic mice.

IV. Result of Project

The db/db mice developed significant obesity, fasting hyperglycemia during diabetogenesis. During diabetogenesis, expressions of the ADMA and nNOS increased, and DDAH1 and PRMT1 decreased in the db/db mice. Decreased DDAH1 expression was postulated to be the cause of the increased ADMA. Arginine methylation of the liver and adipose tissue changed during the period of diabetogenesis. Changes showed at proteins with molecular weights of 75KDa, 60KDa, and 52KDa in the liver and 38KDa and 25KDa in the adipose tissue. Collectively, DDAH1 and ADMA are closely associated with the development of obesity and diabetes, and arginine methylation levels of some proteins changed during the course of development of diabetes, indicating their possible involvement in the variation in ADMA levels. Development of RI protein chip system using radioisotope is necessary for the convenient measurement of ADMA levels for the determination of diagnosis and prognosis of related diseases. The present study was to develop a RI protein chip for convenient, specific and efficient determination of ADMA level, which could give higher sensitivity than those by HPLC or ELISA. The concept of theoretical and experimental implementation method was devised such that ADMA measurement was performed by acylation of ADMA in body fluid with radio-labelled succinic acid, and subsequent binding of the complex with ADMA-specific antibody coated on chip. To accomplish the procedure, following research was conducted as establishment of acylation condition of ADMA with radio-labelled succinic acid. We developed prototype of RI-protein chip system for the determination of ADMA. In conclusion, we demonstrated that ADMA regulated by protein arginine methylation, DDAH1, and NOS plays some role in the pathogenesis of diabetes mellitus.

V. Proposal for Applications

Further evaluation with MALDI TOF & MS analysis of the proteins that showed changes in arginine methylation levels will identify proteins that contribute to the pathogenesis of diabetes mellitus.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction

A. Objectives

B. Necessity

C. Scope

Chapter 2. Status of technology development at home and abroad

A. Status of technology development in the related fields in domestic and foreign countries

B. Technology level of R&D results in the status of technology development in domestic and foreign countries

Chapter 3. R&D contents and results implementation

A. Theoretical and experimental implementation method

B. R&D Contents

C. R&D Results

Chapter 4. Accomplishment and external contribution of R&D object

A. Necessity for further research

B. Application to other research

C. Industrialization strategy

Chapter 5. Plans for R&D results

Chapter 6. Reference

Chapter 7. References

목 차

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

제 2 절 필요성

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발현황

제 2 절 국외 기술개발현황

제 3 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용

제 2 절 연구결과

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

제 2 절 타연구에의 응용

제 3 절 기업화 추진방안

제 6 장 참고문헌

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발의 목적

1. 최종목표 및 내용

최종목표	내용
간질환, 심혈관질환 및 당뇨병 등 여러 질환 관련 risk factor로 대두되고 있는 ADMA(asymmetric dimethylarginine)의 혈중 또는 체액 중 농도를 보다 간편하고 특이적이고 효율적으로 측정함으로써 관련 질병들의 진단과 예후를 손쉽게 예측하기 위하여 방사선동위원소를 이용한 RI protein chip 시스템 개발.	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA가 관련된 당뇨병의 발병기전 연구 · ADMA와 radio-labelled succinic acid의 acylation 조건 결정 · Anti-ADMA 항체로 코팅된 바이오칩 제작 · Succinylated ADMA와 칩 상의 anti-succinylated ADMA 항체 간의 결합조건 결정 · RI 바이오칩을 이용한 ADMA 농도 측정의 정확성 평가, ELISA와의 민감도 비교 분석 및 ADMA 혈중 농도의 정상치 확립 · 진단키트 시제품 제작

2. 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	년도	연구개발목표	연구개발내용	연구범위
1차년도	2008	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA의 당뇨병 발병기전에서의 역할 연구 · RI 바이오칩 적용 검출법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA 및 protein arginine methylation이 관련된 당뇨병의 발병기전 연구 · RI 적용 ADMA acylation의 반응조건 확립 · RI-labelled succinylated ADMA 항체 제작 	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA 대사에 미치는 protein arginine methylation, DDAH, NOS의 영향 및 당뇨병 발병기전에서 ADMA의 관련성 연구 · RI-labelled succinylate와 ADMA의 반응 조건 확립

2차년도	2009	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA의 당뇨병 발병기전에서의 역할 연구 · RI 검출기술 이용 바이오칩 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA 및 protein arginine methylation이 관련된 당뇨병의 발병기전 연구 · RI-labelled succinylated ADMA - 항체간의 상호작용 및 반응조건 확립 · RI 바이오칩 시스템 개발 · RI 바이오칩 이용 ADMA 농도 측정의 정확성 평가, ELISA와의 민감도 비교 분석 및 ADMA 혈중 농도의 정상치 확립 · 진단키트 시작품 제작 	<ul style="list-style-type: none"> · 당뇨병 발병기전에서 ADMA의 관련성 연구 · 방사선 동위원소 labelling된 acyl기 도입된 ADMA와 ADMA 항체와의 반응 최적 조건 확립. · 칩 상의 ADMA 항체와 acylation된 ADMA와의 반응 시스템 개발 · 개발된 RI 바이오칩 시스템의 정확도 및 민감도 분석 · RI 검출기술 이용 바이오칩 시제품 제작
------	------	---	--	---

제 2 절 연구 개발의 필요성

1. 기술적 측면

- 체액 중 ADMA 수준의 증가는 atherosclerosis, hypercholesterolemia, chronic heart failure, hypertension (Baylis, 2006; Dowling et al., 1998; Eid et al., 2007; Gardiner et al., 1993; Vallance and Leiper, 2004; Vallance et al., 1992; Welch and Wilcox, 1997; Wells and Holian, 2007) 등의 여러 질병과 연관되어 있음. ADMA가 순환계 질병에서 위험인자로 작용하기 때문에 혈중 또는 체액 중 농도를 측정함으로써 관련 질병들의 가능성과 진행정도를 예측하고 진단할 수 있음 (Achan et al., 2003; Boger et al., 1998; Chan and Chan 2002; Sydow et al., 2003; Tarnow et al., 2004; Teerlink, 2005; Valkonen et al., 2005).
- 당뇨병의 발병기전에도 ADMA가 관련되어 있음이 보고되고 있음 (Abbasi et al., 2001; Altinova et al., 2007; Asagami et al., 2003; Evans et al., 2002; Lin et al., 2002; Masuda et al., 1999; Palm et al., 2007; Stuhlinger et al., 2002; Tarnow et al., 2004; Xiong et al., 2003, 2005)
- 당뇨병에서 세포와 혈장 내 dimethylarginine이 증가하는 것이 관찰되었으며, 비만, insulin resistance 및 endothelial dysfunction 등이 type 2 당뇨와 밀접히 연관되어 있음 (Chan and Chan, 2002).
- ADMA는 새로이 주목받는 type 2 당뇨의 위험인자로서 NOS를 억제하여

endothelial dysfunction을 유발함 (Stuhlinger et al., 2002).

○ ADMA 측정은 현재 ELISA kit 등을 사용하나 국내에서 생산이 안 되고 있으므로 RI-바이오칩을 이용한 보다 효율적이고 저렴한 측정 kit의 개발이 요구됨

○ 방사성 동위원소 관련 연구 및 RI를 이용한 방사성 의약품의 경우는 진단 및 치료 분야에서 매우 중요한 역할을 하지만 환자의 동의와 의사와 연구자의 협조에 의해 활용이 가능하므로 동위원소를 kit 혹은 chip 형태로 응용함으로써 일반 방사성의약품 보다 쉽게 접근이 가능한 형태로 만들고자 함. 따라서 개발 후 쉽게 산업화가 가능할 것이며 수요 또한 많을 것으로 사료되므로 사업이 추진되어야 함.

