

碩士學位論文

ENU 돌연변이 진전 마우스 뇌조직절편의
조직학적 분석과 Agtpbp1 유전자의
Yeast two hybrid construct 제작



濟州大校 大學院

動物資源科學科

제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

朴 英 淑

2004年 6月

ENU 돌연변이 진전 마우스 뇌조직절편의
조직학적 분석과 Agtpbp1 유전자의
Yeast two hybrid construct 제작

指導教授 朴 燦 奎

朴 英 淑

이 論文을 農學 碩士學位 論文으로 提出함



朴英淑의 農學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ 印

委 員 _____ 印

委 員 _____ 印

濟州大學校 大學院

2004年 6月

Histological analysis of the new tremor mutant mouse brain and construction of Agtpbp1 bait plasmids for yeast two hybrid analysis

young - sook Park

(Under the supervision of assistant professor chankyu Park)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF AGRICULTURE

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOTEHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2004. 6

목 차

요 약	1
제 1 장	3
I. 서 론	4
1. 질병 모델로서 마우스의 이용	4
2. 유전자 기능 분석 방법	4
3. ENU를 이용한 돌연변이체 생성(ENU mutagenesis)	5
4. 진전의 연구	6
II. 재료 및 방법	8
1. 공시동물	8
2. 조직학	8
3. 면역조직학	9
4. 슬라이드 사진 촬영	9
III. 결 과	10
1. 진전 돌연변이 마우스와 정상마우스 뇌의 조직학적 관찰	10
2. 정상 및 진전 돌연변이 마우스 소뇌의 calbindin 면역조직학 분석	11
IV. 고 찰	15
제 2 장	16
I. 서 론	17
1. Pcd 마우스	17
2. Yeast two hybrid 분석	18
II. 재료 및 방법	20
1. Agtpbp1의 PCR 증폭	20
2. PCR 증폭 산물의 pPCRscript-Amp subcloning	20
3. Miniprep	21
4. 제한효소 절단	21
5. pGBKT7으로의 subcloning	21
III. 결과 및 고찰	23
Reference	30

그림 목 차

Figure 1. Comparison of anatomical structure and myelination pattern in the brain between tremor and wildtype mice.	12
Figure 2. Comparison of cerebellar structure between tremor and mutant mice.	13
Figure 3. Comparison of the morphology of purkinje cell dendrites between wildtype and tremor mutant mice.	14
Figure 4. Model of transcriptional activation by reconstitution of GAL4 activity	19
Figure 5. The subcloning strategy of Agtpbp1 fragments into the pGBKT7 plasmid.	25
Figure 6. The strategy of Agtpbp1 amplification by PCR.	26
Figure 7. The image of an agarose gel showing PCR amplification of Agtpbp1 using three different pairs of primers according to Agtpbp1 gene sequence.	27
Figure 8. Restriction analysis of the pPCRscript-Amp SK(+) - Agtpbp1 plasmids containing three different inserts after double enzymatic digestion with Nde I and Sall	27
Figure 9. The result of gel purification of NdeI and Sall digested Agtpbp1 inserts from three different plasmids.	28
Figure 10. Enzyme Sall and NdeI digested purification two DNA ligated into pGBKT7.	28
Figure 11. Structure of BD/baits constructs and pGBKT7 vector.	29
Table 1. primers used for amplifying Agtpbp1 gene	26

요 약

본 연구는 N-ethyl-N-nitrosourea(ENU) 돌연변이에 의해 생산된 전신 떨림 표현형을 나타내는 진전(tremor) 돌연변이 마우스와 뇌세포 사멸 증상을 나타내는 자연발생 돌연변이인 purkinje cell degenerations(pcd) 마우스의 표현형 유발에 관련된 분자유전학적 기전의 이해를 위해 이들 마우스의 뇌 조직에 대한 형태학적 이상 및 뇌세포 사멸 현상 등에 대한 관찰을 목적으로 수행되어졌다. 제1장에서는 유전자 기능을 대량으로 분석하는 방법 중의 하나로 ENU를 주사하여 생산된 인공돌연변이 생쥐들 중 진전 표현형을 가지는 돌연변이 마우스의 조직학적 특성을 분석하였다. 진전 마우스의 뇌 조직에 대하여 진전 증상과 관련될 것으로 추측되는 뇌세포 사멸 증상, 신경세포돌기의 신경수초형성 이상, 뇌구조의 발생학적 이상 등의 존재 여부를 관찰하기 위해 뇌 조직 절편에 대한 조직학적 분석 및 소뇌의 퍼킨지신경세포(purkinje cell)에 대한 면역 조직학적 분석을 수행하였다. 전반적인 뇌 조직의 구조면에서는 대뇌피질(neocortex), 후구(olfactory bulb), 해마(hippocampus), 시상(thalamus), 소뇌(cerebellum)등을 비롯하여 관찰 가능한 모든 부분에서 조직의 발생학적 또는 형태학적 이상을 나타내는 증거인 신경세포층 형성부전, 주요 nuclei의 형성 부전, picnotic cell의 존재 등을 발견할 수 없었다. 또한 LFBCV(luxol fast-blue cresyl violet) 염색에 의해 식별 가능한 신경수초(myelination)의 결핍, 주요 신경교련(neuronal commissure) 및 신경로(neuronal tract)의 이상 등도 발견할 수 없었다. 본 연구를 통해서 진전 표현형을 가지는 돌연변이 마우스의 뇌 조직에 대한 형태학적 이상의 관찰에서는 대조구로 사용된 정상 마우스와의 차이점들을 발견 할 수 없었다. 따라서 진전돌연변이 마우스의 세포생물학적 수준에서의 표현형 규명과 전신 떨림 현상의 원인규명을 위해서는 진전 마우스에서 돌연변이를 일으킨 유전자의 규명을 위한 유전학적 연구가 추가적으로 진행되어야 할 것으로 생각되어진다. 제 2장에서는 purkinje cell degeneration(pcd) 마우스 모델을 이용하여 뇌세포 사멸에 대한 기전을

밝히는 연구가 수행되었다. Pcd 마우스는 뇌신경세포 특히 퍼킨지신경세포가 죽어서 그 숫자가 감소하여 뇌신경계 이상을 보이는 마우스로 agtpbp1 유전자의 돌연변이에 의해 pcd 마우스의 이상 증상들이 나타나는 것으로 최근에 밝혀졌다. 하지만 아직까지는 agtpbp1 유전자의 역할에 대해서는 명확하게 밝혀진 바가 없다. 따라서 제 2장에서는 단백질간의 상호작용을 분석하는 연구 기법인 yeast two hybrid 분석을 통해 pcd 마우스의 이상증상 유발유전자인 agtpbp1 유전자와 상호작용하는 다른 유전자의 발굴을 통해 agtpbp1 유전자의 기전을 밝히기 위해 수행되었다. Yeast two hybrid 분석을 하기 위한 첫 단계로써 agtpbp1 유전자를 5'단편, 3'단편, full-length(전장형) 등의 3가지 형태로 구분하여 yeast two hybrid 분석에 필요한 binding domain(BD)을 포함하고 있는 pGBKT7 vector에 subcloning하여 yeast two hybrid 실험을 위한 bait construct를 제작하였다.



제 1 장



I. 서론

1. 질병 모델로서 마우스의 이용

Human genome project는 유전적 지도 작성, 물리적 지도 작성, 전체 유전체의 염기서열 결정을 목표로 1990년에 시작되어 현재 사람 유전체 구조의 분석을 목적으로 하는 구조유전체학 측면에서는 연구 목표의 달성이 거의 완료되었다(Stanford 등, 2001). 다음 단계로는 기능적 측면에서 유전체의 분석을 목표로 인체 질병과 관련된 유전자를 찾고 각 유전자들을 모델 생물 내에서 조작하여 돌연변이나 비정상적인 발현을 유도하여 생체 내에서의 기능을 규명하거나 조직별 및 세포별 유전자 발현의 양상을 파악하고자 하는 연구가 진행 중에 있다(Cordes 등, 2001). 이러한 기능유전체학 연구를 위해서는 실험동물 모델이 필요하며 마우스는 해부 및 생리구조가 사람과 매우 유사하고 상대적으로 짧은 세대간격을 가지며, 마우스의 유전체는 다른 동물들에 비해 형질전환 또는 유전자 제거(gene konckout) 기술과 같은 분자생물학적 연구 기법을 이용하여 쉽게 조작할 수 있기 때문에 매우 유용한 실험 모델 동물로서 이용되고 있다(David, 2004).

2. 유전자 기능 분석 방법

인위적인 돌연변이 마우스모델 동물의 개발을 통한 유전자 기능의 연구를 위하여 초기에는 X-선을 투사하여 돌연변이를 유발하는 방법이 사용되었다(Burmeister 등, 2002). 근래에 와서는 동물의 핵에 외부 유전자를 주입시켜 그 유전자가 생식세포에 전달, 발현되어 외래유전자가 도입된 동물을 생산하는 형질전환법(transgenesis)과 특정 유전자의 in vivo 역할을 규명하기 위해 특정유전자를 인위적으로 결손 시킨 후 그 유전자의 결손에 따른 표현의 변화를 분석하는 유전자결손법(gene targeting)

이 있다.

Gene targeting 방법에는 특정 유전자의 일부분을 제거하는 knockout 방식과 특정 유전자의 구조 내에 발현시키고자 하는 다른 유전자를 삽입하여 특정 유전자로부터 원래의 단백질 생산을 제거하며 다른 유전자의 발현을 유도하는 knockin 방식이 있다 (Burmeister 등, 2004). 근래에 와서는 돌연변이 모델동물의 개발 방법으로 화학적 돌연변이 유기법(chemical mutagenesis)을 이용한 모델 동물 개발방법이 제시되었다 (Bradley 등, 2002). 일반적으로 knockout이나 transgenic 동물의 경우를 제외하고는 변이된 유전자를 알 수가 없다. 그러므로 자연발생 돌연변이를 포함한 비선택적 돌연변이의 경우는 유전자의 기능 분석을 위하여 돌연변이된 유전자의 발굴 과정을 거치게 된다.

