Journal of the Korean Chemical Society
2018, *Vol. 62, No. 4*
Printed in the Republic of Korea
https://doi.org/10.5012/jkcs.2018.62.4.324

단신 (Notes)

DNA와 Ethidium Ion 사이의 결합반응에 미치는 Curcumin의 영향을 분석하기 위해 형광이방성 측정을 이용한 연구

이성경 · 허성호*
충남대학교 자연과학대학 생화학과
(접수 2018. 5. 1; 게재확정 2018. 5. 28)

Study on the Effect of Curcumin on the Binding Interaction between DNA and Ethidium Ion with Fluorescence Anisotropy

Seongkyung Lee and Sungho Huh*
Department of Biochemistry, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea
**E-mail: sungho@cnu.ac.kr*
(Received May 1, 2018; Accepted May 28, 2018)

Key words: Fluorescence anisotropy, Quenching, Ethidium bromide, Curcumin, Intercalation

세포 내에서 진행되는 대부분의 생화학 반응들은 분자들 사이에서의 결합반응에 관한 규명없이는 정확하게 설명될 수가 없다. 생명체에서 일어나는 대사과정을 비롯하여 헤모글로빈에 의한 산소운반, DNA복제와 전사과정등은 DNA와 단백질, 그리고 다양한 분자들 사이의 결합반응에 의해 수행된다. 따라서 특정 결합반응에 관한 구체적인 정보를 구할 수 있다면 관련된 생화학 반응의 정확한 이해를 위해 매우 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

화학 또는 생화학 분야의 다양한 결합반응들을 관찰하기 위해서 electrophoretic mobility shift assay (EMSA),[1,2] isothermal titration calorimetry (ITC),[3] nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR),[4–6] surface plasmon resonance (SPR),[7] UV/VIS spectroscopy와 fluorescence spectroscopy[8,9]등의 분석법 등이 널리 활용하고 있다. 이들 방법 중에서 형광분광분석법은 감도가 높아 미량의 시료에 의한 측정이 가능할 뿐 아니라 분자크기에 큰 영향을 받지 않아 형광발색단(fluorophore)을 포함하는 분자와 단백질 또는 DNA 사이의 결합반응에 관한 연구에 널리 이용되고 있다. 형광분광분석법 중에서 fluorescence anisotropy (형광비등방성) 측정법도 결합반응 연구에 점점 많이 활용되고 있다. 형광비등방성은 용액 중에 존재하는 형광발색단(fluorophore)의 rotational diffusion rate (회전확산 속도)에 따라 달라진다.[10] 따라서 형광발색단을 포함하는 분자가 용액 중에 유리된 상태로 존재할 때와 단백질이나 DNA등의 거대한 분자에 결합한 경우를 비교하면 회전확산속도에서 큰 차이를 보이므로 형광비등방성 data는 단순한 형광세기 data보다 결합반응에 관한 더 구체적인 정보를 제공할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 이는 우리가 이미 수행한 ethidium bromide(EtBr)와 DNA사이의 결합반응에 미치는 caffeine의 영향에 관한 연구에서도 확인되었다.[11]

형광비등방성 측정을 위해서는 시료 분자에 포함된 형광발색단을 들뜨게(excitation)할 때와 방출(emission)되는 형광의 세기를 측정할 때 양쪽 모두 편광판(polarizer)을 이용한다. 분자내의 형광발색단은 편광판을 통과한 입사광의 수직방향의 electric vector에 의해 들뜨게 되며, 이와 평행인 형광세기($I_{\parallel}$) 및 수직방향의 형광세기($I_{\perp}$)를 구하면 다음 식과 같이 형광비등방성 (r)값이 구해진다.[10,12]