○ 생물 공학적 이용분야의 확대를 위해 현재까지 연구용이 주종을 이루고 있는 바이오칩 시장을 방사성 동위원소를 적용한 진단용 바이오칩 분야로의 활성화와 더불어, 맞춤, 예측의학으로의 패러다임 전환과 타 분야와의 새로운 기술접목, 질병관련 유전자 마커 정보의 급격한 확대, 방사성 동위원소 및 새로운 단 반감기 방사성의약품의 전달시스템(또는 전달체)을 개발하여 난치병과 같은 의료적 이용 한계에 도전하고, 유전자를 이용한 신약개발 시대에 발맞추어 획기적인 RI 적용 검출기술을 이용한 SNPs(Single Nucleotide Polymorphisms) 연구의 참여로 종합적이고 고유한 생물정보시스템구축을 이뤄야 할 필요가 있음.

2. 경제 · 산업적측면

○ 생명공학 관련 연구의 경우 장기간의 연구기간이 소요되고 학술적인 연구 성과물의 생산이 응용연구에 비하여 상대적으로 낮으나 본 연구는 RT/BT 융합기술이라는 독창성과 창의성이 확보되어 있으므로 학술적인 성과 및 다양한 산업 분야에 응용할 수 있는 기초기반의 확보를 기대할 수 있음.

○ 단백질은 생명체의 구조와 기능의 기본 물질이며, 인체질병과 직접적으로 관련이 있으므로 진단 및 치료제 개발에 중요한 연구 대상이며 유전자 칩에 이어 단백질 칩은 단백질의 발현과 기능을 분석하고, 효소, 호르몬 항체 등의 신약개발을 위한 초고속 탐색 기술로 이용될 수 있음.

3. 사회 · 문화적측면

○ 전략적 사업추진 계획수립 및 실행을 통하여 원자력기술의 대국민 신뢰성을

제고하고 원자력문화의 저변확대에 기여할 것임.

○ 방사선의 생명과학적 연구를 통해 방사선 및 방사성동위원소의 산업적/의학적 활용성 증대가 필요함

- 정부의 정책적 지원으로 향후 방사선 및 방사성 동위원소 이용 산업체 수와 종사자의 수가 급격히 증가할 전망이다.

- 현재 사망원인 1위를 차지하는 암의 경우 그 진단 및 치료에 있어 방사선 활용이 크게 증가하고 있음.

- 또한 기존의 감마선 이외에 양성자, 중성자, 중이온빔 등의 의학적 활용이 증대될 것으로 예상되어 방사선의 효율적 활용을 위한 생명과학적 기초연구 및 의학적 효과 증대를 위한 생체조절물질 연구가 필요함.

제 3 절 연구개발의 내용 및 범위

○ ADMA(asymmetric dimethylarginine)는 NOS(nitric oxide synthase)의 내재성 경쟁적 억제자임. 체액 중 ADMA 수준의 증가는 atherosclerosis, hypercholesterolemia, chronic heart failure, diabetes mellitus, and hypertension 등의 여러 질병과 연관되어있음. ADMA가 순환계 질병에서 위험인자로 작용하기 때문에 혈중 또는 체액 중 농도를 측정함으로써 관련 질병들의 가능성과 진행도를 예측하고 진단할 수 있음.

○ 우리는 이전 연구를 통해 간의 재생 초기에 arginine methylation이 급격히 증가했다가 증식속도가 감소하면서 전체적으로 다시 methylation이 감소하거나 원래 상태로 거의 회복되는 것을 관찰하였음.

○ 이번 연구에서는 특별히 당뇨병과 관련하여 ADMA 및 protein arginine methylation의 중요성을 연구하고자 함.

○ ADMA 측정은 현재 ELISA kit을 이용하고 있는데 RI-단백질 칩을 개발하면 보다 효율적이고 저렴한 측정이 가능할 것으로 사료됨.

○ 이를 위해서 ADMA의 동위원소 라벨링 조건과 chip에 코팅될 anti-ADMA 항체와의 상호작용의 최적화가 필수적이며 아래의 연구를 수행함.

- RI 적용 ADMA acylation의 반응조건 확립
- Succinylated ADMA 항체 제작
- RI-labelled succinylated ADMA - 항체간의 상호작용 및 반응조건 확립
- RI 바이오칩 시스템 개발

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내 기술개발현황

○ Protein arginine methylation은 간의 재생 초기에 급격히 증가했다가 증식속도가 감소하면서 전체적으로 다시 methylation이 감소하거나 원래 상태로 거의 회복이 되어서 세포의 생리활성에서 중요한 조절인자로 작용할 가능성이 대두됨 (Kwon et al., 2004). 이 때 arginine methylation의 변화가 큰 단백질들 중에는 세포의 산화 stress 관련 단백질이 많음(An et al., 2009).

○ 인간유전체 프로젝트의 완성과 더불어, 생물 산업계 전반에서 유전자 분석이나 단백질 분석을 위한 DNA chip 또는 protein chip 등의 초소형 분석 시스템에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔으며, 이러한 바이오칩은 2013년에 250억불이라는 막대한 세계시장을 형성할 것으로 예측되고 있어, 우리나라에서도 바이오산업의 대표적 제품으로 육성 개발할 필요가 강력히 대두되고 있음.

○ 현재, 국내 DNA 칩 기술 동향을 살펴보면, 제조 및 분석 수준은 국제적인 수준에 도달하여 있지만, 상대적으로 선진국에 비하여 연구개발 투자가 늦게 이루어져, 바이오칩개발을 위한 원천 요소기술들을 이미 선진국에 많이 빼앗긴 상황임.

○ 첨단기술의 이전이 용이치 않은 지금, 우리나라가 막대한 바이오칩시장의 일부라도 점유할 수 있는 방법은, 바이오칩 제작에 필요한 신규 요소기술을 확보하는 것과, 바이오칩에 올라갈 콘텐츠 개발의 확보를 위해 국가 연구개발 과제 및 칩 전문기업의 연구개발 등을 통하여 경쟁력을 확보해야 함.

○ 더 나아가 바이오칩 콘텐츠 확보는 물론, 바이오 칩 제조 기술, 시료 전처리 기술, 신호 검출 및 데이터 해석 기술, 칩의 임상 응용 기술 등의 바이오칩 관련 기술의 개발이 시급함.

○ 우리나라는 미국에 비해 기술력이 다소 뒤져 연구개발용, 임상진단용 바이오칩이 속속 개발되고 있으나 아직 본격적인 상업화 궤도에는 오르지 못하는 실정임.

○ 특히 국내 관련기업들이 관련 원천기술 특허를 확보하지 않아 향후 시장 확대에 따른 특허 분쟁 등의 우려도 나오고 있지만 정부는 2010년 세계 7위권 바이오산업 강국으로 육성한다는 목표로 ‘바이오전략회의’를 신설하고 BT와 IT 융

합분야의 발전을 위한 BIT 산업화지원센터를 구축해 바이오칩을 차세대 신성장 동력산업 기술의 하나로 채택했으며, 6천억 원규모의 예산이 투입될 전망이다.

○ 부처별로 과기부가 단백질칩, 산자부는 랩온어칩, 복지부는 진단용 DNA 칩 개발에 주력키로 했음. 삼성 등 일부 대기업이 산하 연구기관을 통해 바이오칩개발에 나서고 있으며 4백여 개의 벤처기업들이 연구에 전력을 기울이고 있음.