돌연변이 유전자의 규명에는 두 가지의 실험전략이 사용된다. 표현형 및 비교유전체학에 근거한 유전자의 기능예측을 통하여 유전자를 발굴 하는 “후보 유전자 이용법(candidate gene approach)”과 질병 유전자에 관한 정보 없이 유전자와 표현형의 위치적 상관관계를 이용한 “위치 클로닝법(positional cloning)”이 있다.



3. ENU를 이용한 돌연변이체 생성(ENU mutagenesis)

최근에는 마우스 유전체를 대상으로 대규모의 돌연변이 마우스 확보를 위해 N-ethyl-N-nitrosourea(ENU) mutagenesis가 수행 되어지고 있다(Balling 등, 2001). ENU는 실험동물 분야에서 발암 물질로서 난소종양 모델 동물을 만들기 위해 사용되어 왔으나, Russell 등(1979)에 의해 ENU가 정소내의 체세포 및 생식세포에 점 돌연변이를 무작위로 유발하는 유도 물질임이 알려지면서 마우스를 이용한 기능유전체학(functional genomics) 연구에 활용되기 시작했다(Krack 등, 2001). ENU 처리에 의해서 단기간에 많은 수의 돌연변이 마우스를 발생 시킬 수 있으며 유전자의 부분적인 기능 손실(partial loss of function), 원래 기능의 역작용(negative function), 기능 획득(exaggerated function)과 관련한 돌연변이를 얻을 수 있으며 이들로부터 새로운 표현형을 분석하여 유전자들의 기능을 밝혀낼 수 있다(Brown 등, 2000). 인간과 생리적인 유사성을 가지면서 실험적인 측면에서 편리성을 가지는 동물인 생쥐에서 다양

한 표현형을 유발시키고, 인간의 질병과 비슷한 양상을 나타내는 표현형을 찾은 후 돌연변이가 일어난 유전자를 찾는 이 방법은 마우스의 유전체 기능 분석(functional genome analysis)에 대한 모델 시스템으로써 다양한 활용성을 보여준다(Bradley 등, 2000). Balling 등(2000)은 새로운 돌연변이체 계통(line)을 생산하기 위해 C3HeB/FeJ male 마우스에 ENU를 주사 하여 정세포에 돌연변이를 유도한 다음 C3HeB/FeJ female 정상 마우스와 교배시켜 F1 자손을 생산했다. F1 자손을 통하여 우성과 불완전 우성의 표현형을 나타내는 마우스의 분석이 가능하며, 열성 표현형을 선별하기 위해 F1의 수컷과 정상 암컷을 교배하여 나온 F2 마우스 중 F1의 수컷과 교배하여 F3을 획득한 후 돌연변이를 검색하여 열성 유전자를 갖고 있는 돌연변이체를 확보하였다(Brown 등, 2000). 이 연구에서 이들은 마우스로부터 선천성 기형(congenital malformations), 화학적, 생화학적, 혈액학적 및 면역학적 이상증상을 나타내는 돌연변이 마우스들을 생산 할 수 있었으며 행동학적으로도 비정상적인 행위를 표출하는 마우스들을 관찰할 수 있었다. Nolan 등(2000)은 ENU mutagenesis 방법을 사용하여 26,000 마리가 넘는 ENU 마우스를 생산 및 분석하였다.

ENU를 이용한 돌연변이체의 생산은 돌연변이 모델 마우스 자원의 획기적인 성장을 가져오게 했으며 포유류 유전학에 있어서 유전자 기능의 체계적인 연구를 향한 첫 단계였다. 이러한 끊임없는 노력에 의해서 현재 돌연변이 마우스의 자원은 인간의 유전적 질병 모델로서 포유동물 유전자 기능 연구에서 중추적인 역할을 하고 있다(Nolan 등, 1998).

4. 진전의 연구

파킨슨 증후군을 포함한 여러 퇴행성 뇌질환에서 발생하는 몸이 떨리는 증상의 예방 및 치료법 연구를 위하여 마우스 모델을 이용한 진전 유발 기전에 대한 많은 연구들이 진행되고 있으며 진전증상을 나타내는 마우스들이 ENU mutagenesis 연구를 통하여 생산되었다(Balling, 2000; Schimenti 등, 2000; 조규혁 등, 2002).

최근 국내에서 생산되어진 ENU 돌연변이 마우스 중에서 진전 증상을 나타내는 마우스가 보고되었다(조규혁 등, 2002). 진전이란 몸체의 rhythmic oscillatory

activity를 말하며 크게 4가지의 생리적인 기전(근 수축계의 물리적 이상, 반사 신경계 이상, 중추신경계 조절 기전 이상, 신경전달 경로의 이상)에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다(Krack 등, 2001). 마우스 모델을 이용한 지금까지의 연구를 통하여 α -synuclein(Hardy 등, 1999), ataxin(Koeppen 등, 1998), attractin(Kuramoto 등, 2002), fgf14(WangQ 등, 2002), fmr1(Hagerman 등, 2002), mbp(Delassalle 등, 1981), plp(Griffiths 등, 1998), pmp22(Suter 등, 1992), parkin(Shimura 등, 2000), sodium channel(Meisler 등, 200) 등의 유전자들이 진전증상에 관련성을 가진다는 것이 보고되었다. 또한 MPTP(1-methyl- 4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)와 같은 신경독소의 주사를 통한 nigrostriatal dopaminergic system의 파괴를 통하여서도 진전의 유발이 가능하다(Hirsch 등, 2003).

진전을 일으키는 주요 원인으로 신경수초감소(demyelination), olivocerebellar circuit의 이상, 뇌간의 이상 등이 보고되고 있으나 다양한 원인들에 의해 진전이 유발되는 것으로 알려져 있다(Gwinn 등, 2002; Illarioshkin 등, 2002; Gnetika Jankovic, 2002). 진전과 관련된 표현형을 보이는 마우스 종에는 pcd(purkinje cell degeneration), nervous, tottering(Hess 등, 1996), lurcher(Zuo 등, 1997), leaner(Doyle 등, 1997) 등의 자연발생 돌연변이 마우스가 있다. 이들 마우스들의 표현형은 약 2-3 주령부터 떨림 표현형이 관찰되기 시작하는 adult onset 진전 증상을 나타낸다. 알려져 있다(Gwinn 등, 2002; Illarioshkin 등, 2002; Gnetika Jankovic, 2002). 진전과 관련된 표현형을 보이는 자연발생 돌연변이 마우스에는 pcd(purkinje cell degeneration), nervous, tottering(Hess 등, 1996), lurcher(Zuo 등, 1997), leaner(Doyle 등, 1997) 등등이 보고되고 있다.

II. 재료 및 방법

1. 공시동물

한국화학연구원(대전)에서 근교계 BALB/c를 이용한 ENU 돌연변이에 의해 생산된 마우스를 공급받아 제주대학교 동물자원과학과 실험동물실에서 진전 돌연변이를 가지는 이형접합자 암수 마우스의 교배에 의해 이형접합자(heterozygous) F1 자손이 생산되었다. 돌연변이와 정상동물은 2명의 독립적인 관찰자에 의한 진전 증상의 판정 유무에 의해 구분되었다. 3-4주령의 동물들이 실험에 사용되었으며 사육환경은 non-SPF(Specific pathogen free) 환경 이었다.

2. 조직학

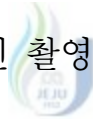


3-4주령의 진전 마우스(진전/?) 와 정상 마우스(+/)를 ketamine(200mg/kg)과 xylazine(10mg/kg)을 이용하여 깊게 마취시킨 후 심장을 통하여 PBS 버퍼를 주입하여 혈액을 제거한 다음 Bouin's 고정액 또는 methanol/acetic acid(3:1) 고정액으로 마우스조직을 고정시켰다. 뇌 조직은 완전고정을 위하여 적출 후 동일한 고정액속에서 12시간동안 고정되었고 파라핀 블록에 포매 후 횡단면(coronal), 시상단면(sagittal) 또는 수평단면(horizontal)으로 절단되었다. 뇌 조직을 7 μ m 두께로 절단하여 난백/glycerol(1:1)을 이용하여 슬라이드 위에 고정하였다. 건조된 슬라이드는 xylene을 이용하여 파라핀을 제거 후 100, 90, 75, 50%의 ethanol을 거쳐 수화(hydration)후 매 10회(70 μ m) 간격으로 조직절편을 hematoxylin/eosin(H&E), luxol fast-blue cresyl violet(LFBCV) 또는 cresyl violet 단독염색을 이용하여 염색되었다. 염색된 슬라이드는 파라핀 제거 후 탈수화(dehydration)를 위하여 역순으로 ethanol 처리 후 Permount(Fisher scientific)용액을 이용하여 커버슬립으로 고정되었다.

