

GOVP1200507870

M1-0108-00-0063

중추신경계의 운동기능조절에 대한 dopamine  
receptor D2와 GABA receptor A와의  
상호작용 및 신호전달 분석

Dopamine-GABA (A) receptor interactions in  
basal ganglia motor circuits

고려대학교 생명과학대학

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 중추신경계의 운동기능조절에 대한 dopamine receptor D2와 GABA receptor A와의 상호작용 및 신호전달 분석에 관한 연구과제의 보고서로 제출합니다.

2004. 07 . 29

주관연구기관명 : 고려대학교

주관연구책임자 : 백자현

연 구 원 : 조상래  
“ : 안연희  
“ : 배미현  
“ : 최승훈  
“ : 김용년  
“ : 김명환  
“ : 김성재  
“ : 박은아  
“ : 최규찬  
“ : 신승우  
“ : 조영문  
” : 한선애  
” : 강은영

보고서 초록

과제관리번호	M1-0108-00-0063	해당단계 연구기간	2001.08.01-2004.05. 31	단계 구분	(2단계) / (3단계)
연구사업명	중 사업명	중점국가연구개발사업			
	세부사업명	뇌신경생물학 연구사업			
연구과제명	중 과제명	중과제가 있을 경우에는 기재 (단위과제일 경우에는 아래 기재)			
	세부(단위)과제명	중추신경계의 운동기능조절에 대한 dopamine receptor D2와 GABA receptor A와의 상호작용 및 신호전달 분석			
연구책임자	백자현	해당단계 참여연구원수	총 : 25 명 내부 : 2 명 외부 : 23 명	해당단계 연구비	정부: 136,000 천원 기업: 천원 계: 136,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	고려대학교 생명과학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	47
<p>본 연구에서는 wild-type과 dopamine D2 receptor knockout homozygote쥐, 두 군에 대해 GABA A receptor agonist, antagonist인 muscimol, bicuculline 또한 GABA B receptor agonist, antagonist인 baclofen, saclofen등을 주입, 투여한 후 open field test로 locomotor activity를 측정 한 결과, D2 receptor knockout mice에서는 GABA A receptor agonist에 의해 운동기능의 증가 및 seizure-like한 behavior를 관찰 할 수 있었으며, D2 receptor의 결여가 basal ganglia circuit의 motor signaling에 큰 영향을 초래한다는 것을 성공적으로 보여주었고 또한 dopamine-GABA A interaction이 basal ganglia의 motor circuit에 중요한 signaling을 한다는 것을 보여주었다고 할 수 있다. 또한 실제로 basal ganglia의 motor circuit에 관여하는 다른 단백질들, enkephalin, substance P, dynorphin, tyrosine hydroxylase, GAD등의 발현, 또한 immediate early gene인 Nur/77, Zif 268등의 발현이 이 GABA A receptor drug 및 운동기능조절에 따른 효과와 연관성을 가지며 조절되는 것을 관찰하였으며, 이 motor circuit의 조절에 이런 단백질들의 발현을 조절하는 중요한 유전자들의 발현에 대해 differential cloning으로 연구를 수행하였으며 그외에도 striatum의 STEP에 대해 자세히 연구하였다. 한편 D2R-/- mice에서의 GABA A receptor agonist에 의해 일어나는 Seizure activity에 대해서도 그 속성을 규명하였다. 이런 일련의 연구는 중추 신경계의 운동기능조절의 중심부분인 basal ganglia에서의 motor circuit에 대한 분자생물학적인 기전 규명에 큰 영향을 줄 수 있다고 생각한다.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	도파민, 수용체, 운동기능, 유전자, GABA			
	영어	dopamine, receptor, locomotor activity, gene, GABA			

## 요 약 문

### I. 제 목

중추신경계의 운동기능조절에 대한 dopamine receptor D2와 GABA receptor A와의 상호작용 및 신호전달 분석

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

운동기능조절에서의 Dopamine receptor와 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자 동정 및 상호작용 분석- basal ganglia에서의 운동기능 조절 target gene 도출

1. Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자동정,
2. 운동 기능 조절 관련 basal ganglia-specific target gene 동정 및 조절기전 분석
3. D2 receptor null mice에서의 GABA receptor A agonist에 의한 seizure-like behavior의 조절 기전 분석

### III. 연구개발의 내용 및 범위

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	운동기능조절에서의 Dopamine receptor와 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자 동정 및 분석 - 1. 이미 검증을 거친 5종의 candidate gene 발현 조절 면밀 분석 2. muscimol에 의한 expression profiling	1. methyl CpG-binding protein, striatum-specific protein tyrosine phosphatase (STEP) 및 MAPK, NGFI-A (zif 268), NGFI-B (nur77)등 이미 검증을 거친 5종의 candidate gene 발현 조절 면밀 분석 (50%) 2. muscimol에 의한 expression profiling (50%)
2차년도 (2002)	1. Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자동정, 조절기전 분석 2. 운동 기능 조절 관련 basal ganglia-specific target gene 동정 및 조절기전 분석 3. D2 receptor null mice에서의 GABA A receptor agonist에 의한 seizure-like behavior의 조절 기전 분석	1. Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자동정-muscimol에 의한 expression profiling 결과에 대한 분석으로 target gene identification. 2. 동정된 유전자에 대한 관련 기능분석 3. muscimol의 높은 농도에 의해 D2R-/- mice에서 seizure-like behavior의 분석 -seizure typing 및 기전 분석
3차년도 (2003)	뇌의 basal ganglia에서의 GABA A receptor A agonist, antagonist의 microinjection을 통한 D2R-GABA A receptor 상호작용부위규명을 통한 운동 기능 조절 및 관련 유전자 조절 분석	-WT, D2R-/- mice의 basal ganglia에서의 GABA A receptor agonist microinjection을 통한 운동기능 분석 -D2-GABA A receptor의 상호작용부위 규명 -관련부위에서 특이적으로 조절되는 유전자 분석

### IV. 연구개발결과

본 연구에서는 wild-type과 dopamine D2 receptor knockout homozygote 쥐, 두 군에 대해 GABA A receptor agonist, antagonist인 muscimol, bicuculline 또한 GABA B receptor agonist, antagonist인 baclofen, saclofen등