○ 국내 바이오 칩 관련 대표적인 산업체로는 게놈 칩, 올리고 칩을 생산하는 마이크로젠, HPV, 결핵 진단용 칩을 생산하는 바이오메드랩, 마이진, 굿젠 등이 있으며, 최근 대학에서는 바이오칩 기술개발 연구의 일환으로 뇌의 작용 기전을 밝히는 데 있어 매우 중요한 뇌의 신경망의 형태(morphology)와 동적 특성(dynamic property)의 관계를 연구하는 데 있어 바이오칩(multi microelectrode plate, MMEP)을 이용한 연구가 진행 중에 있음.

제 2 절 국외 기술개발현황

○ ADMA(asymmetric dimethylarginine)는 NOS(nitric oxide synthase)의 내재성 경쟁적 억제자임 (Cam et al., 2003; Dowling et al., 1998; Leiper and Vallance, 2003; MacAllister et al., 1994; Sydow et al., 2005; Ueda et al., 2003; Vallance et al., 1992; Wells and Holian, 2007). 체액 중 ADMA 수준의 증가는 atherosclerosis, hypercholesterolemia, chronic heart failure, hypertension (Baylis, 2006; Dowling et al., 1998; Eid et al., 2007; Gardiner et al., 1993; Vallance and Leiper, 2004; Vallance et al., 1992; Welch and Wilcox, 1997; Wells and Holian, 2007) 등의 여러 질병과 연관되어 있음. ADMA가 순환계 질병에서 위험인자로 작용하기 때문에 혈중 또는 체액 중 농도를 측정함으로써 관련 질병들의 가능성과 진행정도를 예측하고 진단할 수 있음 (Achan et al., 2003; Boger et al., 1998; Chan and Chan 2002; Sydow et al., 2003; Tarnow et al., 2004; Teerlink, 2005; Valkonen et al, 2005).

○ 당뇨병의 발병기전에도 ADMA가 관련되어 있음이 보고되고 있음 (Abbasi et al., 2001; Altinova et al., 2007; Asagami et al., 2003; Evans et al., 2002; Lin et al., 2002; Masuda et al., 1999; Palm et al., 2007; Stuhlinger et al., 2002; Tarnow et al., 2004; Xiong et al., 2003, 2005)

○ 단백질의 posttranslational modification 중 arginine methylation의 중요성이 날로 증가하고 있는데, 이 과정에 의하여 dimethylarginine이 생산됨

(Boisvert et al., 2003).

○ 우리는 이전 연구를 통해 간의 재생 초기에 arginine methylation이 급격히 증가했다가 증식속도가 감소하면서 전체적으로 다시 methylation이 감소하거나 원래 상태로 거의 회복되는 것을 관찰하였음 (An et al., 2009; Kwon et al., 2004)

○ 당뇨병에서 세포와 혈장 내 dimethylarginine이 증가하는 것이 관찰되었으며, 비만, insulin resistance 및 endothelial dysfunction 등이 type 2 당뇨와 밀접히 연관되어 있음 (Chan and Chan, 2002).

○ Asymmetric dimethylarginine (ADMA)은 새로이 주목받는 type 2 당뇨의 위험인자로서 NOS를 억제하여 endothelial dysfunction을 유발함 (Stuhlinger et al., 2002).

○ ADMA는 methylated protein들의 proteolysis에 의하여 형성되며 신장에 의하여 제거되거나 dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH)에 의하여 분해됨 (Cam et al., 2003).

○ 사람 혈관 내피세포나 신장 tubular cells 등이 ADMA 합성 및 대사의 주된 장소임 (Palm et al., 2007).

○ 2000년 하버드 대학의 Schreiber 연구팀에 의해 단백질 마이크로어레이 기술이 최초로 소개 되었는데(MacBeath et al., Science, 2000), DNA arrayer를 이용하여 1만개 이상의 단백질을 1개의 슬라이드 글라스 위에 고정시킨 뒤 형광물질로 표지된 단백질을 반응시킨 후 DNA chip reader를 이용하여 단백질의 상호작용을 분석함.

○ 2001년 예일 대학의 Snyder 교수에 의해 Yeast proteome chip이 개발되어 Protometrix가 설립되었고, 2003년 yeast proteome 에서 유래한 4300개의 단백질이 심어진 yeast proteome chip을 개발하여 시판에 들어감.

○ Zyomix 사는 3차원적 pillar type의 단백질 칩 표면 기술을 개발하여 각 기둥의 팁에 단백질 콘텐츠를 올림으로써 비 특이적 결합을 최소화시켰고, parallel dispensing 기술을 적용함으로써 Micro arrayer 없이도 단백질의 패터닝이 가능하도록 하였음.

○ UC 버클리의 Groves 교수 그룹은 생체막 관련 단백질을 실리콘 표면의 lipid bilayer에 micropatterning을 할 수 있는 기술을 보유하고 있으며, 이 기술은 현재 신약 개발의 가장 주요한 표적이 되고 있는 GPCR 막 단백질을 protein array화함으로써 신약 후보물질 스크리닝 분야에서의 광범위한 응용이 기대되고

있음.

○ 질병 진단 과 biomarker 탐색의 선구적인 예로 Chinnaiyan 그룹에서 146개의 항체로 구성된 항체 chip을 이용하여 방사선 처리한 LoVo colon carcinoma cell 과 그렇지 않은 cell에서의 단백질의 발현양상을 비교 분석하였고 각각의 단백질들이 방사선 처리에 의한 세포의 변화에 어떠한 영향을 미치는지 기존의 문헌 연구를 통해 확인하였음.

○ Hanash 그룹의 연구에서 Nitrocellulose membrane 위에 84종류의 항체를 고정화 시켜 antibody chip을 제작하였고, 이를 이용하여 24명의 폐암환자의 혈청과 56명의 정상적인 사람에게서 얻은 혈청을 비교 분석하여 7가지 종류의 단백질이 폐암을 진단하는데 활용될 수 있다는 가능성을 보여 줌(Gao WM et al., BMC cancer, 2005).

○ Snyder 그룹에서 SARS(severe acute respiratory syndrome)의 진단을 위해 SARS coronavirus 등의 미생물로부터 얻어낸 단백질들로 protein chip을 제작하여 혈청 내에 SARS의 항체가 존재하는지를 분석하여 90%에 이르는 특이성과 민감도를 갖는 진단 및 예측이 가능하였음(Zhu H et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2006).

○ 1977년 Carnegie 연구팀에 의해 이미 간 질환을 앓는 환자들의 소변에서 ADMA가 증가되는 것을 밝혀냄. ADMA가 간 질환의 진단 마커로서 활용될 수 있는 가능성이 제시 됨.

제 3 절 연구결과가 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

○ ADMA 대사에 미치는 protein arginine methylation, DDAH, NOS의 영향 및 당뇨병 발병기전에서 ADMA의 관련성을 제시하여 당뇨병의 이해 증진에 이바지하였음.

○ 생물학 연구도 이제는 단위 생물개체를 총체적으로 접근할 수 있는 시스템적 연구를 필요로 하고 있으며, 연구방법 또한 극미량의 실험재료로서 다량의 실험을 동시에 수행할 수 있는 새로운 접근을 필요로 하고 있음. 유전자, 단백질, 세포 등을 이용한 생물정보 분석 및 이용기술에 있어서 바이오칩은 핵심적인 역할을 수행할 것으로 예견되어 짐.

○ 방사선 융합기술을 이용한 생명공학적 이용 기초기반 연구는 기술간 융합에

서 핵심원천기술로서 학문적, 기술적 파급효과가 매우 큼.

○ 방사선융합기술을 이용한 창의적 신기술 개발로, post-genome 시대의 질환 규명/예방/치료 분야의 세계적 선도기술 확보가 가능할 것으로 기대됨.