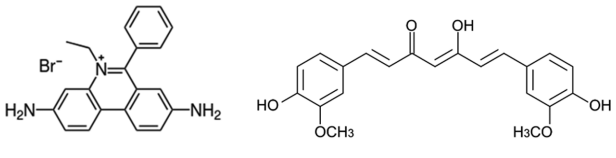
$$r = (I_{\parallel} - I_{\perp})/(I_{\parallel} + 2\, I_{\perp})$$

이런 장점을 가진 형광비등방성 측정을 이용하여 우리가 자주 섭취하는 식품에 포함되어 있는 천연생리활성 성분이 의약품 유효성분의 효력에 영향을 미칠 수 있는지를 알아보고자 하였다. DNA와 intercalating 시약인 ethidium bromide (EtBr)사이의 결합반응에 제3성분인 curcumin의 첨가가 이 결합반응에 어떤 영향을 주는지를 살펴 보고자 하였다. Ethidium bromide는 이중나선 DNA와 intercalation방식으로 결합하여 약리효과를 나타내는 항암제나 항생제와 같은 메카니즘으로 DNA와 결합하는 분자이다. 제3성분인 curcumin은 천연생리활성 성분의 한 종류로서, 오래 전부터 아시아인들이 즐기는 카레음식에 포함된 향신료인 강황(Curcuma

aromatica)이나 약용으로 사용되고 있는 울금(Curcuma longa)의 주성분으로 알려져 있다.[13]

Curcumin은 인도와 중국 등에서 오래 전부터 항염증 및 항암효과 등의 다양한 약리효과를 나타낸다고 알려져 있으며,[13,14] 다량을 복용하는 경우 DNA돌연변이 등의 부작용이 일어날 수 있다는 연구결과도 발표되었다.[15] Curcumin과 DNA 사이의 결합반응에 관한 지금까지의 연구결과들을 살펴 보면 Nafisi등은 IR과 UV실험을 통해 curcumin이 DNA의 major groove뿐아니라 minor groove에도 결합한다고 발표하였으며,[14] Li 등은 UV와 fluorescence실험을 통해 curcumin이 DNA와 intercalation방식으로 결합한다고 주장하였고,[16] Koonammackal등은 molecular dynamics simulation과 binding free energy analysis에 근거해서 curcumin이 DNA의 minor groove에 결합한다고 주장하였다.[17] 그러나 Kurien 등은 다양한 전기영동실험 결과를 토대로 curcumin은 intercalation이나 어떤 다른 방법으로도 DNA와는 결합하지 않는다고 주장했다.[18] 이와 같이 curcumin과 DNA 사이의 결합반응에 관해서는 아직 논란의 여지가 많이 남아 있다. 이 연구에서는 curcumin과 DNA 사이의 결합반응을 규명하고자 하는 것이 아니라 이중나선 DNA와 결합하는 ethidium이온이 공존하는 curcumin에 의해 어떤 영향을 받는지를 알아 보고자 fluorescence anisotropy를 측정하였으며, 보조 data로 fluorescence intensity도 함께 측정하였다.

연구에 사용된 ethidium bromide와 curcumin의 분자구조는 *Fig.* 1과 같다.



(A) (B)

***Figure* 1.** Chemical structures of ethidium bromide (A) and curcumin (B).

형광비등방성과 형광세기의 비교

우리는 caffeine-DNA결합반응에 관련한 연구에서 형광세기(fluorescence intensity)와 형광비등방성 data를 비교한 실험 결과를 이미 발표하였다.[11] 결과에 의하면 점도가 매우 낮은 수용액에서 DNA의 염기쌍 사이로 ethidium 이온이 층간삽입하면서 나타내는 결과의 해석을 위해서는 형광세기보다는 형광비등방성 측정치가 더 유용하였으며, 이들 두 측정치를 함께 이용하면 더 명확하게 이해할 수 있음을 보고하였다.[11] 따라서 이 실험에서도 ① [DNA]/[EtBr] = 0.1, ② [DNA]/[EtBr] = 10의 두 조건에서 curcumin