을 주입, 투여한 후 open field test로 locomotor activity를 측정한 결과, D2 receptor knockout mice에서는 GABA A receptor agonist에 의해 운동기능의 증가 및 seizure-like한 behavior를 관찰 할 수 있었으며, D2 receptor의 결여가 basal ganglia circuit의 motor signaling에 큰 영향을 초래한다는 것을 성공적으로 보여주었고 또한 dopamine-GABA A interaction이 basal ganglia의 motor circuit에 중요한 signaling을 한다는 것을 보여주었다고 할 수 있다. 또한 실제로 basal ganglia의 motor circuit에 관여하는 다른 단백질들, enkephalin, substance P, dynorphin, tyrosine hydroxylase, GAD등의 발현, 또한 immediate early gene인 Nur/77, Zif 268등의 발현이 이 GABA A receptor drug 및 운동기능조절에 따른 효과와 연관성을 가지며 조절되는 것을 관찰하였으며, 이 motor circuit의 조절에 이런 단백질들의 발현을 조절하는 중요한 유전자들의 발현에 대해 differential cloning으로 연구를 수행하였으며 그외에도 striatum의 STEP에 대해 자세히 연구하였다. 한편 D2R<sup>-/-</sup> mice에서의 GABA A receptor agonist에 의해 일어나는 Seizure activity에 대해서도 그 속성을 규명하였다. 이런 일련의 연구는 중추 신경계의 운동기능조절의 중심부분인 basal ganglia에서의 motor circuit에 대한 분자생물학적인 기전 규명에 큰 영향을 줄 수 있다고 생각한다

## V. 연구개발결과의 활용계획

WT과 D2R<sup>-/-</sup> mice를 사용하여 dopamineD2 receptor-GABA A receptor상호작용과을 면밀히 분석한 그 결과 GABA A receptor를 활성화 시킴으로서 운동기능이 현저히 줄은 D2R<sup>-/-</sup> mice의 운동기능을 증가시키고 한편 excessive한 GABA A receptor의 활성화 경우 오히려 seizure activity를 유발하는 것으로 추정할 수 있는 중요한 결과를 얻었다. 또한 관련유전자 pool 및 STEP의 striatum에서의 D2receptor에 의한 특이적인 조절등 관련 단백질에 대한 많은 정보를 얻을 수 있었다. 특히 최근에 basal gaglia의 특정 부분에 GABA 합성 효소인 GAD를 gene transfer하여 파킨슨증후군의 증상을 호전시키거나 (2002. Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. Science 298, 425-429) 혹은 파킨슨 증후군 환자에 muscimol을 주입하여 운동기능의 호전을 보는 등의 (2001. Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. Brain 124, 2105-2118) 본연구팀의 결과를 뒷받침하는 보고들이 발표되고 있어 매우 고무적이며 이것은 dopaminergic pathway가 손상된 운동기능조절 이상질환에 GABAergic A type drug으로 일종의 회복을 기도할 수 있다는 가능성을 시사하는 중요한 결과이다.

## S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

The absence of dopamine D2 receptors (D2R) in animals leads to akinetic and bradykinetic behavior. The levels of GAD (glutamic acid decarboxylase), which is involved in GABA synthesis, were strongly increased in the cortex and the striatum in these animals. In this study, the effects of different GABAergic drugs on locomotor activity was analyzed in mice lacking dopamine D2R (D2R  $-/-$ ) to examine GABAergic regulation in movement control and its interaction with dopaminergic neurotransmission. After administering muscimol (1mg/kg), a GABAA receptor agonist, the D2R  $-/-$  mice showed increased locomotor activity up to 200 %. When the muscimol dose was increased (4-6mg/kg), the D2R  $-/-$  mice exhibited seizure-like behavior when compared to the muscimol-treated wild-type (WT) mice, which were cataleptic. The EEG recordings showed a high amplitude rhythmic epileptiform activity during the seizure-like behavior period in the D2R  $-/-$  mice. There were no significant differences in the locomotor activity profile between the D2R  $-/-$  mice and WT after administering either a GABAA receptor antagonist, or a GABAB receptor agonist and antagonist. *In situ* hybridization showed that after injecting muscimol in the D2R  $-/-$  mice, the expression of enkephalin and immediate early gene, NGFI-A, was closely regulated with the locomotor activity regulated by GABAergic stimulation. These results suggest that the absence of D2R alters the GABAergic neurotransmission, specifically on GABAA-receptor mediated signaling, and stimulating the GABAA receptor can reverse the dysfunction of GABAergic inhibition in the motor circuits in the basal ganglia.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

1. Introduction
2. State-of-the-Art
3. Results
4. Extent of proposed research performance and contribution
5. Significance and application
6. Recent trends in foreign countries
7. References



목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 7 장 참고문헌

## 본 문

### 제 1 장 연구개발과제의 개요

#### 가. 연구개발의 과학기술, 사회경제적 중요성

##### ○ 기술적 측면

Dopamine은 중추 신경계에 가장 많이 존재하고 있는 catecholamine의 하나로 여러가지 뇌의 질병에 관여되고 있다. 특히 파킨슨 증후군(Parkinson's disease)이나 정신 분열증(schizophrenia), 혹은 Huntington's disease 등의 질병은 dopamine의 전달 시스템에 결손이 있는 것으로 알려져 있다. Dopamine은 뇌의 substantia Nigra (SN)와 Ventral tegmental area(VTA)에 존재하는 mesencephalic neuron에 의해 합성된다. 이 SN과 VTA부분은 뇌에서 운동기능에 관여하는 basal ganglia라는 복잡한 network을 이루고 있는 요소 중의 하나인데, dopaminergic neuron들은 이곳으로부터 striatum, cortex, limbic system, hypothalamus등으로 전사된다. 이런 경로를 통해 dopamine은 운동기능이나 그 조절, 또한 호르몬의 분비 조절등 여러가지 생리적 기능에 관여하는 것이다. 이들 경로를 크게 세 가지로 나눌 수 있는데 첫번째는 nigro-striatal pathway로, substantia nigra로부터 striatum에 전사되는 경로인데 움직임의 조절과 지각운동 (sensorimotor)의 조절등에 관여하며 이 경로의 장애는 곧 파킨슨 증후군의 중요한 요소가 된다. 파킨슨 증후군의 특징은 원하는 운동기능을 착수, 실행할 수 없는 akinesia (부동증), bradykinesia(운동완서)와 resting tremor(진전)등의 증상을 보이는 것으로 알려져 있다. 두번째 dopamine의 전달경로는 mesolimbic-mesocortical pathway로 사고와 감정의 구체화, 조직화등에 관여하며 세번째 경로는 tuberoinfundibular pathway로, 뇌하수체 호르몬의 합성 및 분비 조절에 관여한다. 이런 dopamine의 기능은 membrane receptor인 dopamine receptor와 결합, 작용하여 이루어지게 되는데 이 dopamine receptor들은 seven transmembrane domaine receptor류에 속하며 이들은 G-proteins(GTP-binding-proteins)과 결합작용하여 second messenger를 활성화시키거나 특정한 신호 전달체계를 활성화, 또는 억제시키며 생리적 반응에 이르는 것으로 알려져 있다.