제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구내용

1. 당뇨병의 간조직에서 asymmetric arginine dimethylation의 변화에 대한 연구

가. 당뇨병의 지방간에서의 ADMA의 변화와 PRMT1(protein arginine methyltransferase 1; 세포내에서 모든 종류의 PRMT 양의 90%를 차지하며 단백질의 arginine을 asymmetric methylation시킨다.)의 발현변화 양상 관찰

- Asymmetric dimethylarginine이 존재하는 단백질을 인지할 수 있는 항체인 ASYM24로 Western blotting을 수행하여 당뇨병의 지방간에서의 asymmetric dimethylarginine의 변화를 관찰함.

- 당뇨병은 1996년 Jackson Labs에서 처음 개발된 비만쥐인 db/db mouse를 사용함. 당뇨를 발현시키는 형질은 제4염색체 상의 단일열성유전자(db)에 의해 지배되는데, 이 당뇨병은 그 diabetic gene(db)이 G에서 T로 인코딩되어 렙틴수용체(leptin receptor)의 점 돌연변이가 일어난 쥐로 시상하부에서의 렙틴 신호의 부족으로 영구적인 식욕 이상항진증과 비만이 생겨 결과적으로 렙틴과 인슐린의 높은 수준을 유도함. 호모 마우스(db+/db+)는 번식능이 없으므로 misty1유전자(m)를 마커로 해서 헤테로(db+/+m)끼리 교배한 것임. 그러므로 db쥐의 control로 misty(+m/+m)를 사용함. db쥐는 5주 이상이 되면 당뇨가 발현됨. 그래서 5주(당뇨초기), 7주(당뇨중기), 9주(당뇨말기)의 protein arginine methylation의 변화를 비교, 관찰하였음.

- 5주(당뇨초기), 7주(당뇨중기), 9주(당뇨말기)의 실험군과 대조군의 혈액, 지방조직, 간, 신장에서 ADMA, DDAH, s NOSs 등의 변화를 비교, 관찰하였음

2. ADMA 농도 측정을 위한 전처치로서 acylation

가. 트리튬(3H)으로 label된 succinyl-coenzyme A(CoA), 또는 Succinic anhydride-1,4-14C 준비

나. ADMA의 acylation 반응 조건의 최적화

- ADMA 5 mg을 0.1 M NaCl + 8 M deionized urea buffer 5 ml에 녹임.
- 용액의 pH를 확인하면서 실험 진행.
- succinic anhydride를 0.5 mg씩 15분 간격으로 1시간 동안 넣어줌.
- pH는 2 N NaOH 첨가로 7.5-8.5사이로 유지 (sodium hydroxide)
- 반응시간은 1-2시간

3. ADMA antibody 제작

NG,NG-Dimethylarginine dihydrochloride(Sigma)에 KLH conjugation시키고 rabbit에 injection하여 polyclonal antibody 제작

제 2 절 연구결과

1. ADMA의 당뇨병 발병기전에서의 역할

가. 당뇨 발생과정에서 체중, fasting plasma glucose level의 변화

- C57BLKs/J db/db mouse에서 생후 10일에 hyperinsulinemia가 관찰되었으며 1달째에 혈당 수준이 증가하기 시작하였음

- db/db mice는 wild-type과 heterozygous mice에 비하여 inguinal과 axillary 부위에 지방 축적이 증가하였음. 점차 음식과 수분 섭취량이 증가하면서 생후 4-5주까지 체중이 지속적으로 증가하였음.

- db/db mice는 생후 5주부터 거동과 음식 섭취가 어려울 정도로 비만을 나타내었으며 fasting hyperglycemia($P < 0.05$)를 나타내어서 비만과 당뇨 동물 model로 적합한 것으로 판명되었음.

- 호모마우스(db+/db+)는 5주 이상이 되면 당뇨가 발현된다고 알려져 있는데, 이번 실험에 사용한 misty mouse(+m/+m)와 호모마우스(db+/db+)의 glucose 수 준을 측정 한 결과 생후 5주, 7주, 9주 모두 당뇨가 진행되고 있음을 확인하였음. 그래프의 수치는 각각 6마리씩 측정하여 평균한 값임 (Fig. 1, 2).

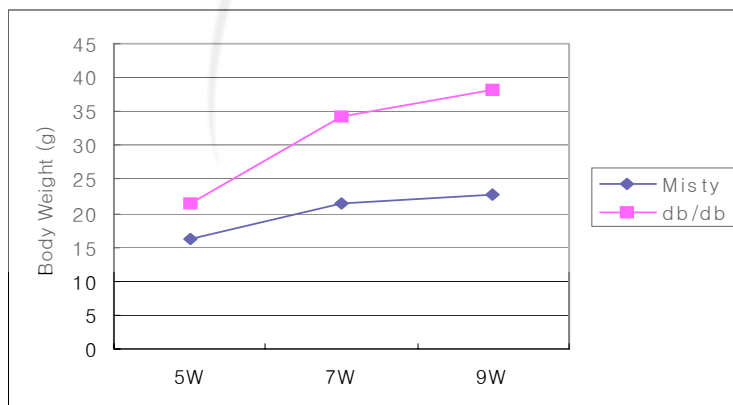


Fig. 1. Changes of body weight

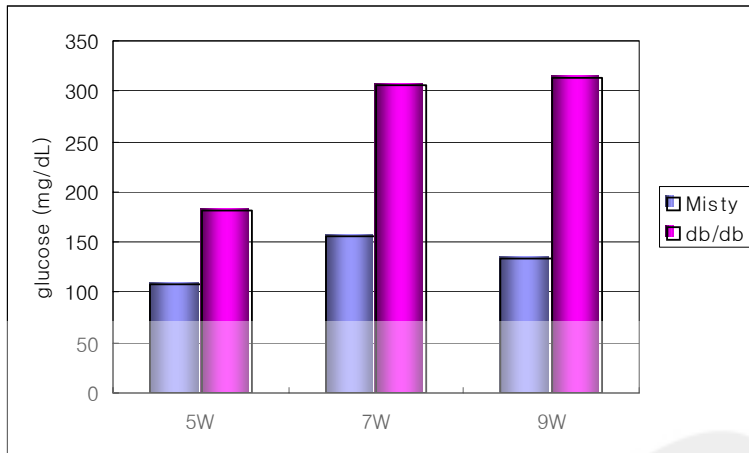


Fig. 2. Changes of fasting venous glucose level

나. ADMA 수준과 비만 및 당뇨 발생기전과의 관련성

- 혈청, 신장 및 간의 ADMA 수준이 db/db mice에서 실험기간 중 증가하였음 ($P < 0.05$, Fig. 3). 신장과 간의 ADMA 수준이 혈청의 수준보다 높았음.