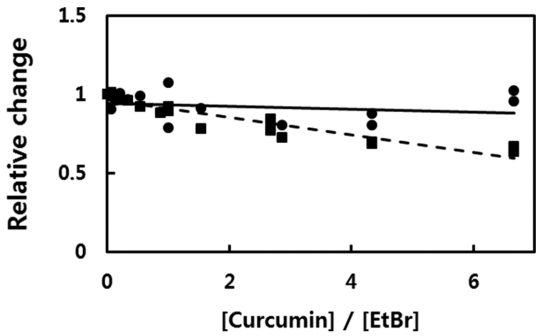


***Figure* 2.** Relative change of fluorescence anisotropy (—) and intensity (---) obtained from titrating a DNA-EtBr(0.1:1) complex with curcumin.

농도에 따른 ethidium ion의 형광비등방성과 형광세기의 변화를 함께 관찰하였다.

[DNA]/[EtBr] = 0.1 인 경우

DNA용액의 농도가 EtBr에 비해 상대적으로 낮은 경우에는 ethidium ion들은 DNA phosphate group의 양이온과 결합하는 outside stacking과 intercalation, 그리고 용액에 monomer형태나 또는 dimer형태등으로 존재할 것으로 판단된다. 이런 조건에서 curcumin을 다양한 농도로 첨가하면서 curcumin에 의한 ethidium ion의 형광비등방성과 형광세기의 상대적 변화(r/r_0와 F/F_0)를 구하여 *Fig.* 2에 표시하였다.

Fig. 2를 보면 이 조건에서 curcumin을 첨가함에 따라 ethidium의 형광세기는 감소하였으나 형광비등방성은 curcumin의 농도에 관계없이 거의 일정하게 초기값을 유지하고 있음을 알 수 있었다. Ethidium의 형광비등방성이 curcumin의 첨가에 의해서도 거의 영향을 받지 않는다는 것은 curcumin이 DNA에 층간삽입되어 있는 ethidium ion을 DNA로부터 거의 해리하지 못한다는 것으로 추측된다. 따라서 이 조건에서는 curcumin이 ethidium ion과 경쟁적으로 DNA와 결합을 하지 않는다고 생각되었다. 그러나 형광세기는 첨가되는 curcumin의 양이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보이는데, 이는 DNA와 결합하고 있거나 용액 중에 존재하는 ethidium ion의 소광과정(quenching)이 첨가되는 curcumin에 의해 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 그렇다면 curcumin이 어떻게 ethidium ion의 소광과정에 영향을 주는지를 알아보기 위해 다음과 같은 Stern-Volmer식에 따른 실험을 수행하여 *Fig.* 3에 그 결과를 표시하였다.[10]

$$(F_0 - F) / F = K_{SV} [Q]$$

여기서 F_0와 F는 소광제(quencher)가 가해지기 전과 가해진 후의 형광세기를 의미하고, K_{SV}는 Stern-Volmer 계수를,

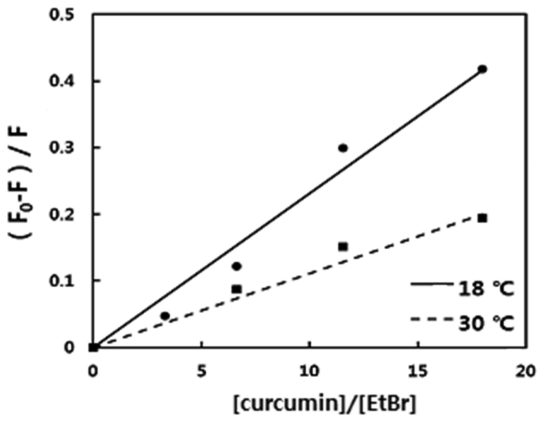


***Figure* 3.** The Stern-Volmer plots obtained from the measurement of the fluorescence intensity with the EtBr-DNA (1:0.1) complex at various concentrations of curcumin at 18 ℃ and 30 ℃.