3. 면역조직학

3-4주령 마우스를 methanol/acetic acid(3:1)를 이용하여 위에서 설명한 방법으로 심장관류(cardiac perfusion)를 통하여 조직고정 작업을 실시하였다. 뇌 조직은 파라핀 블록에 포매 후 시상면상으로 절단되었다. 파라핀 절편을 7 μ m의 두께로 자르고 절단된 조직을 poly-L-lysine(Sigma)으로 처리된 슬라이드위에 올린 후 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 건조하였다. 파라핀 슬라이드는 xylene을 이용한 파라핀제거작업을 거친 후 수분첨가 및 수분제거 과정을 거쳤다. 조직 슬라이드는 PBS를 이용하여 세척한 다음 1차 항체로 mouse calbindin D-28 monoclonal antibody(1:1500, Sigma)를 이용하여 4 $^{\circ}$ C에서 12 시간 동안 배양되었다. Biotin이 결합된 anti-mouse IgG 2차 항체 및 HRP-conjugated extravidin 3차 항체(Sigma) 처리 후 DAB(Sigma)를 이용하여 발색 반응을 실시하였다. 발색반응 후 hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

4. 슬라이드 사진 촬영



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

염색된 슬라이드를 광학현미경(Olympus BX51)을 이용하여 관찰하였으며 관찰된 이미지의 사진은 DP12 digital camera(Olympus)와 OLYSIA(Olympus) digital imaging software를 이용하여 촬영되었다.

III. 결 과

1. 진전 돌연변이 마우스와 정상마우스 뇌의 조직학적 관찰

진전 돌연변이 마우스의 표현형 유발에 관련된 분자생물학적 기전의 규명을 위해서는 유전체학 기법을 이용한 유전자 발굴뿐만 아니라 발생학 실험 기법들을 이용한 pcd 마우스의 조직 또는 세포들의 발생학적 이상유무에 대한 분석이 필요하다. 진전 돌연변이 마우스의 전반적인 뇌 구조의 형성 및 발달 상태를 조사하기 위하여 진전 마우스와 대조구로 사용된 동복 정상마우스의 뇌를 적출 및 고정하여 시상면상 및 수평면상으로 미세절단 후 hematoxylin/eosin(H&E), cresyl violet 및 LFBCV 염색을 각각 실시한 후 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다. 대뇌피질, 후구, 해마, 시상, 소뇌 등을 포함한 전반적인 뇌 구조의 형성에 있어서 피질부의 층판형성(cortex lamination pattern), 주요 핵의 정상적인 형성, 신경세포의 밀도 등을 포함하여 진전 마우스의 뇌 조직 절편들은 형태학적인 측면에서 정상마우스와 차이가 없었다 (Figures 1, 2).

Apoptotic 신경세포에 대한 정확한 관찰을 위해서는 TUNEL 분석방법이 주로 사용되나 일반적으로 H&E 염색을 실시하였을 경우에도 apoptosis 과정에 있는 세포들은 eosin에 의해 진하게 염색되는 picnotic cell들이 관찰된다. 진전 마우스의 H&E 염색에서는 picnotic cell 들로 분류될 수 있는 세포들은 관찰되지 않았다. 그러므로 진전마우스의 경우 최소한 신경세포의 대규모의 programmed cell death는 없을 것으로 사료된다.

신경세포 축삭의 수초화 이상의 경우 나타나는 대표적인 표현형은 진전이다 (Kuramoto 등, 2001). 진전 돌연변이 마우스에서 수초화 이상 유무를 관찰하기 위하여 LFBCV 염색을 실시하였다. Figure1에 나타난 것처럼 진전 돌연변이 마우스와 대조구가 LFBCV 염색패턴에서 차이가 없었으며 그림에 나타나지 않은 뇌의 다른 부분에서도 비슷한 염색정도를 나타내었다. 그러므로 진전돌연마우스의 경우 신경수초

감소, 주요 신경교련 또는 신경로의 발달이상 등은 없는 것으로 사료된다.

2. 정상 및 진전 돌연변이 마우스 소뇌의 calbindin 면역조직학 분석

진전 마우스 소뇌에 대한 형태학적 고찰을 위하여 정상시료 이외에도 Purkinje cell 변위 현상(ectopia)을 보이는 cdf(cerebellar deficient folia, Park 등, 2002) 돌연변이 마우스와 Purkinje cell 사멸 표현형을 가지고 있는 pcd(Fernandez 등, 2002) 마우스의 뇌 조직 미세절편을 비교시료로 사용하였다. Figure 2에 나타난 것처럼 진전 돌연변이 마우스의 소뇌구조는 foliation 정도, 소뇌의 크기, 소뇌세포들의 위치 등에서 정상마우스와 동일한 형태를 나타내었다. 또한 과립세포층(granule cell layer) 형성과 신경세포의 밀도 등에서도 정상마우스와의 차이를 발견할 수 없었다. Calbindin 면역조직학을 이용하여 Purkinje cell들을 염색한 후 관찰하였을 때, 모든 Purkinje cell 들은 Purkinje cell층에 존재하였으며 위치가 변화된 Purkinje cell들은 관찰되지 않았다. Purkinje cell들의 숫자 또한 정중절단 시상면 절편들을 이용하여 돌연변이 마우스와 정상마우스를 비교하였을 때 정상마우스의 경우 평균 852개(n=3), 돌연변이마우스의 경우 평균 843개(n=3)로써 서로 비슷하였다. 이는 소뇌 Purkinje cell의 전체 숫자를 비교한 것은 아니나 본 연구에 사용된 진전 마우스에서는 apoptosis에 의한 Purkinje cell의 대규모 감소는 없음을 보여준다. Calbindin으로 염색된 Purkinje cell 수상돌기의 구조 또한 정상마우스와 진전마우스의 비교에서 차이가 없었으며 Purkinje cell 축색돌기의 팽윤현상(swelling)이나 사멸현상 또한 발견되지 않았다(Figure3).

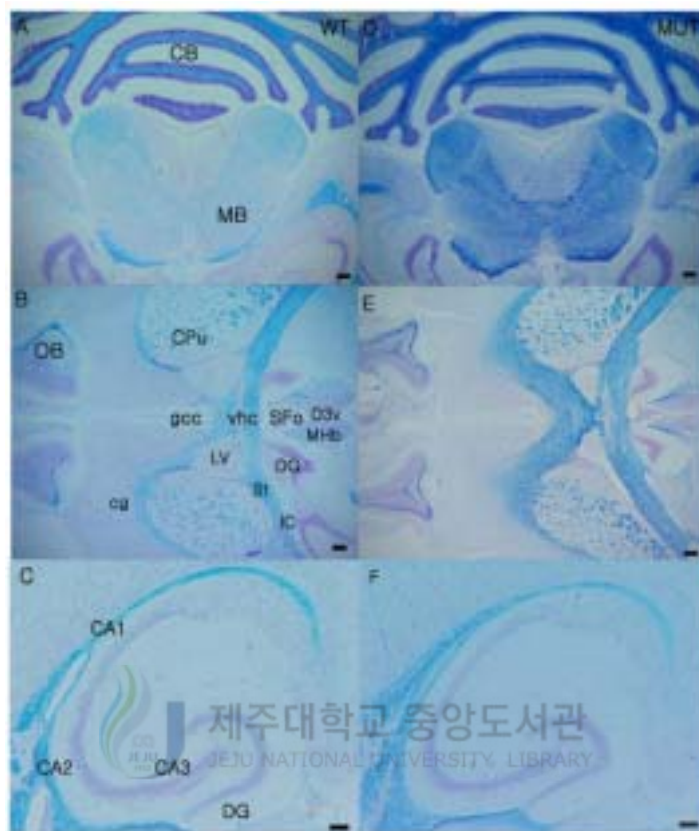


Figure 1. Comparison of anatomical structures and myelination pattern in the brain between tremor and wildtype mice. The horizontal sections of normal (A, B, C) and tremor mutant (D, E, F) are stained by LFBCV. The degree and pattern of myelination visualized by luxol fast blue staining showed no difference between normal and tremor mutant mice in all regions of the brain observed. Abbreviations: WT, wildtype; MUT, mutant; CA1, CA1 field of the hippocampus; CA2, CA2 field of the hippocampus; CA3, CA3 field of the hippocampus; CB, cerebellum; cg, cingulum; CPu, caudate putamen; D3v, dorsal 3rd ventricle; DG, dentate gyrus; gcc, genu of the corpus callosum; IC, internal capsule; MB, midbrain; LV, lateral ventricle; MHb, medial habenular nucleus; SFo, subfornical organ; ST, stria terminalis; vhc, ventral hippocampal commissure. Scale bar : 200 μ m.

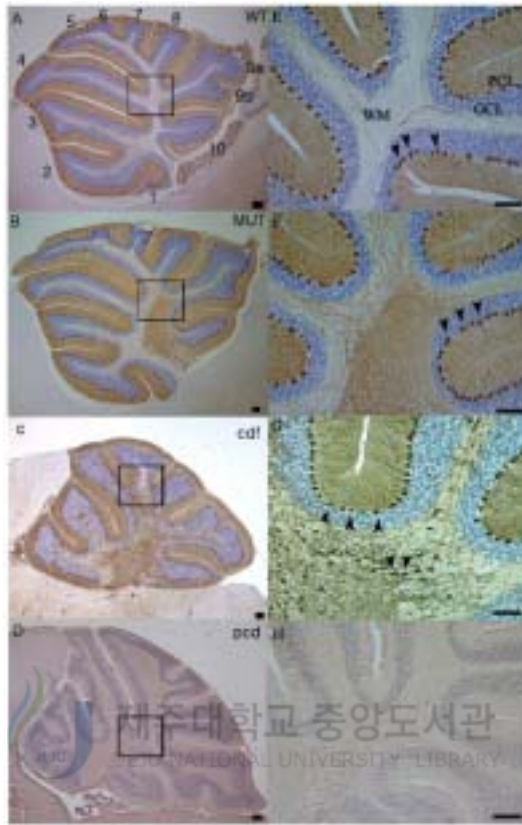


Figure 2. Comparison of cerebellar structures between tremor and mutant mice. The cerebellar structure of wildtype (A, E), tremor (B, F) and pcd(D, H) mice was compared by calbindin-D28 immunohistochemistry. The images in the right column (E, F, G, H) are the enlarged views of the regions indicated by squares in the left column (A, B, C, D), respectively. The lobule numbers of the normal cerebellum are indicated in "A". There is no difference in the pattern of lobulation and the lamina structure of the cerebella between wildtype (A, E) and tremor mutant mice(B, F). Purkinje cell ectopia(C, G) and degeneration(D, H) observed from cdf and pcd mice(purkinje cells are indicated by arrow heads), respectively, are not observed from tremor mutant mice. Abbreviations: WT, wildtype; MUT, mutant; WM, white matter; PCL, Purkinje cell layer; GCL, granule cell layer. Scale bar: 200 μ m.