현재까지 알려진 dopamine receptor로는 5개의 subtype이 있는데, 이들은 다시 그들의 구조와 약리화학적 성질에 의해서 크게 두 그룹으로 나눌 수 있다. 먼저 D1-like

receptor그룹을 들 수 있는데 D1과 D5가 여기에 속하고 이들 그룹은 adenylate cyclase를 활성화하여 세포내의 cAMP 형성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다. 이에 반해 D2-like receptor그룹은 D2 receptor 및 D3, D4 등을 포함 하는데, D1과는 반대로 cAMP 형성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 근래에 들어서는 다른 신호전달 체계가 D2 receptor에 의해 조절 됨도 밝혀지고 있다. 이 receptor들이 뇌에서 발현되는 정도와 부분을 살펴보면 D1과 D2 receptor가 가장 우세하게 발현되면서 그 발현되는 부위도 서로 중복되는 곳이 적지 않음을 볼 수 있다. 아직까지 각각의 dopamine receptor subtype들이 실제적으로 어떤 특정한 기능을 가지고 있는지, 그 조절기작이나 혹은 receptor들 간의 상호작용에 관해서는 잘 알려져 있지 않다.

이런 맥락에서, D2 receptor knockout mice의 이용은 매우 여러 가지 장점을 가지고 있는데, D2 receptor가 결여된 쥐들의 가장 두드러진 특징이라고 할 수 있는 것은 그들의 운동기능의 장애였다. 이들 쥐들은 매우 느리고 뒷걸음질도 비정상적이었으며, 특히 수평한 바닥에 걷도록 내버려 두었을 때, 이 특징은 두드러졌다. 이들 D2 receptor가 결여된 쥐들은 결과적으로, dopamine antagonist들을 처리한 쥐들에서 나타나는 성질들과 매우 유사성을 보여서 dopamine의 실제 생리적 기능에 있어서 D2 receptor가 본질적인 기능을 하고 있다는 것을 보여주었다.

특히 이 들에게 나타난 특징으로는 뇌의 basal ganglia에 전체적으로 분포하는 또 다른 신경전달 물질인 GABA를 합성하는 효소인 GAD가 매우 증가했다는 점이다. 이것은 basal ganglia에서의 운동조절 circuit에 대한 균형이 깨짐으로써, 이것을 보상하려는 데서 나온 결과가 아닌가 가정할 수 있다. 실제적으로 dopamine과 GABA의 상호작용이 basal ganglia에서의 운동기능 조절에 매우 중요하다는 보고는 지금까지 많이 되어왔다. 그러나, basal ganglia에서의 motor circuit에 대한 세포, 분자생물학적인 고찰은 전혀 개척이 되지 않은 부분이라 해도 과언이 아니라고 할 수 있다.

본 연구팀은 제 1단계 뇌과학 연구사업의 수행과제로 운동기능조절 능력이 현저히 줄어든 dopamine D2 receptor knockout mice에 GABAergic drug으로 자극시켜 운동기능이 어떻게 조절되는지를 분석하고 이런 조절에서의 유전자 발현조절을 분석해왔다. 본 연구팀이 이미 수행한 연구결과에 따르면 Dopaminergic-GABAergic interaction이 motor circuit에서 중요한 상호작용을 하고 있으며 이것이 GABA A-receptor를 통해 이루어진다는 중요한 결론을 얻었으며, 결국 이것은 dopaminergic pathway가 손상된 운동기능조절 이상질환에 GABAergic A type drug으로 일종의 회복을 기도할 수 있다는 가능성을

시사하는 중요한 결과이다. 또한 enkephalin, dynorphin, substance P, tyrosine hydroxylase, GAD 등의 분석은 basal ganglia에서의 striatonigral pathway, striatopallidal pathway 간의 balance 및 interaction이 D2 receptor와 GABA등을 통하여, 어떻게 조절되는지를 이해하는데에 중요한 실마리를 제공해 주었다고 할 수 있다. 또한 striatum에 많이 발현되는 immediate early gene인 NGFI-A (EGR-1, zif/268, Krox-24) 과 NGFI-B (nur77)등의 발현조절과 긴밀한 관련이 있다는 것을 밝혀내었다(manuscript in preparation). 이것은 basal ganglia에서의 운동기능조절이 dopamine에 의해, 특히 dopamine receptor D2를 통해 우세하게 이루어진다는 것을 증명하고 striatum의 여러 단백질들이 운동기능 조절을 위한 circuit을 이루며 D2 receptor와 긴밀한 상호작용을 한다고 볼 수 있다.

따라서 본 과제에서는 선행 결과를 이용, Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자를 뇌의 basal ganglia에 특이적으로 과 발현하여, 운동기능조절을 분석하고 D2 receptor knockout mice와 비교분석하고자 하였다. 이러한 신경전달물질인 도파민과 그 수용체, 관련 단백질을 통한 뇌의 basal ganglia에서의 운동기능 장애에 대한 분자생물학적 접근의 연구를 통하여 나온 결과는 운동기능 조절에 있어서의 분자생물학적 기전확립에 큰 영향을 미칠 것이며, 이를 통해 최종적으로는 파킨슨병과 같은 뇌의 운동조절 기능 이상에 대한 관련 질환에 대한 진단 및 치료법개발에 중요한 단서를 제공할 수 있으리라 본다.

#### ○ 경제·산업적 측면

경제발전 및 의학 수준의 발전으로 많은 질병들의 원인이 규명되고 있으나 뇌연구는 아직도 그 복잡성 때문에 진전이 느린 편이라고 할 수 있다. 따라서 이런 분자생물학적으로 만들어진 형질전환 쥐를 이용한, 생화학적, 분자생물학적 연구는 뇌 기능 연구에 중요한 단서를 제공할 수 있으리라 본다. 특히 뇌의 여러부분중에서도 운동기능조절에 중요하다고 알려져있는 “Basal ganglia” 부분의 dopamine- GABA의 상호작용 연구를 통하여 여러 신경질환, Parkinson’s disease, Huntington’s Corea”등의 가장 중요한 병리현상인 운동기능 이상질환의 병리를 밝히는 데 도움이 될것이며, 지금까지 정확히 알려져 있지 않은 이 조절기능의 기전을 밝히는데도 기여를 할 것으로 보며, 나아가 이 관련 질환치료에 대한 기술개발에 기여할수 있을 것이다.