KAERI

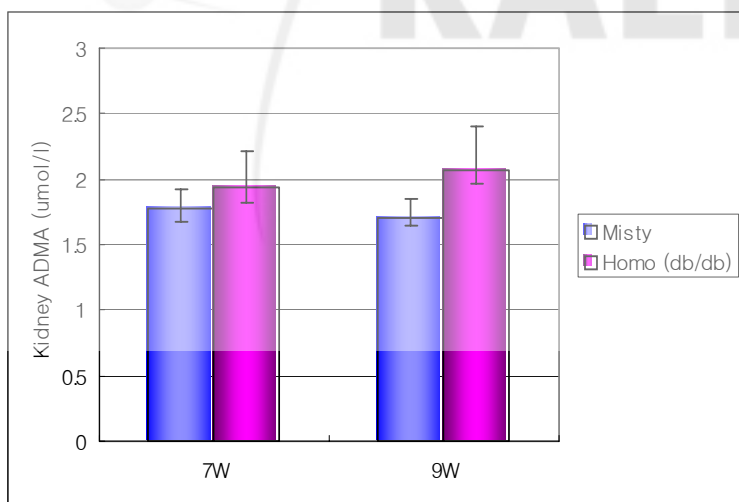
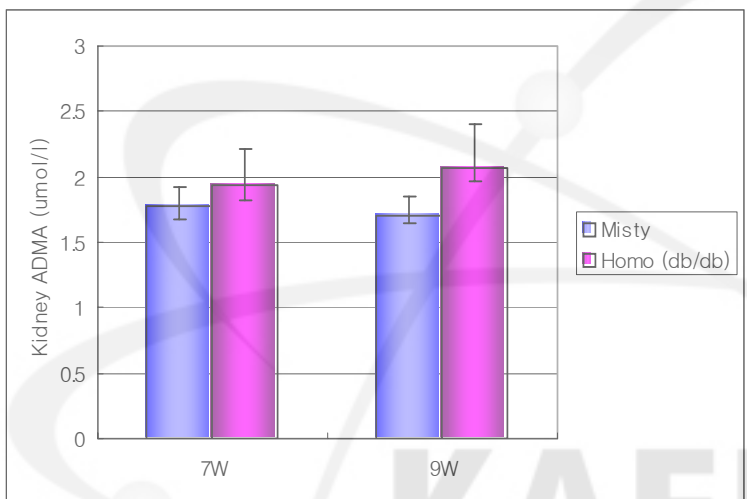
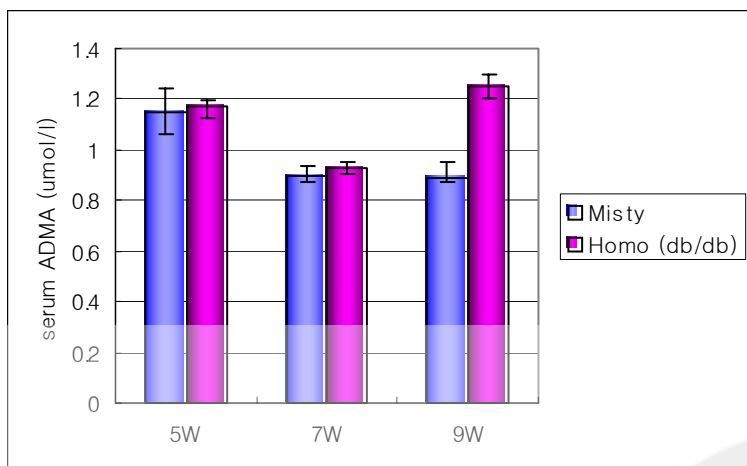


Fig. 3. Effect of DM on Serum ADMA levels in mice. (Above) Serum. (Center) Kidney. (Below) Liver.

다. 당뇨 발생 과정에서 DDAH1과 nNOS 수준의 변화

- DDAH1과 nNOS의 발현을 Western blot으로 분석한 결과 DDAH1의 발현이 db/db mice의 신장, 간 및 지방조직에서 현저히 감소하였고, nNOS는 신장과 간에서 증가하였음($P < 0.05$, Fig. 4, 5).

- DDAH1 발현의 감소가 ADMA 증가의 한 원인으로 추정되었음.

- nNOS는 ADMA에 의하여 억제되므로 당뇨 발생과정에서 nNOS의 증가는 증가한 ADMA에 의한 활성 억제에 대한 보상작용으로 추정할 수 있음.

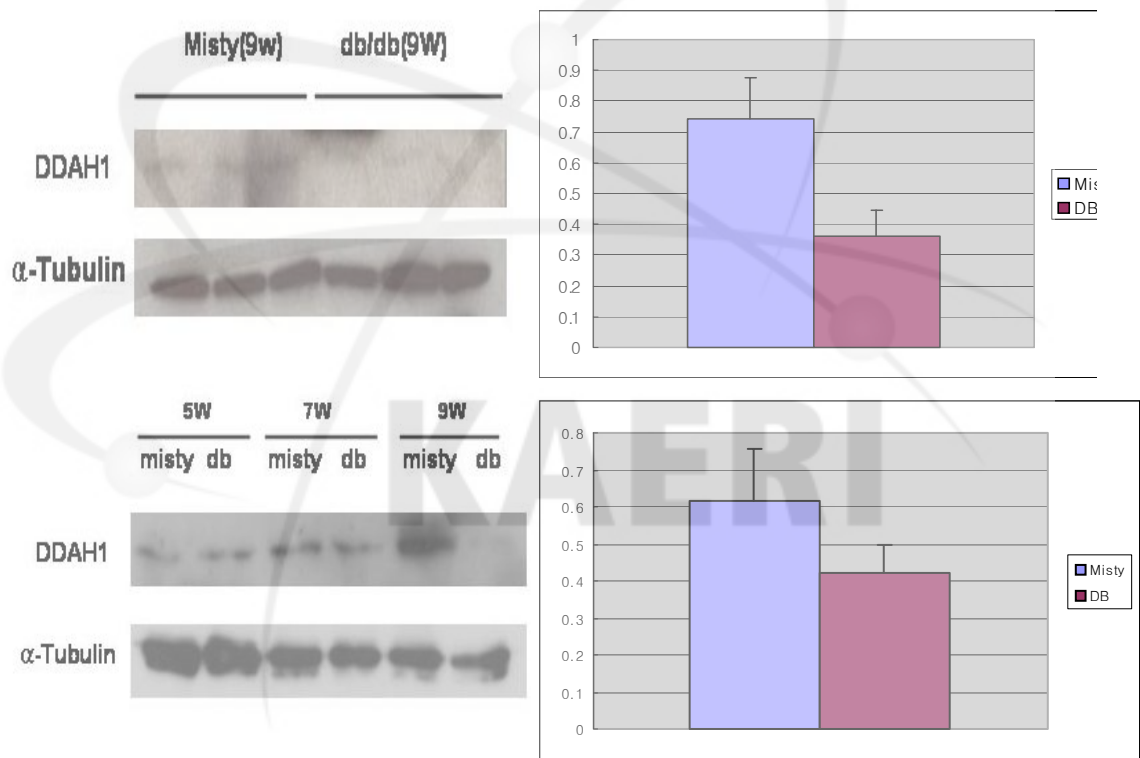


Fig. 4. Effect of DM on DDAH1 levels in mice.

(Above) Kidney. (Center) Liver. (Below) Adipose tissue.