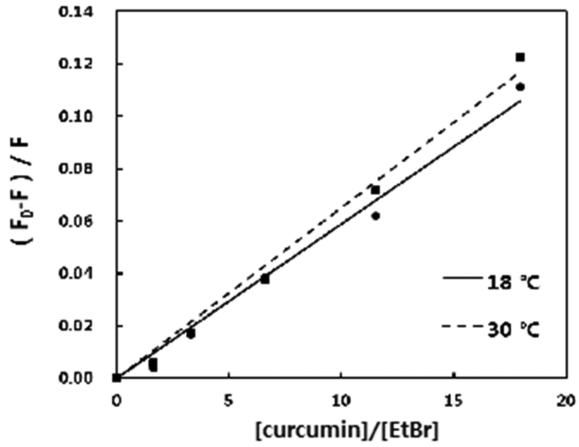


***Figure* 5.** The Stern-Volmer plots obtained from the measurement of the fluorescence intensity with the EtBr-DNA (1:10) complex at various concentrations of curcumin at 18 ℃ and 30 ℃.

[Q]는 소광제(quencher)의 농도를 나타낸다.

온도 변화에 따른 Stern-Volmer plot을 살펴 보면 온도가 18 ℃에서 30 ℃로 높아짐에 따라 K_{SV}값이 감소함을 볼 수 있었다. 이로부터 주어진 조건에서는 ethidium ion의 형광소광(fluorescence quenching)이 정적 소광(static quenching) 과정임을 알 수 있었다. 따라서 이 조건에서는 용액에 남아있는 많은 ethidium ion들이 가해진 curcumin과의 소수성 상호작용으로 인한 쌓임(stacking)에 의해 소광(quenching)이 부분적으로 촉진되어 형광세기가 감소하는 것으로 추정하는 것이 적절할 것으로 판단되었다.

[DNA]/[EtBr] = 10인 경우

이 조건에서는 대부분의 ethidium ion이 DNA 염기쌍 사이에 층간삽입 형태로 결합할 것으로 추측되었다. Curcumin 첨가로 인한 ethidium ion의 형광비등방성의 상대적 변화(r/r_0)와 형광세기의 상대적 변화(F/F_0)를 *Fig.* 4에 표시하였다.

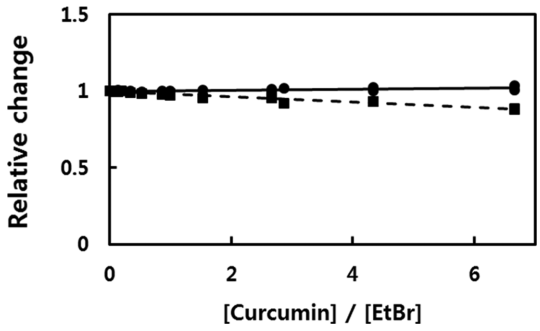


***Figure* 4.** Relative change of fluorescence anisotropy (—) and intensity (---) obtained from titrating a DNA-EtBr (10:1) complex with curcumin.

대부분의 ethidium ion이 DNA에 층간삽입되어 있을 것으로 판단되는 조건에서 curcumin이 가해지면 형광비등방성에는 거의 변화가 없으나 형광세기는 약간 감소하였다. 형광비등방성의 값이 변화없이 유지되었다는 것은 curcumin의 첨가에도 DNA에 층간삽입된 ethidium ion이 측정될 정도까지는 해리되지 않는다는 것을 의미한다. *Fig.* 4에서 나타난 형광세기의 감소는 정적 소광(static quenching)보다는 동적 소광(dynamic quenching)효과가 조금 더 많이 작용하는 것으로 추정되었다(*Fig.* 5). 이는 온도 상승으로 인해 물 분자와 용액내의 curcumin 분자들의 운동성이 증가되어 층간삽입한 ethidium ion 주위에 이들 분자들이 보다 가까이 접근하게 되어 소광이 촉진되었고 그 결과 ethidium ion의 형광세기가 약간 감소한 것으로 생각되었다.