○ 사회·문화적 측면

현재 뇌의 운동조절기능 연구에 관해서는 아직도 그 연구내용이 미미한 편이고 Parkinson's disease같은 질환의 경우 치료방법은 L-Dopa주입이나 혹은 fetal cell transplantation에 의존하고 있다. 그러나 두가지 방법 다 완전하지 못하고 side effect도 크며, 특히 후자의 경우는 material의 공급자체에도 문제가 있으며 기술적으로도 어려운 것으로 알려져 있다. 뇌의 운동조절기능 기전에 대한 연구는 기본적인 뇌기능의 이해를 돕는데 뿐만 아니라 이런 질병 치료기법의 발전 및 나아가 우리 뇌연구 기술우위의 확보에도 도움을 주리라 본다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

본 연구팀은 운동기능조절 능력이 현저히 줄어든 dopamine D2 receptor knockout mice에 GABAergic drug으로 자극시켜 운동기능이 어떻게 조절되는지를 분석하고 이런 조절에서의 유전자 발현조절을 분석해왔다. 본 연구팀이 이미 수행한 연구결과에 따르면 Dopaminergic-GABAergic interaction이 motor circuit에서 중요한 상호작용을 하고 있으며 이것이 GABA A-receptor를 통해 이루어진다는 중요한 결론을 얻었으며, 결국 이것은 dopaminergic pathway가 손상된 운동기능조절 이상질환에 GABAergic A type drug으로 일종의 회복을 기도할 수 있다는 가능성을 시사하는 중요한 결과이다. 또한 enkephalin, dynorphin, substance P, tyrosine hydroxylase, GAD 등의 분석은 basal ganglia에서의 striatonigral pathway, striatopallidal pathway 간의 balance 및 interaction이 D2 receptor와 GABA등을 통하여, 어떻게 조절되는지를 이해하는데에 중요한 실마리를 제공해 주었다고 할 수 있다. 또한 striatum에 많이 발현되는 immediate early gene인 NGFI-A (EGR-1, zif/268, Krox-24) 과 NGFI-B (nur77)등의 발현조절과 긴밀한 관련이 있다는 것을 밝혀내었다(manuscript submitted). 이것은 basal ganglia에서의 운동기능조절이 dopamine에 의해, 특히 dopamine receptor D2를 통해 우세하게 이루어진다는 것을 증명하고 striatum의 여러 단백질들이 운동기능 조절을 위한 circuit을 이루며 D2 receptor와 긴밀한 상호작용을 한다고 볼 수 있다.

따라서 본 과제에서는 선행 결과를 이용, Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고 있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자를 동정하고 이 유전자를 뇌의 basal ganglia에 특이적으로 과 발현하여, 운동기능조절을 분석하고 D2 receptor knockout mice와 비교분석하고자 한다. 1차년도에서 이미 관련 gene들에 대한 발현 조절 분석을 하였으며, 2차년도에서는 D2 receptor null mice의 운동기능을 향상시키는 muscimol에 의한 differential cloning을 수행하고 분석하였으며, 1차년도에 연구하였던 candidate gene들중 striatum에 발현되며 dopamine receptor에 의해 특이적으로 조절되는 STEP에 대한 연구를 더 진행하였다. 한편, muscimol의 높은 농도에 의해 D2R-/- mice에서 seizure-like behavior가 유발되는 것에 대한 기전도 Dopamine-GABA의 상호작용이 운동기능에 미치는 영향으로서 본 연구에서 EEG recording을 통해 seizure의 범주에 속하는 속성으로 분석을 할 수 있었다. 이러한 일련의 결과를 분석 해볼 때 정상적인 basal ganglia의 motor circuit (Fig.1A)에서

D2R<sup>-/-</sup> mice (Fig.1B)에서는 D2 receptor가 결여됨으로서 striatum에서 Globus pallidus 에 이르는 GABAergic interneuron의 inhibition의 변화를 일으켜 subthalamic nucleus(STN)의 overactivity를 유발하여 운동기능의 이상이 온다고 추정할 수 있으며 이때 GABA A receptor를 활성화 시킴으로서 이러한 STN의 overactivity를 줄이고 정상적인 운동 기능을 가져올 수 있지만 excessive한 GABA A receptor의 활성화 경우 오히려 seizure activity를 유발하는 것으로 추정할 수 있다 (Fig.9 B). 특히 최근에 STN 부분에 GABA 합성 효소인 GAD를 gene transfer하여 파킨슨증후군의 증상을 호전시키거나 (2002. Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. Science 298, 425-429) 혹은 파킨슨 증후군 환자에 muscimol을 주입하여 운동기능의 호전을 보는 등의 (2001. Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. Brain 124, 2105-2118) 본연구팀의 결과를 뒷받침하는 보고들이 발표되고 있어 매우 고무적이다. 따라서 3차년도에서는 이러한 결과를 배경으로 GABA A receptor agonist, antagonist를 basal ganglia에 microinjection하여 실제로 어떠한 GABAergic neuron이 D2R<sup>-/-</sup> mice에서 영향을 받고 운동기능이 호전 되는지를 분석하고 실제 운동기능에 관계되는 유전자를 분석하고자 하였다. 원래는 striatum에서 운동기능관련 유전자를 과 발현하는 transgenic mice를 제작하기 위한 준비를 수행하려 하였으나, 지금까지의 연구결과를 통해 basal ganglia의 여러 부위에 GABAergic drug을 microinjection하는 것이 지금까지 얻은 결과에 대한 타당성을 입증하고 실제 관련 동물 모델을 만들 수 있는 확실한 정보를 주리라 생각되어 이런 중요성에서 basal ganglia에서의 D2R과 GABA A receptor의 상호작용부위를 규명하려 하였다. 실제로 basal ganglia에서의 이러한 신경전달물질인 도파민과 그 수용체, 관련 단백질을 통한 뇌의 basal ganglia에서의 운동기능 장애에 대한 분자생물학적 접근의 연구를 통하여 나온 결과는 운동기능 조절에 있어서의 분자생물학적 기전확립에 큰 영향을 미칠 것이며, 이를 통해 최종적으로는 파킨슨병과 같은 뇌의 운동조절 기능 이상에 대한 관련 질환에 대한 진단 및 치료법개발에 중요한 단서를 제공할 수 있으리라 본다.