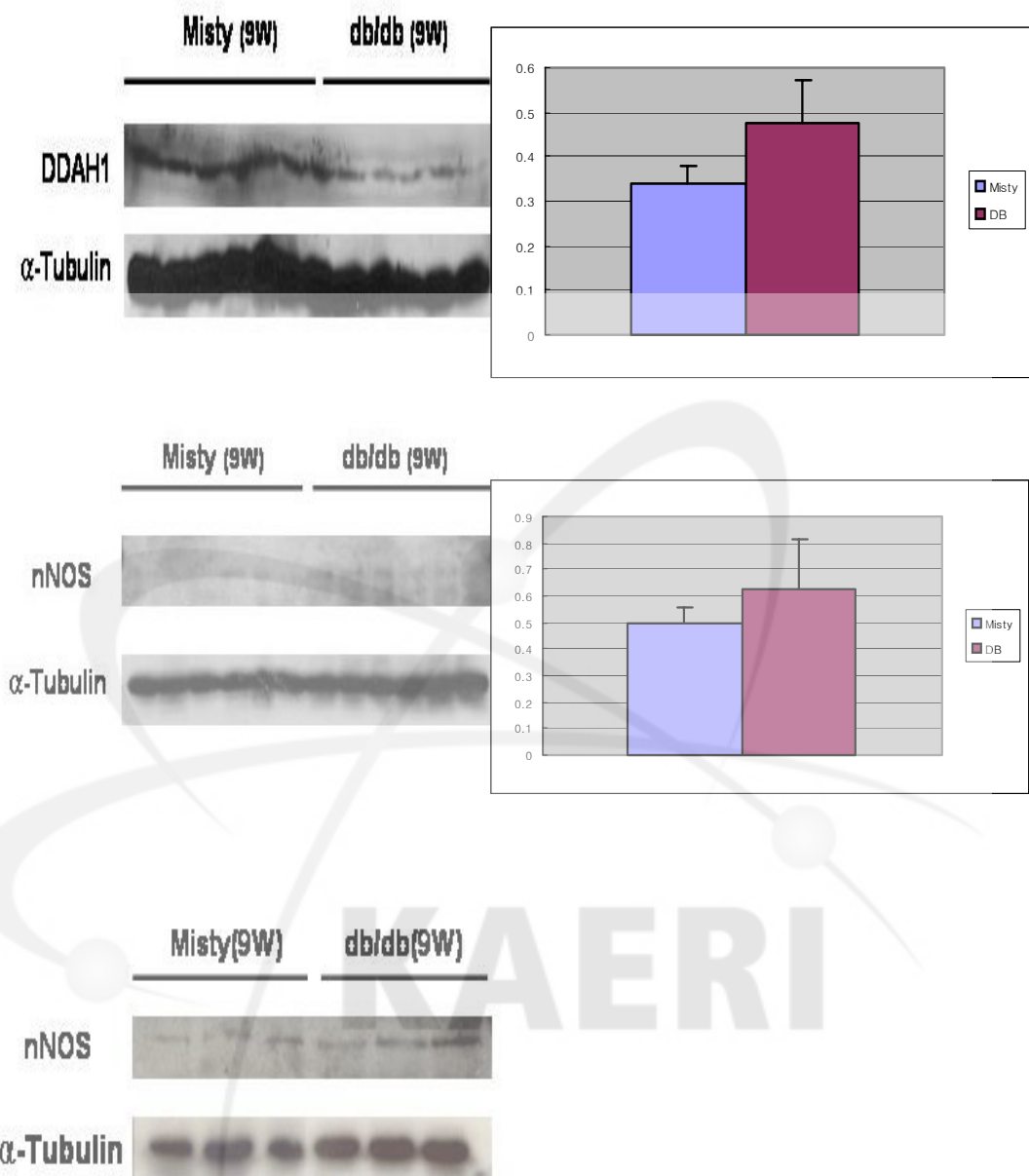


Fig. 5. Effect of DM on nNOS levels in mice.
(Above) Kidney. (Below) Liver.

라. 당뇨 발생과정 중의 간과 지방조직에서 protein arginine methylation과 PRMT1 수준의 변화

- ASYM24 항체를 이용하여 Western blot analysis를 수행한 결과 당뇨 발생 과정에서 간과 지방조직의 protein arginine methylation이 변화하였음. 간에서는

75KDa, 60KDa 및 52KDa 단백질들의 arginine methylation의 변화가 현저하였으며, 지방조직에서는 8KDa과 25KDa 단백질의 arginine methylation의 변화가 현저하였음(Fig. 6).

- 단백질에 asymmetric dimethylarginine을 생성시키는 PRMT1 단백질의 발현이 초기당뇨에서는 충분히 발현되지만 중기, 말기로 갈수록 단백질의 발현 양이 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었음(Fig. 7).

- 따라서 이 단백질들의 변화를 통해 조직 또는 혈장 내에서 ADMA의 농도가 정상상태와는 다른 변화를 나타낼 것이라고 예측할 수 있으며, protein arginine methylation이 당뇨 발생과정과 관련이 있을 것으로 사료되었음.

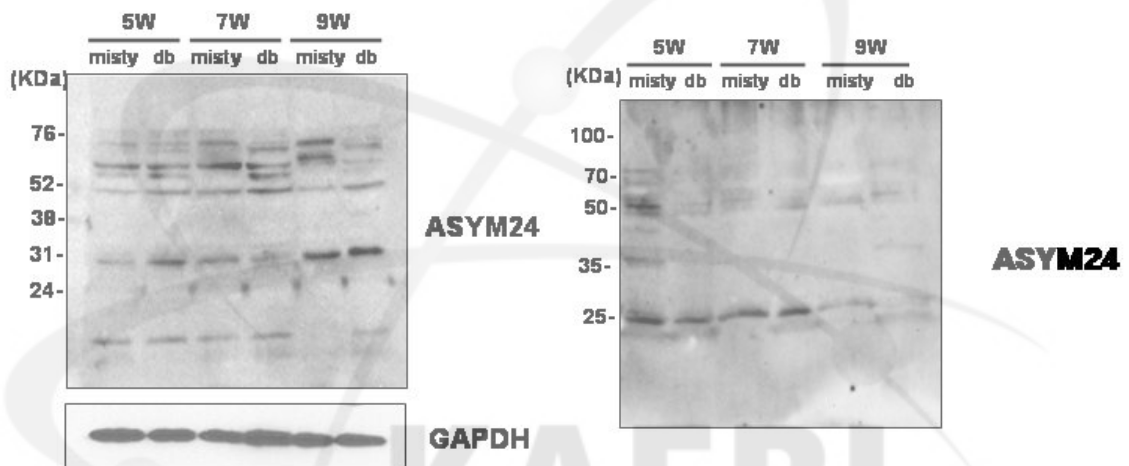


Fig. 6. Changes of arginine methylation during the period of diabetogenesis. Liver (Left) . Adipose tissue (Right).

Fig. 7. PRMT1 expression in the liver of the db/db mouse during diabetogenesis.

2. ADMA 농도 측정을 위한 전처리로서 succinylation의 최적 반응조건 프로토콜

○ Method 1:

- Reaction mixture final volume 1 ml
 - 10 mM ADMA
 - 0.2 mM Succinyl-coenzyme A(CoA)



100 mM Tris hydrochloride (pH8.0)

Arginine succinyltransferase (10 μ g)

- 37°C, 232 nm에서 succinyl-CoA 농도를 측정함. 농도가 감소하는 것이 관찰되면 ADMA의 acylation이 잘 진행되고 있다는 것을 알 수 있음.

○ Method 2:

- ADMA 5 mg을 0.1 M NaCl +8 M deionized urea buffer 5 ml에 용해.
- 용액의 pH를 확인하면서 실험 진행.
- Succinic anhydride를 0.5 mg씩 15분 간격으로 1시간 동안 넣어줌.
pH는 7로 유지 (sodium hydroxide)
- 반응시간은 최소 30분 이상.