이 실험에서 구해진 형광비등방성과 형광세기의 결과를 종합하면 EtBr-DNA complex에 첨가되는 curcumin은 주어진 실험조건에서 DNA에 층간삽입된 ethidium ion을 거의

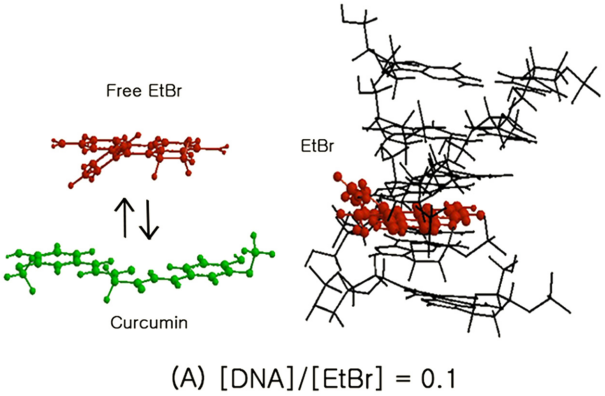


***Figure* 6.** Estimated effect of curcumin on the EtBr-DNA complex when [DNA]/[EtBr] = 0.1.

해리하지 못함을 보였다. 이 결과만으로는 curcumin이 DNA의 groove에 결합하는지는 알 수 없지만 최소한 DNA에 ethidium ion과는 경쟁적으로 층간삽입하지 않는다고 보는 것이 합리적일 것으로 생각되었다. [EtBr]/[DNA]값이 크게 변하여도 curcumin 첨가에 따른 형광비등방성과 형광세기의 변화가 거의 비슷하였으나 ethidium ion의 소광과정을 일으키는 작용은 [EtBr]/[DNA]의 값에 따라 다르다는 것을 관찰할 수 있었다. 이들 결과에 따르면 형광비등방성과 형광세기의 측정결과를 함께 활용하면 결합반응에 관한 보다 구체적인 정보를 구하는 것이 가능함을 알 수 있었다.

EXPERIMENTAL

실험에 사용된 DNA는 Sigma Aldrich㈜에서 정제된 Calf thymus DNA를 구입하여 더 이상의 정제과정 없이 100 mM sodium chloride가 포함되어 있는 20 mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.0)에 녹여 사용하였다. 연구에서 사용한 DNA의 농도는 염기쌍 mole농도(650/mol of a base-pair)를 사용하였다. Ligand 분자로 사용한 ethidium bromide(EtBr)와 curcumin은 Sigma Aldrich㈜에서 구매하여 추가적인 정제과정 없이 그대로 사용하였다.

Fluorescence spectrofluorometer는 excitation과 emission 양쪽 모두에 편광 window(polarizer)가 장착되어 있으며 Peltier 온도조절장치(temperature controller)가 구비되어 있는 JASCO FP-8300을 사용하였다. 완충용액에 녹인 EtBr과 EtBr-DNA complex용액 중의 EtBr은 550 nm에서 excitation시켜 600 nm에서 emission intensity를 측정하여 anisotropy와 intensity를 구하였으며, 측정 온도는 Peltier 온도조절장치를 이용하여 측정하는 동안 20 °C를 유지하였다. EtBr-DNA complex를 curcumin용액으로 titration할 때는 [curcumin]/[EtBr] 값을 0에서 6.67까지 점차적으로 변화시키면서 수행하였다. Stern-Volmer plot은 18 °C 및 30 °C에서 위에 언급한 것과 동일한 방법으로 emission intensity를 측정하고 상대적인 형광세기의 변화를 계산하여 준비하였다.