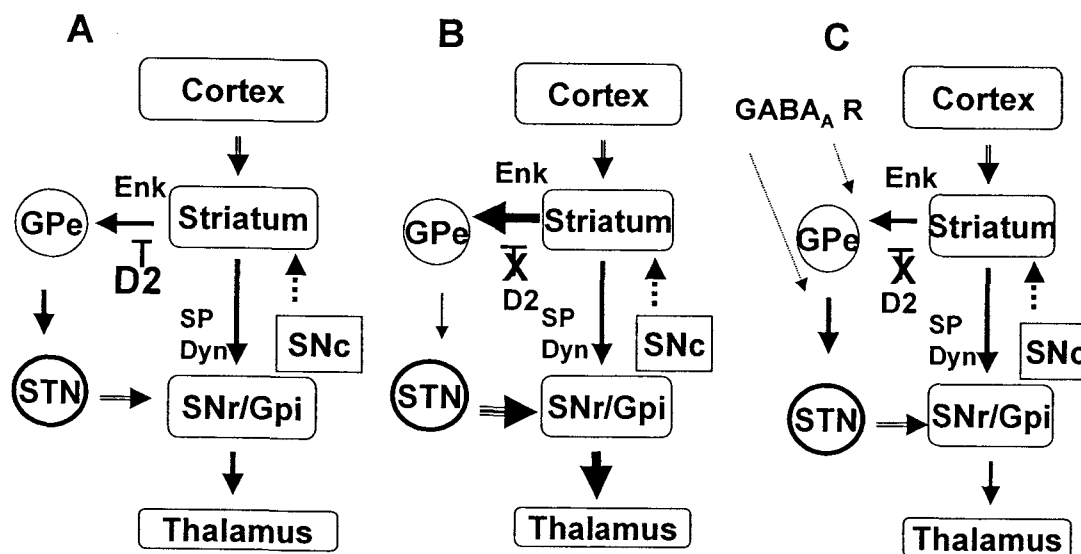


Fig. 1. The normal (A), in the D2R<sup>-/-</sup> mice (B) and the stimulation of GABA<sub>A</sub> receptor in D2R<sup>-/-</sup> mice (C) are presented. The thickness of the arrows reflects the activity of pathways. Inhibitory GABAergic projections are indicated by solid arrows, excitatory glutamatergic projections by lined arrows and the dopamine projection by the dotted arrows. Dopamine is thought to inhibit neuronal activity in the indirect pathway via D2 receptors and to excite neurons in the direct pathway via D1 receptors. In D2R<sup>-/-</sup> mice, the absence of D2R lead to increased inhibition of the GPe, resulting overactivity of STN neurons (B). Stimulation of GABA<sub>A</sub> receptors may be able to relieve the overactivity of STN and could rebalance the final output on the thalamus (C). However, an excessive stimulation of GABA<sub>A</sub> receptor could reduce the inhibitory effect on the thalamus, which can increase its excitatory to the motor cortex. GPi, Globus pallidus pars interna; GPe, globus pallidus pars externa; STN, subthalamic nucleus; SNC, substantia nigra pars compacta; SNR, substantia nigra pars reticulata.



### 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

#### I. Dopamine D2 receptor knockout mice에의 GABA receptor agonist, antagonist의 처리후 운동기능에 대한 행동분석 및 유전자 발현 조절 분석

.1) Dopamine D2 receptor knockout mice에의 GABA receptor agonist, antagonist의 처리후 운동기능에 대한 행동분석:

wild-type (WT)과 dopamine D2 receptor knockout homozygote쥐 (D2R<sup>-/-</sup>), 두 군에 대해 GABA A receptor agonist, antagonist인 muscimol, bicuculline 또한 GABA B receptor agonist, antagonist인 baclofen, saclofen를 intraperitoneal injection으로 주입, 투여한 후 open field test 로 locomotor activity를 측정하였다. D2R<sup>-/-</sup> mice에서는 흥미롭게도 GABA receptor A의 agonist인 muscimol에 의해 200% 운동 기능이 증가 하는 흥미로운 결과를 보였다.(Figure 2, A, C) GABA receptor A agonist인 muscimol (4mg/kg)은 높은 농도에서는 seizure-like behavior를 보였으며, GABA receptor A antagonist 인 bicuculline을 비롯하여 (Figure 2, B, C), GABA receptor B 의 agonist, antagonist는 WT에 비하여, 별 다른 차이를 안보였다 (Figure 3).

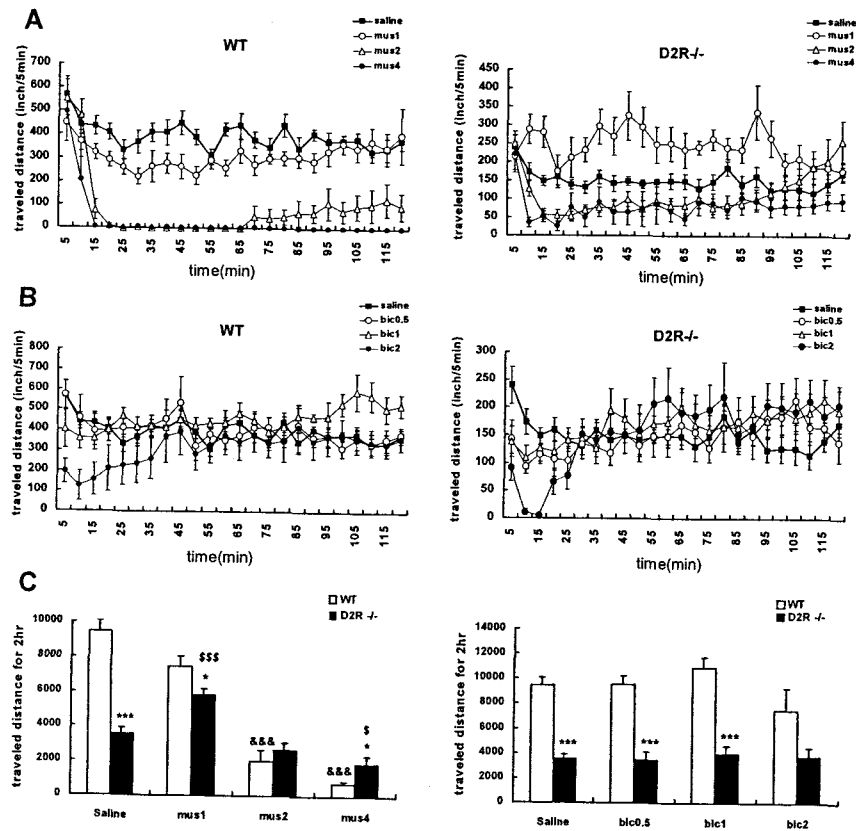


Figure 2. 정상 쥐 (WT)와 D2 receptor knockout mice (D2R-/-)에서의 GABA A receptor의 agonist antagonist인 muscimol, bicuculline 주입 후 locomotor activity