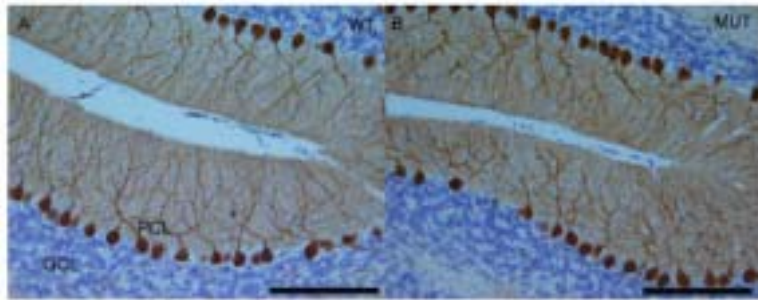


Figure 3. Comparison of the morphology of Purkinje cell dendrites between wildtype and tremor mutant mice. Purkinje cells are stained with the calbindin-D28 antibody and counterstained with hematoxylin. There is no difference in the shape of purkinje cell dendrites and the density of granule cell layer between wildtype (A) and tremor mutant mice (B). Abbreviation: WT, wildtype; MUT, mutant; GCL, granule cell layer; PCL, Purkinje cell layer. Scale bar: 200 μ m.

IV. 고찰

Attractin, mahogany, zitter 등의 myelination 이상 돌연변이나 Rora 유전자 돌연변이에 의한 staggerer 마우스는 진전과 운동실조증(ataxia) 증상이 마우스의 나이가 많아짐에 따라 그 정도가 심해지는 진행성을 나타낸다(Mariani 등, 2001 and Kuramoto 등, 2001). 그러나 본 연구에서 사용된 진전 돌연변이 마우스의 경우에는 처음으로 떨림 표현형이 관찰되기 시작하는 것은 약 2-3주령부터였으며 12개월이 지난 후에도 진전의 정도가 더 심해지는 것을 관찰할 수 없었으며 다른 행동학적인 이상도 관찰할 수 없었다. 또한 12개월령 이상 된 진전 마우스의 뇌 조직 절편을 관찰하였을 때도 새로운 표현형은 나타나지 않았다. 그러므로 본 실험에 사용된 진전 마우스의 경우는 점차 증상이 심해지는 진행성 진전과는 그 특성을 달리하는 것으로 사료된다.

지금까지 밝혀진 유전성 진전증상의 유전양식은 대부분의 경우 우성유전을 나타내는 것으로 보고되었다(Munroe, 2000). 운동실조증, 경련성장애 및 진전 증상을 나타내는 경우 발생학적 이상에 의한 뇌조직학 또는 병리학에 있어서 이상을 나타내는 경우도 있으나 명확한 이상을 관찰할 수 없는 경우도 많이 보고되었다(Lertrts, 1998).

본 연구에서 진전 마우스의 광학현미경학적 관찰을 통해서도 명확한 조직학적 및 발생학적 이상을 발견할 수 없었다. 따라서 진전돌연변이 마우스의 표현형은 명확한 뇌조직구조의 이상이 아닌 신경세포 자체의 미세한 이상에 의해 진전증상이 발생하는 것이거나 중추신경계가 아닌 말초신경계의 이상 또는 골격근조직의 이상일 수도 있을 것으로 사료된다. 그러므로 형태학적 분석을 이용한 진전 돌연변이 마우스에 대한 고찰만으로는 이 마우스의 진전 유발에 대한 분자기전의 연구가 쉽지 않을 것으로 생각되며 향후의 진전유전자 지도 작성을 통한 후보유전자의 선정과 이들 후보유전자들을 대상으로 한 돌연변이의 확인 등의 분자유전학적인 정보가 매우 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 사용된 진전 마우스의 이상유전자의 위치가 지금까지 밝혀진 진전 관련 유전자의 위치와 다른 곳에 위치할 경우에는 진전연구에 대한 새로운 마우스 모델로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

제 2 장



I. 서론

1. Pcd 마우스

Purkinje cell degeneration(pcd) 돌연변이 마우스는 행동학 적으로는 운동 실조증 및 진전증상을 나타내는 모델 동물로 C57BR/cdJ 품종에서 나타난 자연발생 돌연변이 마우스이다. 소뇌에 존재하는 주출력(major output) 신경세포인 Purkinje cell 이 죽어서 그 숫자가 감소하여 야기되는 심한 행동학적 비정상성으로 인해 쉽게 정상 마우스들과 식별이 가능 하다(Mullen 등, 1976). Pcd 마우스는 생후 15-18일령에서 신경세포의 퇴행이 급격하게 진행된다(Hawkes 등, 2003). 3주에서 4주령 사이에 약간의 운동실조증상이 나타나며, 망막(retina) 및 후구(olfactory bulb)에서 역시 신경세포의 퇴행이 진행되며, 성숙한 수컷은 비정상적인 정자를 갖는다는 사실이 보고되었다(Handel 등, 1981). Pcd 마우스의 표현형은 소뇌에서 아주 명확하게 나타난다. Pcd 마우스를 포함한 소뇌 이상을 가지는 마우스 모델은 다음과 같은 3가지 면에서 실험적으로 매우 유용하다. 첫째, 마우스에서 소뇌의 발달기간은 약 6주 정도로 짧은 기간 내에 모든 조직의 형성이 이루어지기 때문에 발생학적 손상뿐만 아니라 환경적인 손상도 평가가 가능하다. 둘째, 이상증상을 나타내는 소뇌 그 자체가 생명 유지에 크게 관여하지 않기 때문에 동물이 소뇌이상에 기인하여 치사되는 경향이 적어 돌연변이 마우스를 성숙한 후에도 실험을 위한 모델 동물로써 이용할 수 있다. 셋째, 소뇌의 손상은 운동조절에 관련된 문제로써 그에 따른 표현형이 명백하게 나타나기 때문에 소뇌가 비정상적인 마우스는 일반적으로 외관상의 관찰만으로도 쉽게 구별될 수 있다(Hawkes, 2003).

최근 pcd 돌연변이 마우스의 원인유전자가 positional cloning에 의해 agtpbp1으로 밝혀졌다(Fernandez-Gonzalez 등, 2002). Agtpbp1 cDNA의 크기는 3.6kb 이며 1157개의 아미노산으로 구성되어 있다(Soumare 등, 2000). 또한 Agtpbp1은 ATP/GTP binding motif와 핵 nuclear binding motif 포함한 zinc carboxypeptidase와 유사한 특

징을 가지고 있는 것으로 보고되었다. 그러나 현재까지 Agtpbp1에 대해서는 그 기능이 명확히 밝혀져 있지 않다.

Soumore 등(2000)에 의하면 agtpbp1은 뇌조직과 정소에서 매우 높은 유전자의 발현을 나타내었다. 세포내에서의 Agtpbp1 단백질의 위치는 세포질과 핵에서 모두 관찰되었다(Soumare 등, 2000). 비록 Agtpbp1 유전자와 pcd 표현형의 상관성은 밝혀졌으나 유전자와 표현형 사이에 존재하는 분자기전은 불명확하다.

2. Yeast two hybrid 분석

세포수준에서의 표현형 규명과 전신 떨림 현상의 원인 규명을 위해서는 진전 마우스에서 돌연변이가 된 유전자의 작용기전에 대한 연구가 필요하다. 제 2장에서 수행된 본 연구는 pcd 표현형에 대한 Agtpbp1의 역할을 규명하기 위해 Agtpbp1과 상호작용 하는 단백질을 찾는 방안으로 yeast two hybrid 분석을 선택하였다(Song 등, 1989).

Yeast two hybrid 분석방법은 새로운 단백질간의 상호작용을 밝히고 추측했던 상호작용의 확인, 상호작용하는 domain을 규명 하는데 유용한 방법이다(Figure 4). Yeast two hybrid의 이론적 배경은 yeast의 GAL4 단백질과 같은 transcription activator가 binding domain(BD)과 activation domain(AD)으로 구분되어있는 특징을 이용하는 것으로 GAL4 단백질의 BD와 AD는 전혀 관련 없는 단백질에 연결시켜도 여전히 그 기능을 독립적으로 보유한다는 사실이 Song 등(1989)에 의해서 발표된 후 yeast two hybrid 분석은 단백질간의 상호작용연구에 이용되어 많은 유용한 결과를 도출하였다(Cheng 등, 2003; Shluemd 등, 2003; Rothstein 등, 1994).