3. ADMA antibody 제작

- NG,NG-Dimethylarginine dihydrochloride(Sigma)에 KLH conjugation시키고 rabbit에 injection하여 polyclonal antibody 제작

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1 절 연구개발목표의 달성도

구분	목 표	평가의 착안점	연구개발 수행내용	달 성도(%)
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> ADMA의 당뇨병 발병기전에서의 역할 연구 RI 바이오칩 적용 검출법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ADMA와 당뇨병 발생기전의 관련성 규명 여부 ADMA succinylation의 반응조건 확립 여부 Anti-succinylated ADMA 항체 제작 여부 	<ul style="list-style-type: none"> ADMA 대사에 미치는 protein arginine methylation, DDAH, NOS의 영향 및 당뇨병 발병기전에서 ADMA의 관련성 연구 RI-labelled succinylate와 ADMA의 반응 조건 확립 Succinylated ADMA 항체 제작 	80
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> ADMA의 당뇨병 발병기전에서의 역할 연구 RI 검출기술 이용 바이오 칩 개발 	<ul style="list-style-type: none"> RI-labelled succinylated ADMA-항체간의 최적 상호작용 조건 확립 여부 칩 상의 anti-succinylated ADMA 항체와 succinylated ADMA의 최적 반응조건 및 검출기술 확립 여부 	<ul style="list-style-type: none"> 당뇨병 발병기전에서 ADMA의 관련성 연구 ADMA antibody 제작: Rabbit에 3번 이상 injection하여 제작 RI 적용 ADMA-antibody간의 반응조건 확립: Antibody 제작 칩 상의 ADMA antibody와 RI 적용 ADMA와의 반응 여부 검출기술 확립: ADMA를 isotope labelled 또는 unlabelled fatty acid로 acylation 후 칩에 부착된 ADMA antibody를 사용하여 반응 조건 확립 	50

제 2 절 관련분야의 기술발전예의 기여도

구분	연구목표	관련분야에의 기여도
1차년도 (2008)	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA의 당뇨병 발병기전에서의 역할 연구 · RI 바이오칩 적용 검출법 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA 대사에 미치는 protein arginine methylation, DDAH, NOS의 영향 및 당뇨병 발병기전에서 ADMA의 관련성을 제시하여 당뇨병의 이해 증진에 이바지하였음. · 기존에 상품화되어 있는 ADMA 측정용 ELISA kit에서도 succinic acid 이용 ADMA acylation 과정이 포함되어 있으나 반응조건은 비공개 상태인데 본 과제에서 독자적으로 반응조건을 확립하였음.
2차년도 (2009)	<ul style="list-style-type: none"> · ADMA의 당뇨병 발병기전에서의 역할 연구 · RI 검출기술 이용 바이오칩 개발 	<ul style="list-style-type: none"> · 당뇨병 발병기전에서 ADMA의 관련성을 지속적으로 연구하여 당뇨병의 이해 증진에 이바지하였음. · Anti-succinylated ADMA 항체 제작을 위하여 rabbit에 3번 이상 injection하여 제작

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

혈액 및 조직에서 ADMA 수준의 증가가 당뇨 발생과정과 관련이 있는 것으로 관찰되었으며, ADMA를 생성하는 arginine-methylated protein들의 양상이 간과 지방조직 등에서 변화하는 것이 관찰되었으므로 이 단백질들의 정체를 규명하여 당뇨의 발병기전에 대한 이해를 증진시킬 필요가 있음.

제 2 절 타 연구에의 응용

1. 당뇨의 발병기전과 밀접한 관련이 있는 arginine-methylated protein의 정체를 규명하여 당뇨 조기발견의 biomarker로 활용.
2. ADMA의 질병과 관련된 기능연구를 통하여 순환계질환, 간질환, 신장질환 등 인체 질병의 새로운 발병기전 연구
3. 유전자, 단백질, 세포 등의 생물정보 분석 및 이용기술에 있어서 핵심적인 역할을 수행할 기술 확립
4. 새로운 의약품이나 생리활성 물질의 성공적인 발굴에 효율적으로 활용될 기술 확립
5. 방사선 융합기술을 통한 생명과학 및 생물 산업 분야에서의 국제적 기술 우위 확보 및 국가 과학기술의 국제적 선도화 실현

제 6 장 참고문헌

Abbasi, F., Asagami, T., Cooke, J.P., Lamendola, C., McLaughlin, T., Reaven, G.M., Stuehlinger, M., Tsao, P. (2001) Plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine are increased in patients with type 2 diabetes mellitus. *Am. J. Cardiol.* 88, 1201-1203

Achan, V., Broadhead, M., Malaki, M., Whitley, G., Leiper, J., MacAllister, R., Vallance, P. (2003) Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 1455-1459

Altinova, A.E., Arslan, M., Sepici-Dincel, A., Akturk, M., Altan, N., Toruner, F.B. (2007) Uncomplicated type I diabetes is associated with increased asymmetric dimethylarginine concentrations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1881-1885

Asagami, T., Abbasi, F., Stuehlinger, M., Lamendola, C., McLaughlin, T., Cooke, J.P., Reaven, G.M., Tsao, P.S. (2003) Metformin treatment lowers asymmetric dimethylarginine concentrations in patients with type 2 diabetes. *Metabolism* 51, 843-846

Baylis, C. (2006) Arginine, arginine analogs and nitric oxide production in chronic kidney disease. *nat. Clin. Pract, Nephrol.* 2, 209-220

Böger RH, Bode-Böger SM, Szuba A, Tsao PS, Chan JR, Tangphao O, Blaschke TF, Cooke JP. (1998) Asymmetric dimethylarginine(ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation.* 98, 1842-1847

Boisvert, F.M., Cote, J., Boulanger, M.C., Richard S. (2003) A proteomic analysis of arginine-methylated protein complexes. *Mol. Cell. Proteo.* 2, 1319-1330

Cam, T.L., Trans, James, M., Leiper, Patrick Vallance (2003) The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atherosclerosis supp.* 4, 33-40

Chan, N.N., Chan, J.C. (2002) Asymmetric dimethylarginine(ADMA): a potential link between endothelial dysfunction and cardiovascular diseases in insulin resistance syndrome? *Diabetologia* 45, 1609-1616

Dowling, R.B., Newton, R., Robichaud, A., Cole, P.J., Barnes, P.J., Wilson, R. (1998) Effect of inhibition of nitric oxide synthase on *Pseudomonas aeruginosa* infection of respiratory mucosa in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19, 950-958

Eid, H.M., Lyberg, T., Arnesen, H., Seljeflot, I. (2007) Insulin and adiponectin inhibit the TNF- α induced ADMA accumulation in human endothelial cells: the role of DDAH. *Atherosclerosis.* 194, e1-e8

Evans, J.L., Goldfine, I.D., Maddux, B.A., Grodsky, G.M. (2002) Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr. Rev.* 23, 599-622

Gardiner, S.M., Kemp, P.A., Bennett, T., Palmer, R.M.J., Moncada, S. (1993) Regional and cardiac haemodynamic effects of NG,NG-dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1457-1464

Inoue, R., Miyake, M., Kanazawa, A., Sato, M., Kakimoto, Y. (1979) Decrease of 3-methylhistidine and increase of NG,NG-dimethylarginine in the urine of patients with muscular dystrophy. *Metabolism.* 28, 801-804

Leiper, J., Vallance, P. (2003) Biological significance of endogenous methylarginine that inhibit nitric oxide synthases. *Cardiovasc. Res.* 43, 542-548

Lin, K.Y., Ito, A., Asagami, T., Tsao, P.S., Adimoolam, S., Kimoto, M., Tsuji, H., Reaven, G.M., Cooke, J.P. (2002) Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 106, 987-992

MacAllister, R.J., Whitley, G.S., Vallance, P. (1994) Effects of guanidino and uremic compounds on nitric oxide pathways. *Kidney Int.* 45, 737-742

Masuda, H., Goto, M., Tamaoki, S., Azuma, H. (1999) Accelerated intimal hyperplasia and increased endogenous inhibitors of NO synthesis in rabbits with alloxan-induced hyperglycaemia. *Br. J. Pharmacol.* 126, 211-218

Palm, F., Buerk, D.G., Carlsson, P.O., Hansell, P., Liss, P. (2005) Reduced nitric oxide concentration in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats: effects on renal oxygenation and microcirculation. *Diabetes.* 54, 3282-3287