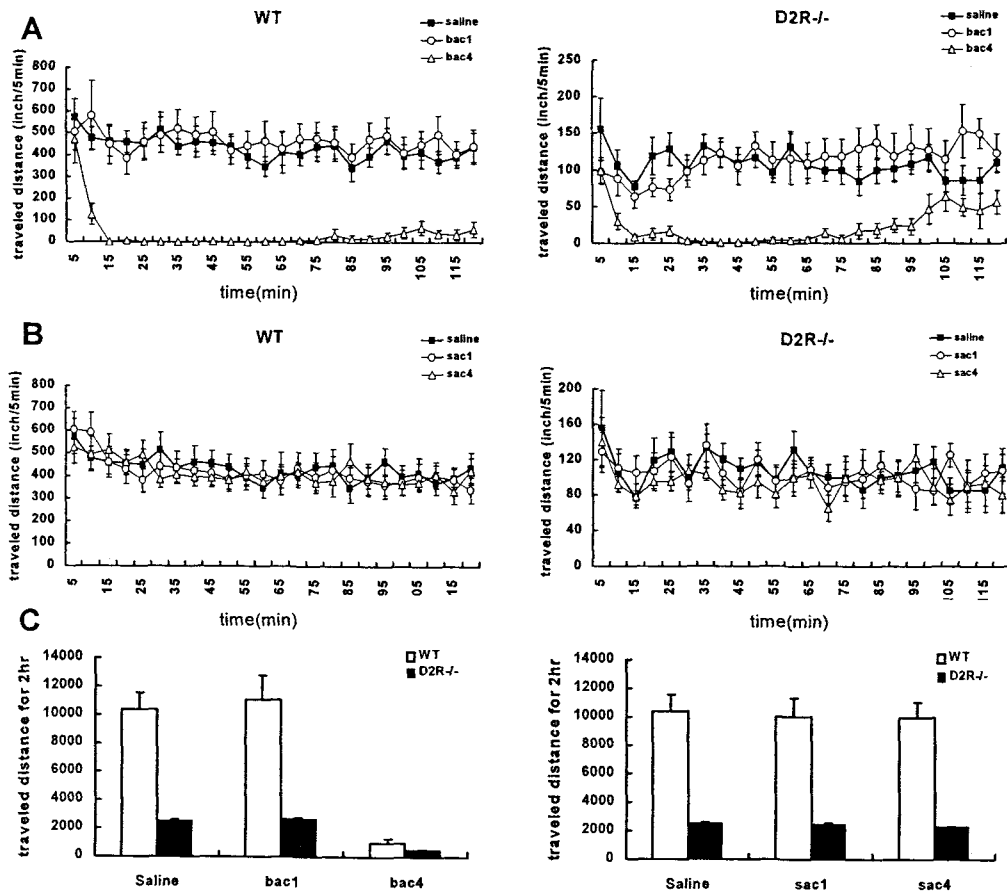


Figure 3. 정상 쥐 (WT)와 D2 receptor knockout mice (D2R-/-)에서의 GABA B receptor의 agonist, antagonist인 baclofen, saclofen 주입 후 locomotor activity

## 2) GABA receptor A agonist, [3H]muscimol에 의한 in situ autoradiography :

따라서 GABA receptor A에 대한 signaling의 변화가 이 들 쥐에서 있으리라 추정하고 GABA receptor A에 대한 in situ binding assay를 수행하였다. [3H]muscimol에 의한 in situ binding 결과, WT과, D2R-/- mice의 striatum과 cortex에서 모두 같은 정도의 binding signal을 보였다 (Fig.4). 결국 GABA receptor A의 기능자체의 변화는 없고, D2 receptor와 GABA receptor A 간의 상호작용의 차이가 정상쥐와 D2 receptor knockout mice에서 차이가 나는 것으로 생각되었다.