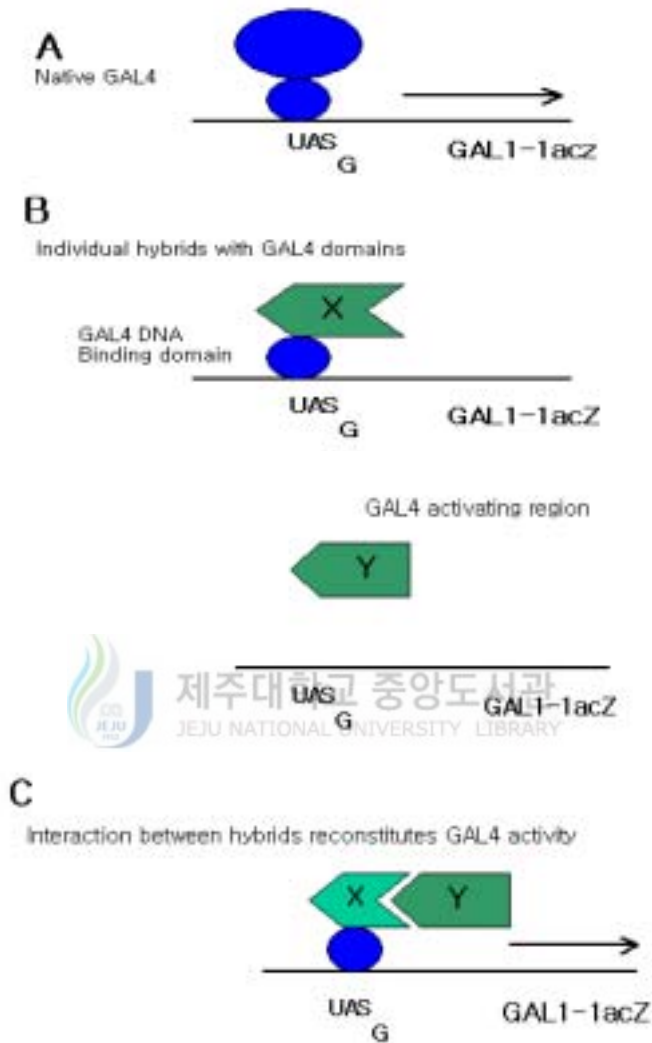


Figure 4. Model of transcriptional activation by reconstitution of GAL4 activity (Song 등, 1979) A. The native GAL4 protein contains both DNA-binding and activating regions and induces GAL1-1acZ transcription. B. Hybrid containing either the DNA-binding domain (upper) or activating region (lower) is incapable of inducing transcription. C. A protein-protein interaction between proteins X and Y brings the GAL4 domains into close proximity and results in transcriptional activity.

II. 재료 및 방법

1. Agtpbp1의 PCR 증폭

PCR 반응액은 50 ng의 Agtpbp1 plasmid DNA와 0.4 μ M의 프라이머, 0.2 mM의 dNTP, 2.5 U의 pyrobest Taq polymerase(TaKaLa)를 함유하였으며 총 용량은 50 μ l로 하였다. NdeI188-SalI3780 프라이머를 이용한 증폭은 94°C에서 3분, 94°C에서 30초, 59°C에서 30초, 72°C에서 3분을 35 cycles 수행한 후 마지막으로 72°C에서 4분 동안 extension 과정을 수행하였으며, 프라이머 NdeI1865-SalI3780와 NdeI1853-SalI3780 프라이머를 이용한 증폭은 94°C에서 3분, 94°C에서 30초, 59°C에서 30초, 72°C에서 2분을 35 cycles 수행한 후 마지막으로 72°C에서 4분 동안 extension 과정을 수행하였다. PCR 증폭 산물은 EtBr(ethidium bromide)이 포함된 0.8% TAE agarose gel에서 전기영동 후 UV램프 상에서 관찰되었다.

2. PCR 증폭 산물의 pPCRscript-Amp subcloning

PCR 산물을 0.8% TAE agarose gel을 이용하여 100 V에서 30분간 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 파장 365 nm UV램프 상에서 특정 DNA 밴드를 절취하여 AccuPrepTM gel purification kit(Bioneer)을 이용하여 정제하였다. 정제된 DNA를 pPCRscript-Amp kit(stratagene)을 사용하여 제작회사의 실험방법에 따라 PCR 산물과 pPCRscript-Amp vector의 ligation을 실시하였다. Ligation이 끝난 DNA는 3M Sodium acetate(pH5.2)와 isopropanol을 첨가한 후 15,000rpm에서 15분 동안 원심분리 후 70% ETOH 로 세척하여 5 μ l의 ddH₂O에 녹였다. 그중 2 μ l를 electroporation 방법을 이용하여 DH10B competent 세포 내로 형질전환을 실시하였다. 37°C 진탕혼합기에서 300rpm으로 1시간 동안 배양 후 X-GAL 처리를 한

ampicillin LB 플레이트에 plating한 후 37°C 배양기에서 12시간 이상(overnight) 배양되었다.

3. Miniprep

플레이트에 형성된 colony로부터 DNA를 추출하기 위해 단일 colony를 3ml의 ampicillin LB 배지에 접종하여 37°C에서 12시간 이상 진탕배양 하였다. 배양이 끝난 세포 1.5ml를 15000rpm에서 5분간 원심 분리하여 배지를 제거하고, 여기에 200 μ l의 boiling lysis 용액(8% sucrose, 0.5% TritonX-100, 50mM EDTA, 10mM Tris Hcl(pH8.0), 50mg/ml의 lysozyme을 첨가 후 100°C에서 50초간 침지 후 15000 rpm에서 5분간 원심 분리하였다. 상층액을 회수하여 DNA를 침전 후 30 μ l ddH₂O에 용해시켰다.

4. 제한효소 절단



제한효소 절단을 위하여 Agtppb1의 염기서열 188-1853, 1865-3780, 188-3780을 포함하는 pPCR script amp 클론의 경우 각각 2 μ g의 DNA를 사용 하였으며 pGBKT7 벡터 DNA는 120 ng을 사용하였다. 20 U의 NdeI과 SalI 제한효소를 첨가하여 총 반응 용량은 40 μ l로 하여 37°C에서 3시간 동안 배양 하였다.

5. pGBKT7으로의 subcloning

다량의 DNA 추출을 위하여 QIAGEN plasmid purification kit(QIAGEN) 사용 되었다. pGBKT7과 PCRscript 클론의 DNA를 함께 제한효소 SalI과 NdeI (promega)로 절단하였다. 제한효소 절단이 끝난 후 0.8% TAE agarose gel에서 전기영동을 실시하여 UV 램프 상에서 관찰 후 gel purification kit (Bioneer)을 이용하여 삽입된 DNA밴드를 준비 및 정제 하였다. pGBKT7 벡터 DNA와 각각의 삽

입단편 DNA는 16℃에서 12시간 동안 배양하여 ligation을 실시하였다. Ligation 산물들은 앞에서와 마찬가지로의 방법을 이용 하여 형질전환 및 positive clone 들의 스크리닝이 실시되었다.



II. 결과 및 고찰

Yeast two hybrid 스크리닝을 위해서는 binding domain(BD)을 포함하는 bait construct와 activation domain(AD)을 포함 하는 prey library의 작성이 필요하다. 본 연구는 agtpbp1 유전자를 이용한 yeast two hybrid 스크리닝을 위한 BD-domain bait construct를 제작하기 위해 수행되었다. Imageclone으로부터 구입된 플라스미드 (ID:3175015) 내의 Agtpbp1 유전자를 직접적인 제한효소 절단에 의해 BD domain 벡터인 pGBKT7으로 subcloning 하는 것은 두 플라스미드의 molecular cloning site에 존재하는 제한효소 site가 일치하지 않아 가능하지 않았다. 이를 해결하기 위해서 agtpbp1 유전자의 말단에 제한효소 NdeI(CATATG)와 SalI(GTCGAC)의 인식 염기 서열을 추가하여 agtpbp1 유전자를 변경한 다음 NdeI과 SalI으로 절단된 pGBKT7 벡터에 제한효소 인식염기가 첨가된 agtpbp1의 PCR 산물을 subcloning 하는 방법이 선택되었다. 이러한 subcloning 전략의 수행을 위해서는 2번의 subcloning 과정이 필요하다(Figure 5).

먼저 agtpbp1 유전자의 말단에 제한효소 삽입을 위하여 NdeI과 SalI의 인식 염기 서열이 첨가된 PCR 프라이머가 디자인 되었다(Table 1). 3쌍의 프라이머 조합을 이용하여 agtpbp1 염기서열 188-1853을 포함하는 5' 쪽 단편, 염기서열 1865-3780을 포함하는 3' 쪽 단편, 염기서열 188-3780을 포함하는 full-length cDNA 단편들이 PCR 을 이용하여 각각 증폭이 되었다(Figure 6). PCR 산물의 크기는 위에서 언급된 순서 대로 각각 1.6Kb, 1.9Kb 및 3.6Kb 였다(Figure 7). PCR을 수행할 때는 PCR의 정확도를 높이기 위하여 proof reading 기능을 가지는 DNA 중합효소를 이용하여 실시하였으며 그 결과 생성된 PCR 산물은 blunt end 형태를 갖게 된다. Blunt end를 가지는 PCR 산물의 클로닝을 위하여 TA cloning방식인 아닌 blunt end cloning 기법이 사용되었다. Blunt end cloning 벡터인 pPCRscript-Amp에 subclone된 DNA 단편들은 cloning site에 NdeI 과 salI 제한효소의 인식염기를 보유하게 되었으며 pGBKT7 내로의 subcloning을 위한 다량의 DNA를 얻기 위하여 50ml 정도의 배지에서 배양 후

배양된 박테리아들로부터 플라스미드 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 NdeI 과 salI 제한효소로 절단한 후 gel purification 과정을 거쳐서 정제되었다(Figures 8, 9).