Palm F., Onozato, M.L., Luo, Z., Wilcox C.S. (2007) Dimethylarginine dimethylaminohydrolase(DDAH): expression, regulation, and function in the cardiovascular and renal systems. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 293, 3227-3245

Sinae An, Miyong Yun, Yun Gyu Park and Gil Hong Park. (2009) Proteomic Identification of Cytosolic Proteins that Undergo Arginine Methylation during Rat Liver Regeneration. *Electrophoresis* Vol. 30, No. 14, 2412-2421

Soon-Young Kwon, Sohee Kim, Kyoung-hwa Lee, Tae Jin Kim, Seung-Hoon

Lee, Kyung-Mi Lee and Gil Hong Park. (2004) Increased methylation of the cytosolic 20-kD protein is accompanied by liver regeneration in a hepatectomized rat. *Experimental and Molecular Medicine*. Vol. 36, No. 1, 85-92

Stuhlinger, M., Abbasi, F., Chu, J., Lamendola, C., McLaughlin, T., Cooke, J.P., Reaven, G.M., Tsao, P.S. (2002) Relationship between insulin resistance and an endogenous nitric oxide synthase inhibitor. *JAMA*. 287, 1420-1426

Sydow, K., Mondon, C.E., Cooke, J.P. (2005) Insulin resistance: potential role of the endogenous nitric oxide synthase inhibitor ADMA. *Vasc. Med.* 10, Suppl 1, S35-S43

Sydow, K., Schwedhelm, E., Arakawa, N., Bode-Boger, S.M., Tsikas, D., Horing, B., Frolich, J.C., Boger, R.H. (2003) ADMA and oxidative stress are responsible for endothelial dysfunction in hyperhomocyst(e)inemia: effects of L-arginine and B vitamins. *Cardiovasc. Res.* 57, 244-252

Tarnow, L., Hovind, P., Teerlink, T., Stehouwer, C.D., Parving, H.H. (2004) Elevated plasma asymmetric dimethylarginine as a marker of cardiovascular morbidity in early diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes Care* 27, 765-769

Teerlink, T. (2005) ADMA metabolism and clearance. *Vasc. Med.* 10, Suppl 1, S73-S81

Ueda, S., Kato, S., Matsuoka, H., Kimoto, M., Okuda, S., Motimatsu, M., Imaizumi, T. (2003) Regulation of cytokine-induced nitric oxide synthesis by asymmetric dimethylarginine. *Circ Res.* 92, 226-233

Valkonen, V.P., Tuomainen, T.P., Laaksonen, R. (2005) DDAH gene and cardiovascular risk. *Vasc. Med.* 10, S45-S48

Vallance, P., Leiper, J. (2004) Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24, 1023-1030

Vallance, P., Leone, A., Calver A., Collier, J., Moncada, S. (1992) Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet* 339, 572-575

Welch, W.J., Wilcox, C.S. (1997) Macula densa arginine delivery and uptake in the rat regulates glomerular capillary pressure: effects of salt intake. *J. Clin. Invest.* 100, 2235-2242

Wells, S.M., Holian, A. (2007) Asymmetric dimethylarginine induces oxidative and nitrosative stress in murine lung epithelial cells. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* 36, 520-528

Xiong, Y., Fu, Y., Fu, S., Zhou, H. (2003) Elevated levels of the serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and metabolic control in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. cardiovasc. Pharmacol.* 42, 191-196

Xiong, Y., Lei, M., Fu, S., Fu, Y. (2005) Effect of diabetic duration on serum concentrations of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase in patients and rats with diabetes. *Life Sci.* 77, 149-159

서 지 정 보 양 식					
수행기관보고서번호	위탁기관보고서번호		표준보고서번호	INIS 주제코드	
	KAERI/CM-1301/2009				
제목 / 부제	간질환, 심혈관질환 및 당뇨병 등 관련 risk factor인 ADMA(asymmetric dimethylarginine)의 혈중 또는 체액 농도 측정을 위한 RI protein chip 시스템 개발				
연구책임자 및 부서명	박 길 흥 고려대학교 의과대학 생화학교실				
연구자 및 부서명	안 신 애, 최 현 미, 정 경 아, 장 연 수 고려대학교 의과대학 생화학교실				
출판지	대전	발행기관	한국원자력연구소	발행년	2010
페이지	38	도표	있음(○), 없음()	크기	A4
참고사항					
공개여부	공개(○), 비공개()		보고서종류	위탁연구보고서	
비밀여부	대외비(), ___ 급비밀				
연구수행기관	고려대학교 산학협력단		계약번호		
초록 (15-20줄내외)	<p>ADMA(asymmetric dimethylarginine)는 NOS(nitric oxide synthase)의 내인성 억제자이다. 체액 내 ADMA의 증가는 당뇨, 동맥경화, 고콜레스테롤혈증, 만성심부전, 고혈압 등과 관련있다. 본 연구의 목표는 ADMA와 단백질 알지닌 메틸화반응이 당뇨의 병리기전에서 하는 역할을 관찰하고 혈액과 체액에서 ADMA 측정을 위한 RI 단백질칩을 개발하는 것이다. 연구결과, 단백질 알지닌 메틸화 반응, DDAH1, NOS 등에 의하여 결정된 ADMA 수준은 당뇨 발생기전과 관련이 있었으며 이 과정에서 알지닌 메틸화가 변화하는 일부 단백질을 관찰하였다. RI 단백질칩 시스템은 ADMA를 radio-labelled succinic acid를 succinylation시킨 후 anti-succinylated ADMA 특이 항체에 결합시키도록 고안하였으며, ADMA succinylation 조건을 확립하였다.</p>				
주제명키워드 (10단어내외)	ADMA, 단백질 알지닌 메틸화, NOS, DDAH, 당뇨, RI 단백질 칩				

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET					
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.	INIS Subject Code
		KAERI/CM-1301/2009			
Title/ Subtitle		Development of RI protein chip system for measurement of ADMA as risk factor of liver disease, cardiovascular disease and diabetes			
Project Manager and Department		Park Gil Hong, (Department of Biochemistry, College of Medicine, Korea University)			
Researcher and Department		Sinae An, Hyun Mi Choi, Kyung Ah Cheong, Yeon Soo Chang,			
Publication Place	Taejon	Publisher	KAERI	Publication Date	2010
Page	38	Ill. & Tab.	Yes(<input type="radio"/>), No (<input type="radio"/>)	Size	A4
Note					
Open	Open(<input type="radio"/>), Closed (<input type="radio"/>)				
Classified	Restricted(<input type="checkbox"/>), ___Class Document		Report Type	Research report	
Performing Org.	Korea University		Contract No.		
Abstract (15-20 Lines)					
<p>ADMA (asymmetric dimethylarginine) is an endogenous competitive NOS (nitric oxide synthase) inhibitor. Elevation of ADMA level in body fluid is related to various diseases including diabetes mellitus, atherosclerosis, hypercholesterolemia, chronic heart failure, and hypertension. Our goal was to elucidate the role for ADMA and protein arginine methylation in the pathogenesis of diabetes and develop RI protein chip system for easy determination of ADMA levels in blood or tissues. As a result, ADMA regulated by protein arginine methylation, DDAH1, and NOS was demonstrated to play some role in the pathogenesis of diabetes mellitus, and arginine methylation of some proteins indicated their possible involvement in the change in ADMA levels. The concept of the RI protein chip system was devised such that firstly, ADMA was acylated by radio-labelled succinic acid, and followed by binding of the complex to anti-acyl ADMA-specific antibody coated on chip. Acylation condition of ADMA with radio-labelled succinic acid was established.</p>					
Subject Keywords (About 10 words)		ADMA, Protein arginine methylation, NOS, DDAH, Diabetes, RI protein chip			