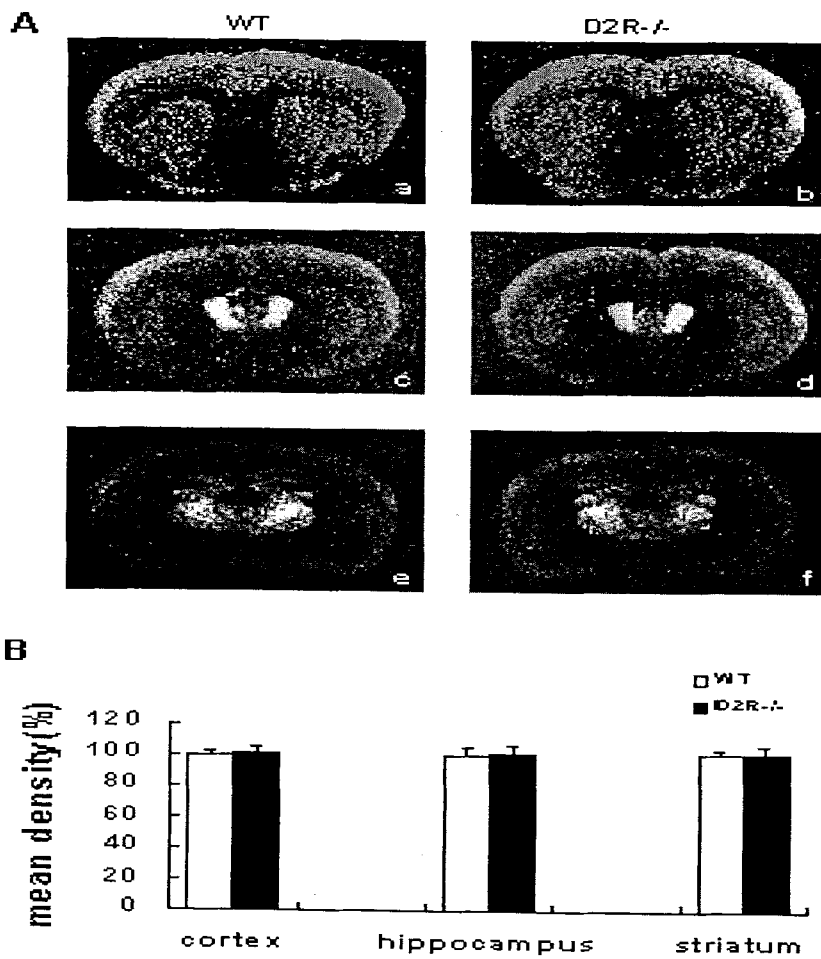


Fig.4. [3H]muscimol에 의한 WT, D2R-/- mice에서의 In situ binding autoradiography

3) GABA receptor A agonist, antagonist의 주입 후 basal ganglia에 발현 되는 다른 단백질들의 발현조절:

3)-1. Enkephalin 과 Substance P

운동기능조절의 변화를 보인 GABA receptor A agonist muscimol을 주입한 후 wild-type과

D2 receptor knockout mice에서 뇌를 절편하여 여러가지 관련 유전자들에 대한 In situ hybridization을 수행하였다. 그 결과, enkephalin은 D2R<sup>-/-</sup> mice에서는 WT에 비해 강한 증가를 보이는데, muscimol 주입 후 감소하는 경향을 보였다 (Fig.5). 또한 striato nigral pathway에서 발현되는 substance P의 경우는 정상적인 쥐에서는 감소하지만 D2R<sup>-/-</sup> mice에서는 그다지 큰 변화를 보이지 않아 아마도 이 조절에 있어서 Substance P의 경우는 D2-GABAA 간의 상호작용에 큰 역할을 하지 않는 것으로 추정되었다. (Fig. 6)

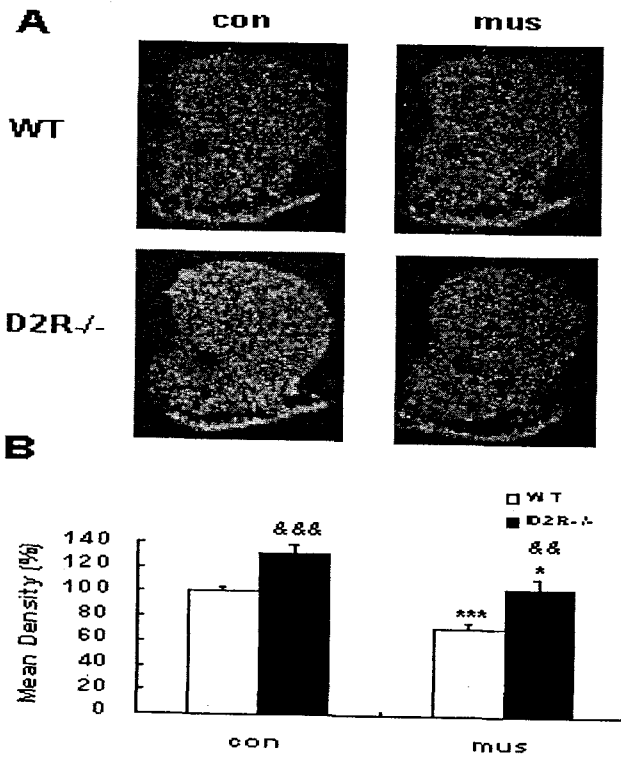


Fig.5. WT, D2R<sup>-/-</sup> mice에서의 muscimol에 의한 Enkephalin의 발현 변화

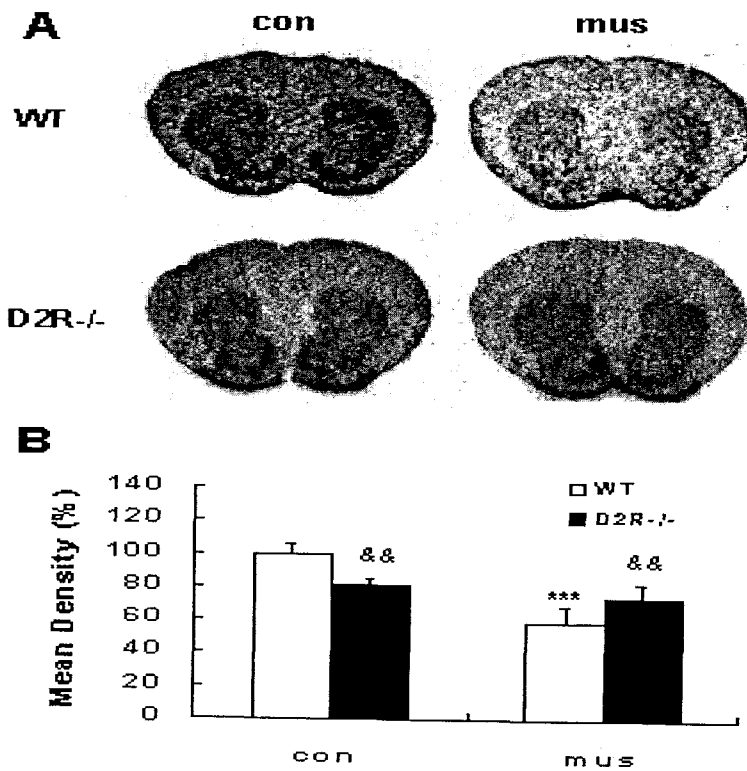


Fig.6. WT, D2R-/- mice에서의 muscimol에 의한 Substance P의 발현 변화

### 3)-2. Tyrosin Hydroxylase

WT와 D2R-/- mice에서 muscimol에 의해 Dopamine 합성 효소인 tyrosine hydroxylase 등은 별 변화를 보이지 않았다(Fig. 7). 결국 이는 muscimol이 tyrosine hydroxylase를 통해 dopamine 합성을 증가시켜 운동기능을 촉진 시킨 것이 아니라는 것을 말해준다.