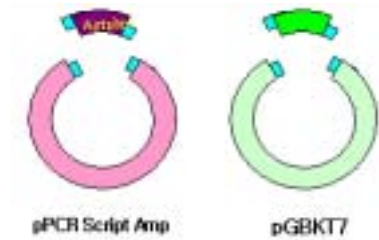
BD construct 구성을 위한 마지막 단계의 클로닝을 위하여 pGBKT7 벡터에 삽입 될 agtbbp1 DNA 단편을 절단하는데 사용하였던 동일한 제한효소인 NdeI과 SalI 제한효소로 절단하여 정제 후 pGBKT7과 agtbbp1 염기서열 188-1853을 포함하는 5' 쪽 단편, 염기서열 1865-3780을 포함하는 3'쪽 단편, 염기서열 188-3780을 포함하는 full-length cDNA 단편들을 이용한 ligation을 수행하였다. Ligation 산물을 kanamycin 이 포함된 LB 플레이트에 plating후 kanamycin 저항성을 가지며 X-gal 발현을 나타 내지 않은 positive colony들을 선발하여 이들 콜로니들을 배양하여 배양된 박테리아 에서 플라스미드를 추출하였다. pGBKT7벡터에 삽입된 DNA들이 의도하였던 agtbbp1 DNA 단편인지를 확인하기위하여 positive colony 들로부터 추출된 플라스미 드 DNA들을 NdeI과 SalI 효소로 다시 절단하여 전기영동을 실시하였다. Figure 10에 나타난 것처럼 NdeI과 SalI 으로 절단하였을 경우 7.3 kb 벡터와 3개의 Agtbbp1 단 편에 해당하는 DNA 단편들이 나타났으며 그 결과 yeast two hybrid 스크리닝을 위 한 bait construct가 정상적으로 만들어 졌음을 확인할 수 있었다. 또한 각각의 construct들은 yeast two hybrid 스크리닝의 과정에서 단백질로 전환되기 때문에 construct 내의 염기서열의 정확성에 대한 검정이 필요하다. 이를 위하여 3개의 완료 된 bait construct에 대한 염기서열 분석을 실시하였으며 삽입된 Agtbbp1 단편들의 염 기서열에 이상이 없음을 확인하였다. 완성된 BD/bait construct의 구조와 pGBKT7의 구조가 Figure11에 나타나있다.

비록 yeast two hybrid 분석 과정이 많은 노력이 들어가는 실험이기는 하지만 yeast two hybrid screening은 특정 단백질과 실제의 생화학 반응과정에서 상호작용을 하는 미지의 단백질들을 발굴하는 매우효율적인 실험기법이다. 본 연구에서 제작된 Agtbbp1의 BD/bait construct 또한 향후의 본격적인 yeast two hybrid screening 실험 을 통해서 pcd 돌연변이 마우스의 뇌세포 사멸기전과 관련한 새로운 단백질을 발굴 하는데 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.

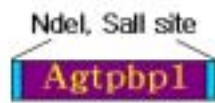
A. Imageclone ID: 3157015



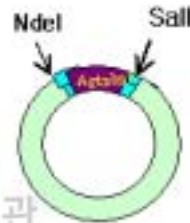
D. Restriction digest with NdeI and Sall



B. PCR with NdeI and Sall primers



E. Subcloning into pGBKT7



C. Subcloning into pPCR script

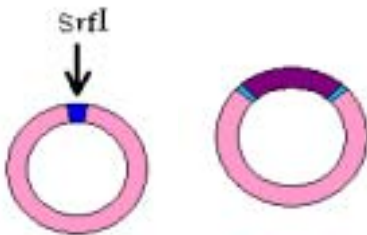


Figure 5. The subclone strategy of Agtppb1 fragments into the pGBKT7 plasmid. A. Agtppb1 cDNA was obtained from imageclone. B. Agtppb1 amplification by PCR with NdeI and Sall primers. C: Three different fragments of Agtppb1 were subcloned into pPCRScript-Amp vector. D. Double digestions of product(C) and pGBKT7 vector with restriction NdeI and Sall. E. Three different fragments of Agtppb1 were subcloned into pGBKT7.

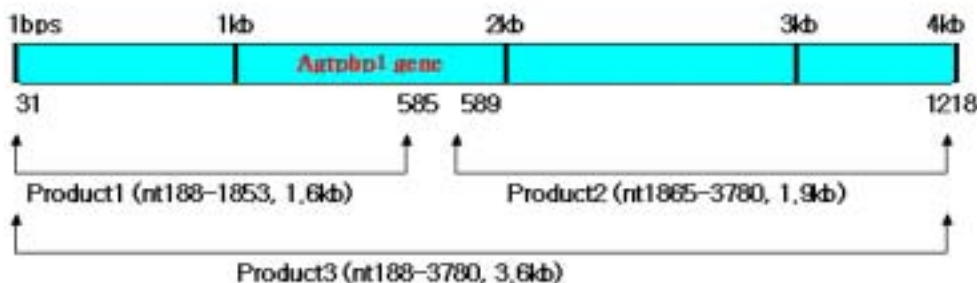


Figure 6. The strategy of Agtbp1 amplification by PCR. Three different pairs of primers were used for amplifying different region of Agtptp1. Numbers above and below the rectangle indicate the position of nucleotides and amino acids in Agtbp1 cDNA, respectively. nt = nucleotide.



Table 1. Primers used for amplifying *Agtbp1* gene

Primer name	Primer sequence(5'-3')	Amino acid position
NdeI 188	CATATG-AGAATTCATCCCATTCGC	31
Sall 1853	GTCGAC-TACAACACAGCTTCCCAAGA	585
NdeI 1865	CATATG-ACGGAAGATGACGAAGACAC	589
Sall 3780	GTCGAC-GGCAATTAACAAGATGG	1188

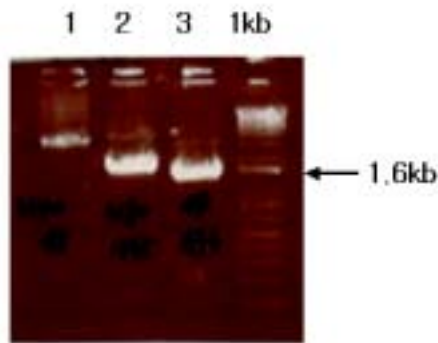


Figure 7. The image of an agarose gel showing PCR amplification of *Agtbp1* using three different pairs of primers according to *Agtbp1* gene sequence. In lane 1, primers NdeI188-SalI3780 were used. In lanes 2 and 3, primer pairs NdeI1865-SalI3780 and NeI188-SalI1853 were used, respectively. The PCR products were run on a 0.8% agarose gel. In lane 1, 2 and 3, the sizes of amplified products are 3.6kb, 1.9kb and 1.6kb, respectively. 1kb = 1kb size marker (Invitrogen)

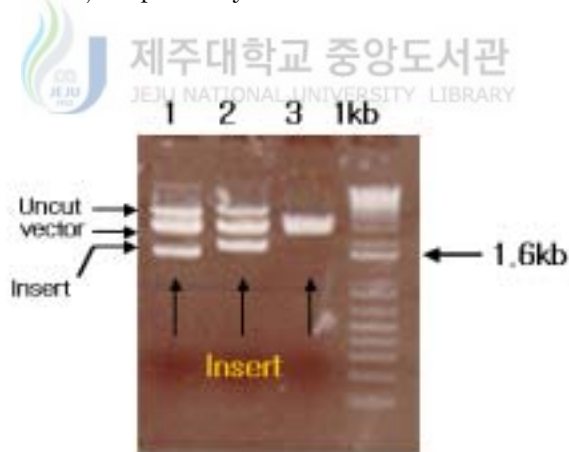


Figure 8. Restriction analysis of the pPCRscript-Amp SK(+)-*Agtbp1* plasmids containing three different inserts after double enzymatic digestion with NdeI and SalI. Lane 1 was the result of enzyme digestion of the plasmid containing the PCR product NdeI188-SalI1853, lane 2 for the PCR product NdeI1865-SalI3780 and lane 3 for the PCR product NdeI188-SalI3780, respectively. 1kb = 1kb size marker (Invitrogen)

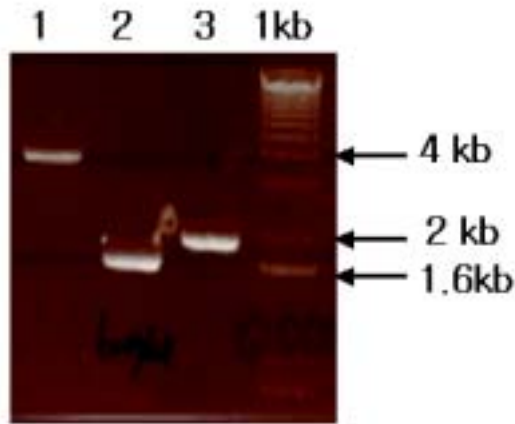


Figure 9. The result of gel purification of NdeI and SalI digested Agtpbp1 inserts from three different plasmids. Lane 1 shows the gel purified insert from the NdeI188- SalI3780 plasmid, lane 2 shows the result from the NdeI188-SalI1853 plasmid and lane 3 shows the result from the NdeI1865-SalI3780 plasmid. 1kb = 1kb size marker (Invitrogen)