Acknowledgment. 이 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

REFERENCES

1. Fried, M. G. Measurement of protein-DNA interaction parameters by electrophoresis mobility shift assay. *Electrophoresis* **1989**, *10*, 366.
2. Carey, J. Gel retardation. *Methods Enzymol.* **1991**, *208*, 103.
3. Haq, I.; Ladbury, J. E.; Chowdhry, B. Z.; Jenkins, T. C.; Chaires, J. B. Specific binding of hoechst 33258 to the d(CGCAAATTTGCG)2 duplex: calorimetric and spectroscopic studies. *J. Mol. Biol.* **1997**, *271*, 244.
4. Hu, S. H.; Weisz, K.; James, T. L.; Shafer, R. H. H-NMR studies on d(GCTTAAGC)2 and its complex with berenil. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *204*, 31.
5. Feigon, J.; Denny, W. A.; Leupin, W.; Kearns, D. R. Interactions of antitumor drugs with natural DNA: ^{1}H NMR study of binding mode and kinetics. *J. Med. Chem.* **1984**, *27*, 450.
6. Conte, M. R.; Jenkins, T. C.; Lane, A. N. Interaction of minor-groove-binding diamidine ligands with an asymmetric DNA duplex. NMR and molecular modelling studies. *Eur. J. Biochem. FEBS* **1995**, *229*, 433.
7. Szabo, A.; Stolz, L.; Granzow, R. Surface plasmon resonance and its use in biomolecular interaction analysis (BIA). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1995**, *5*, 699.
8. Baranovsky, S. F.; Bolotin, P. A.; Evstigneev, M. P.; Chernyshev, D. N. Interaction of ethidium bromide and caffeine with DNA in aqueous solution. *J. Appl. Spectrosc.* **2009**, *76*, 132.
9. Larsen, R. W.; Jasuja, R.; Hetzler, R. K.; Muraoka, P. T.; Andrada, V. G; Jameson, D. M. Spectroscopic and molecular modeling studies of caffeine complexes with DNA intercalators. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 443.
10. Lakowicz, J. R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 3rd ed.; Springer Science & Business Media: Boston, MA, 2006.
11. Lee, S.; Huh, S. Measuring Fluorescence Anisotropy as One of Very Useful Analytical Methods to Obtain Detailed Information of the Complex Binding Interaction. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2017**, *38*, 406.
12. Ameloot, M.; vandeVen, M.; Acuna, A. U.; Valeur, B. Fluorescence anisotropy measurements in solution: Methods and reference materials (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **2013**, *85*, 589.
13. Sharma, R. A.; Gescher, A. J.; Steward, W. P. Curcumin: The story so far. *Eur. J. Cancer* **2005**, *41*, 1955.
14. Nafisi, S.; Adelzadeh, M.; Norouzi, Z.; Sarbolouki, M. N. Curcumin binding to DNA and RNA. *DNA Cell Biol.* **2009**, *28*, 201.
15. Burgos-Moron, E.; Calderon-Montano, J. M.; Salvador, J.; Robles, A.; Lopez-Lazaro, M. The dark side of curcumin. *Int. J. Cancer* **2010**, *126*, 1771.
16. Li, X. L.; Hu, Y. J.; Mi, R.; Li, X. Y.; Li, P. Q.; Ouyang, Y. Spectroscopic exploring the affinities, characteristics, and mode of binding interaction of curcumin with DNA. *Mol. Biol. Rep.* **2013**, *40*, 4405.
17. Koonammackal, M. V.; Nellipparambil, U. V.; Sudarsanakumar, C. Molecular dynamics simulations and binding free energy analysis of DNA minor groove complexes of curcumin. *J. Mol. Model.* **2011**, *17*, 2805.
18. Kurien, B. T.; Dillon, S. P.; Dorri, Y.; D'Souza, A.; Scofield, R. H. Curcumin does not bind or intercalate into DNA and a note on the gray side of curcumin. *Int. J. Cancer* **2011**, *128*, 242.