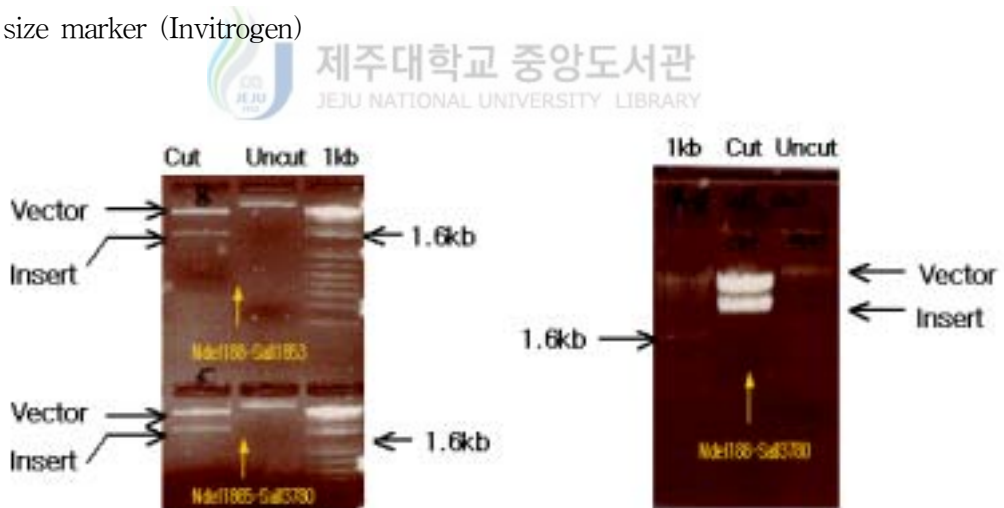
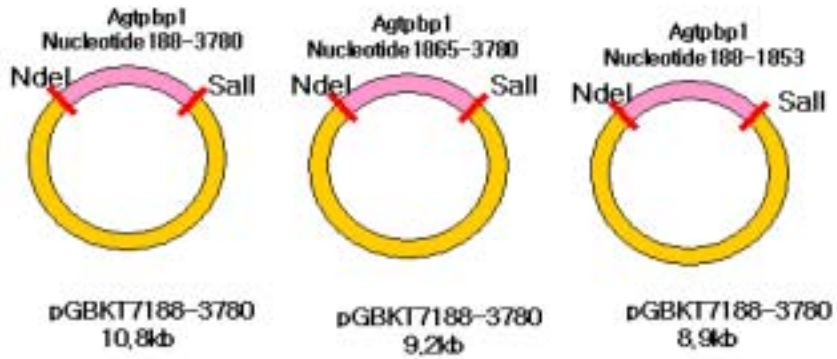


Figure 10. Enzyme Sall and NdeI digested purification two DNA ligated into pGBKT7. The size of vector are 7.3kb, In the above figure are NdeI188-SalI1853(1), NdeI1865-SalI3780(2) and NdeI188-SalI3780(3), and the size of digested inserts are 1.6kb(1), 1.9Kb(2) and 3.6Kb(3) respectively. 1kb = 1kb size marker(Invitrogen)

A.



B.

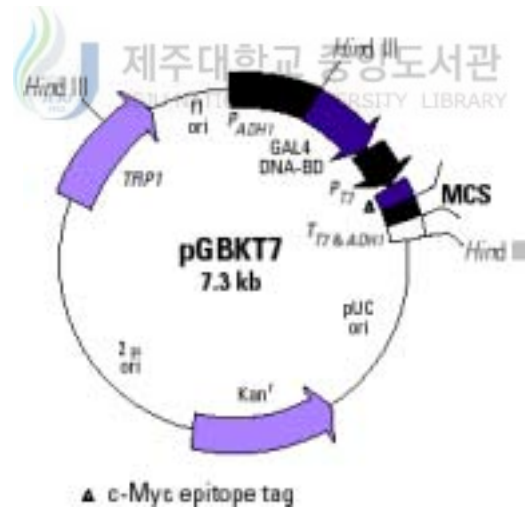


Figure 11. Structure of BD/ baits constructs and pGBKT7 vector. A. Agtbp1 fragment was inserted into NdeI and Sall sites. B. The pGBKT7 vector consisted of DNA-BD domain, T7 promoter and c-Myc epitope tag.

Reference

1. Addlynn Harris, James I. Morgan, Marcia Pecot, Amady Soumare, Anwar Osborne, and Holly D. Soares. 2000. Regenerating Motor Neurons Express Nna1, a Novel ATP/GTP -Binding protein Related to Zinc Carboxypeptidases., 2000., Molecular and Cellular Neuroscience, 16: 578-596.
2. Angeles Fernandez-Gonzalez, Albert R. La Spada, Jason Treadaway, Jason C. Higdon, Belinda S. Harris, Richard L. Sidman, James I. Morgan, Jian Zuo. 2002. Purkinje cell degeneration (pcd) phenotypes Caused by Mutations in the Axotomy - induced Gene, Nna1. Science, 295: 1904-1906.
3. Anton Yuryev and Lawrence P. Wennogle. 2003. Novel Raf kinase protein-protein interactions found by an exhaustive yeast two hybrid analysis. Genomics, 81: 112-125.
4. Brown SD, Nolan PM. 1998. Mouse mutagenesis -systematic studies of mammalian gene function. Hum Mol Genet, 10: 1627-33.
5. Balling R. 2001. ENU mutagenesis : analyzing gene function in mice. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2: 463-92.
6. Christian Bendixen, Serge Gangloff and Rodeny Rothstein. 1994. A yeast mating-selection scheme for detection of protein-protein interactions. Nucleic Acids Research, 22: 1778-1779.

7. Dan Goldwitz and Kristin Hamre. 1998. The cells and molecules that make a cerebellum. *TINS*, 21: 375-382.
8. Daniel B. Campbell, Ellen J. Hess. 1996, Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering(tg), Purkinje cell degeneration(pcd), and nervous(nr). *Molecular Brain Research*, 37: 79-84.
9. David A. Carter. 2004. Comprehensive strategies to study Neuronal function in transgenic Animal Models. *Biol Psychiatry*, 55: 758-788.
10. Deuschl G, Raethjen, Lindemann M, and Krack P. 2000. The Pathophysiology of tremor. *Muscle & Nerve*, 24: 716-735.
11. Delassalle A, Zalc B, Lachapelle F, Raoul M, Collier P, and Jacque C. 1981. Regional distribution of myelin basic protein in the central nervous system of quaking , jimpy, and normal mice during development and aging. *Neurosci Res*, 6: 303-313.
12. Doyle J, Rem X, Lennon G, Stubbs L, 1997. Mutation in the Cacn11a4 calcium channel gene are associated with seizures, cerebellar degeneration, and ataxia in tottering and leaner mutant mice. *Mamm. Genome*, 8: 113-120.
13. Eunju Seong, Audrey F. Seasholtz and Margit Burmeister. 2002. Mouse models for Psychiatric disorders. *TREND in Genetics*, 18: 643-650.
14. Ellen J. Hell and Daniel B.campbell. 1996. Chromosomal localization of the neurological mouse mutations tottering(tg), purkinje cell degeneration(pcd), and nervous(nr). *Molecular Brain Research*, 37: 79-84.

15. Eunju seong, Thomas L. Saunders, Colin L. Stewart and Margit Burmeister. 2004. Knockout in 129 or in C57BL/6: that is the question. *TRENDS in Genetics*, 20: 59-61.
16. Farrer M, Gwinn-hardy K, Hutton M, and Hardy J. 1999. The genetics of disorder with synuclein pathology and parkinsonism. *Human Mol Genet*, 8: 1901-1905.
17. Gunther Deuschl, MD, Jan Raethjen, MD, Michael Lindemann, MSc, and Paul Krack, MD. 2001. The Pathophysiology of tremor. *Muscle & Nerve*, 24: 716-735.
18. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, and Nave KA. 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *science*, 280: 1610-1613.
19. Gwinn - Hardy K. 2002. Genetics of parkinsonism. *Movement Disorder*, 17: 645-656.
20. Hagerman RJ, and Hagerman PJ. 2002. The fragile X permutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev*, 12:278-283.
21. Hirsch EC, Hoglinger G, Rousset E, Breidert T, Parain K, Feger J, Ruberg M, Prigent A, Cohen - Salmon C, and Launay JM. 2003. Animal models of parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *Neural Transm Suppl*, 65: 89-100.
22. Hadj-sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhayebouch명 N, Herrup K, and

- Mariani J. 2001. Progressive atrophy of cerebellar purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse(Rora (+/sg)). *Brain Res Dev Brain Res*, 126: 201-209.
23. Hrabe de angelis MH, Flaswinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Jung M, Reis A, Richter T, Alessandrini F, Jakob T, Fuschs E, Kolb H, Kremmer E, Schaeble K, Rollinski B, Roscher A, peters C, Meitinger T, Strom T, Steckler T, Holsboer F, Klopstock T, Gekeler F, Schindewolf C, Jung T, Avraham K, Behrendt H, Ring J, Zimmer A, Schughart K, Pfeffer K, Wolf E, and Balling R. 2000. Genome - wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet*, 25: 444-447.
24. Illarioshkin SN, Rakhmonov RA, Ivanova-smolenskaia IA, Brice A, Markova ED, Miklina NI, Kliushnikov SA, and Limborskaia SA, 2002. Molecular genetic analysis of essential tremor. *Genetika*, 38: 1704-1709.
25. Justyna R. Sarna, Richard Hawkes. 2003. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Progress in Neurobiology*, 70: 473-507.
26. Jankovic J. 2002. Essential tremor : A Heterogenous Disorder. *Movement Disorder*, 17: 638-644.
27. Ke Li, Lin Wang, Jun Cheng, Tin-Ying Lu, Ling-Xin Zhang, Jin-Song Mu, Yuan Hong, Yan Liu, Hui-Juan Duan, Gang Wang, Li Li Ju-Mei Chen. 2003. Interation between hepatitis C virus core protein and translin protein-a possible molecular mechanism for hepatocellular carcionma and lymphoma caused by hepatitis C virus. *World J Gastroenterol*, 2: 300-303.

28. Koeppe AH. 1998. The hereditary ataxias. *Neuropathol Exp Neurol*, 57: 531-543.
29. Kuramoto T, Nomoto T, Fujiwara A, Mizutani M, Sugimura T, and Ushijima T. 2002. Insertional mutation of the *Attractin* gene in the black tremor hamster. *Mamm Genome*, 13: 36-28.
30. Kuramoto T, Kitada K, Inui T, Sasaki Y, Ito K, Hase T, Kawaguchi S, Ogawa Y, Nakao K, Barsj GS, Nagao M, Ushijima T, and Serikawa T. 2001. *Attractin/mahogany / Zitter* plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc Nat Acad Sci USA*, 98: 559-564.
31. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS 2nd, Mori Y, Campbell KP, and Frankel WN. 1998. The mouse *stargazer* gene encodes a neuronal Ca^{2+} -channel γ subunit. *Nat Genet*, 19: 340-347.
32. Mary Ann Handel and Melissa Dawson. 1981. Effects on spermiogenesis in the mouse of a male sterile neurological mutation, *purkinje cell degeneration*, 4: 185-192.
33. Monica J. Justice, Janice K. Noveroske, John S. weber, Binhai Zheng and Allan Bradley. 1999. Mouse ENU Mutagenesis., *Human Molecular Genetics*, 8: 1955-1963.
34. Meisler MH, Kearney J, Escayg A, MacDonald BT, and Sprunger LK. 2001. Sodium channels and neurological disease: insights from *Scn8a* mutation in the mouse. *Neuroscientist*, 7: 136-145.

35. Munroe RJ, Bergstrom RA, Zheng QY, Libby B, Smith R, Jhon SW, Schimenti LJ, Browning VL, and Schimenti JC. 2000. Mouse mutations from chemically mutagenized embryonic stemcells. *Nat Genet*, 24: 318-321.
36. Nolan PM. 2000. Generation of mouse mutants as a tool for functional genomics. *Pharmacogenomics*, 3: 243-255.
37. Park C, Falls W, Finger J H, Longo - Guess C M, and Ackerman S L. 2002: Deletion in *catana2*, encoding aN-catenin , causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation. *Nat Genet*, 31: 279-284.
38. Patrick M, Nolan, Jo Peters, Mark Strivens, Derek Rogers, Jim Hagan, Nigel Spurr, Ian C, Gray, Lucie Vizor, Debra Brooker, Elaine Whitehill, Rebecca Washbourne, Tertius Hough, Simon Greenaway, Mazda Hewitt, Xinhong Liu, Stefan McCormack, Karen Pickford, Rachael Selley, Christine, Wells, Zuzanna Tymowska-Lalanne, Phil Roby, Peter Glenister, Claire Thornton, Caroline Thaug, Julie-Anne Stevenson, Ruth Arkell, Philomena Mburu, Rachel Hardisty, Amy Kiernan, Alexandra Erven, Karen P, Steel, Stephanie Voegeling, Jean-Louis Guenet, Carole Nickols, Ramin Sadri, Mahmood Naase, Adrian Isaacs, Kay Davies, Mick Browne, Elizabeth M.C.Fisher, Jo Martin, Sohaila Rastan, Steve D.M.Brown & Jackie Hunter. 2000. A systematic, genome- wide, phenotype-driven mutagenesis programme for gene function studies in the mouse. *Nature Genetics*, 25: 440-443.
39. Richard J. Mullen, Eva M. Eicher and Richard L. Sidman. 1976. Purkinje cell degeneration, a new neurological mutation in the mouse. *Genetics*, 79: 208-212.
40. Russell WL. Kelly EM. Hunsicker PR. Bangham JW, Maddux SC. Phipps EL.

1979. Specific - locus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse, 11: 5818-9.
41. Sarna JR, Hawkes R. 2003. Patterned Purkinje cell death in the cerebellum. *Prog Neurobiol*, 6: 473-507.
 42. Sterve D. M. Brown and Patrick M. Nolan. 1998. Mouse mutagenesis - systematic studies of mammalian gene function. *Human Molecular Genetics*, 7: 1627-1633.
 43. Stanley Fields & Ok-kyu song. 1989. Genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*, 340: 245-246.
 44. Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billings - gagliardi S, Sidman RL, and Shooter EM. 1992. Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature*, 356: 241-244.
 45. Soewarto D, Fella C, Teubner A, Rathkolb B, Pargent W, Heffner S, Marschall S, Wolf E, Balling R & Angelis MH. 2000. The large-scale munich ENU-mouse -mutagenesis screen. *Mamm. Genome*, 11: 507-510.
 46. Shimura H, Hattori N, Kubo, S, Mizyno Y, Asakawa H, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, and Suzuki T. 2000. Familial parkinson disease gene product, Parkin, is a ubiquitin - protein ligase. *Nat Genet*, 25: 302-305.
 47. Van der Weyden, Louise, David J. Adams, and Allan Bradley. 2002. Tools for targeted manipulation of the mouse genome. *Physiol genomics*, 11: 133-164.
 48. Wang Q, Bardgett ME, Wong M, Wozniak DF, Lou J, McNeil BD, Chen C,

- Nardi A, Reid DC, Yamada K, and Ornitz DM. 2002. Ataxia and paroxysmal dyskinesia in mice lacking axonally transported FGF4. *Neuron*, 35: 25-38.
49. Wells C & Brown SDM. 2000. Genomics meets genetics: towards a mutant map of the mouse, *Mamm. Genome*, 11: 472-477.
50. William L. Stanford, Jason B. Cohn & sabine P. cordes. 2001. Gene-Trap Mutagenesis: Past, Present and beyond. *Nature Reviews Genetics*, 2: 756-768.
51. Yong-Ping Cui, Jian-Bo Wang, Xin-Yu Zhang, Mei-Xia Bi, Li-Ping Guo, Shin-Hsin Lu. 2003. Using yeast two hybrid system to identify ECRG2 associated protein and their possible interactions with ECRG2 gene. *World J Gastroenterol*, 9: 1892-1896.
52. Zuo J, De Jager P.L, Takahashi K.A, Jiang W, Linden D.J, Heintz N. 1997. Neurodegeneration in lurcher mice caused by mutation in $\delta 2$ glutamate receptor gene. *Nature*, 388: 769-773.
53. 조규혁, 조재우, 박찬규, 한상섭, 송창우. 2002. ENU 투여 마우스에서 유래된 유전성 우성 진전 마우스의 기초연구. *한국실험동물학회지*, 18: 152-157.

감사의 글

이 과제는 과학 기술부 국책연구사업 분자의과학 연구에 의하여 수행되어 졌으며 연구비 지원에 감사드립니다. 그리고 본 연구를 위해 ENU 마우스를 제공하여주신 한국화학연구원의 송창우 박사님께 감사드립니다.

2년 반 동안의 대학원 생활이 외롭고, 힘들게 느껴지던 시간도 있었지만 항상 함께 해주는 이들이 옆에 있어서 즐겁게 생활 할 수 있었습니다. 오랜 시간을 함께 하며 많이 부족 했던 저에게 때론 격려로써, 때로는 따끔한 충고로써 내가 항상 옳은 길을 걸을 수 있도록, 연구를 하는 연구자로서의 면모를 갖출 수 있도록 본보기가 되어 주신 지도교수 박찬규 박사님께 감사드립니다. 그리고 바쁘신 중에도 논문 심사를 위해 시간을 내주신 김규일 교수님, 양영훈 교수님 감사드립니다. 항상 따뜻한 말로 격려를 해주시던 김중계 명예교수님, 이현중 교수님, 김문철 교수님 그리고 대학원 생활 동안 여러 가지로 배려를 해주셨던 정창조 명예교수님, 강태숙 교수님, 강민수 교수님께도 감사드립니다.

남은야! 민지야! 그동안 많이 고마웠다. 매번 나 때문에 늦게 까지 학교에 붙들어 두고 참 많이 귀찮게 했는데 부탁 할 일 생길 때마다 떠오르는 건 니들 밖에 없었어 미안해. 그리고 Vijay, Rui! 처음엔 너무 낯설고 신기했어도 외로웠던 대학원 생활에 같이 동고동락 할 수 있는 친구가 생겨서 기뻐. 내 인생에서 너희들과 함께할 이런 날이 또 올까 싶어서 지금 이순간이 너무 아쉽기만 해. 잊지 않을게. 그리고 늘 내가 미처 생각하지 못했던 부분까지 챙겨주던 현숙 언니, 발표 연습 때마다 기꺼이 경청해주고 격려 또한 잊지 않고 해준 원효 오빠, 발표 때 연락하지 않았다고 섭섭해 하던 진철 오빠, 창훈 오빠 정말 고마워요... 지연, 진현이, 유희, 현주 친구들아...고맙다 학생이라고 번번히 니들한테 맛있는 밥만 얻어먹고... 이젠 끝났어!! 이 밖에도 고마움을 일일이 표현 할 수는 없지만 태관 오빠, 지혜, 재범, 훈, 지훈, 상중에게도 고마움을 전하고 싶습니다.

마지막으로 언제나 든든한 지원군이 되어줬던 가족들... 대학원 생활하면서 부족한 내 모습을 자책 하노라면 오히려 나의 겸손함으로, 경솔하게 늘어 났던 나의 자랑을 부끄럽게도 내 노력의 결과라며 항상 착한 막내 동생으로만 나를 바라봐준 큰 언니 박마리아 수녀님과, 둘째 언니 박라르고 수녀님, 버스가 끊긴 늦은 시간에 날 데리러 피곤함을 무릎 쓰고 학교 까지 와준 미정언니, 윤호, 막내딸이 하는 건 무조건 믿어주시고 뒷바라지 해주시느라 고생만 하신 엄마, 아빠께 그간 일구어온 작은 결실인 이 논문으로 고마움을 대신 하고자 합니다.