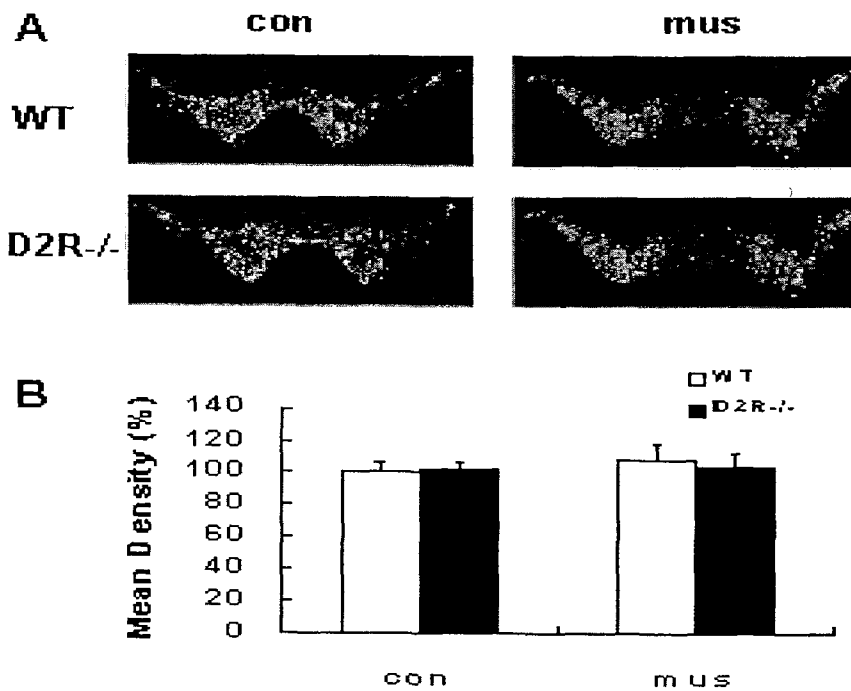


Fig.7. WT, D2R-/- mice에서의 muscimol에 의한 Tyrosine Hydroxylase의 발현 변화

### 3)-3 Immediate early gene NGFI-A(zif/268), NGFI-B (nur/77) 의 발현 변화

한편 immediate early gene 들의 하나인, NGFI-A(zif/268), NGFI-B (nur/77)등의 발현조절 또한 살펴보았는데, 흥미로운 것은 두 immediate early gene 모두 D2R-/- mice에서 그 발현 정도가 감소되어있는 것으로 보아 이 들 쥐에서 D2R-/-이 결여됨에 따라 이러한 immediate early gene들의 기본적인 활성정도가 낮아져 있다고 생각할 수 있게 되었다.(Fig. 8,9) 이것은 D2R-/-가 neurotransmission의 tonic activity에 매우 중요하게 작용한다는 것을 볼 수 있다. 특히 NGFI-A(zif/268)의 경우는 muscimol에 따라 그 발현정도가 운동기능과 관련되어 조절되는 것이 관찰되었다 (Fig.8). 특히 frontal cortex와 striatum에서 이러한 조절이 특이적으로 관찰되었다. 그러나 NGFI-B (nur/77)의 경우는 basal expression 은 낮아있으나 muscimol에 의해 운동기능과 관련한 어떤 상관관계는 보이지 않아 NGFI-A(zif/268)와 다르게 조절됨을 알 수 있었다 (Fig.9). 따라서 NGFI-A(zif/268)이 좀더

D2R-GABA AR과의 상호작용에 긴밀히 조절된다고 추정할 수 있다. WT과 D2R<sup>-/-</sup>mice 에서의 발현조절이 운동기능 조절과 관련되어 이들 유전자의 발현이 조절되는 것이 관찰되었다. 이러한 연구결과로 미루어보아, D2 receptor가 basal ganglia의 motor circuit에서 중요한 역할을 하고, D2 receptor는 GABA receptor A type을 비롯, enkephalin, substance P 등의 neuropeptide와 또한 immediate early gene등과의 긴밀한 상호작용을 통해 운동기능을 조절하는 것으로 추정 할 수 있다.

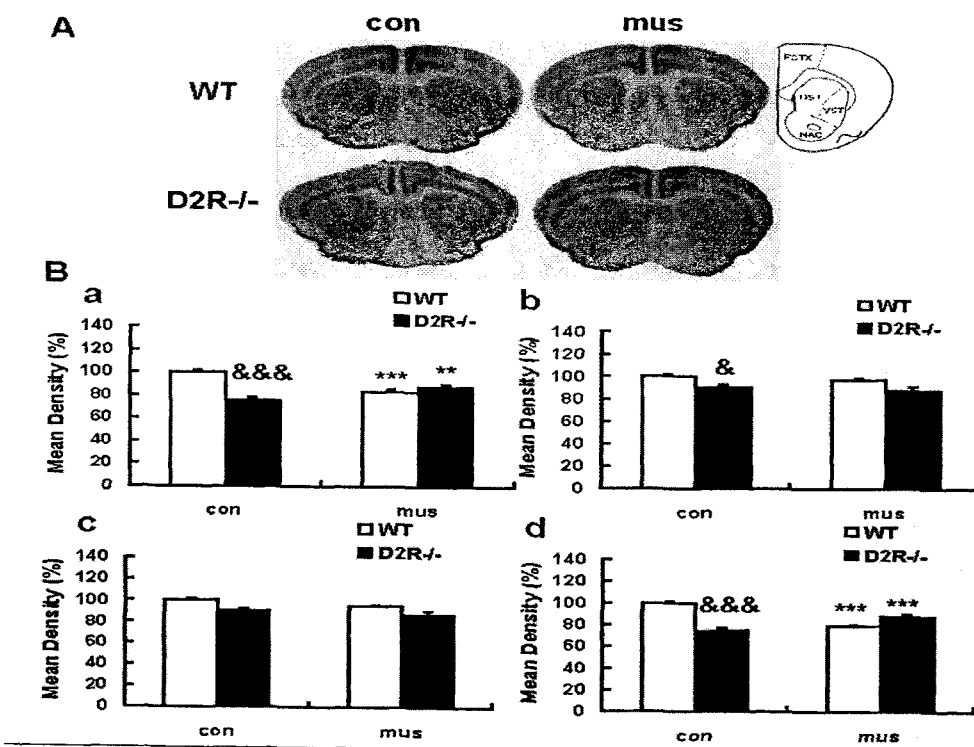


Figure 8. WT와 D2 receptor null mice에서의 muscimol에 의한 immediate early gene NGFI-A(zif/268)의 발현조절



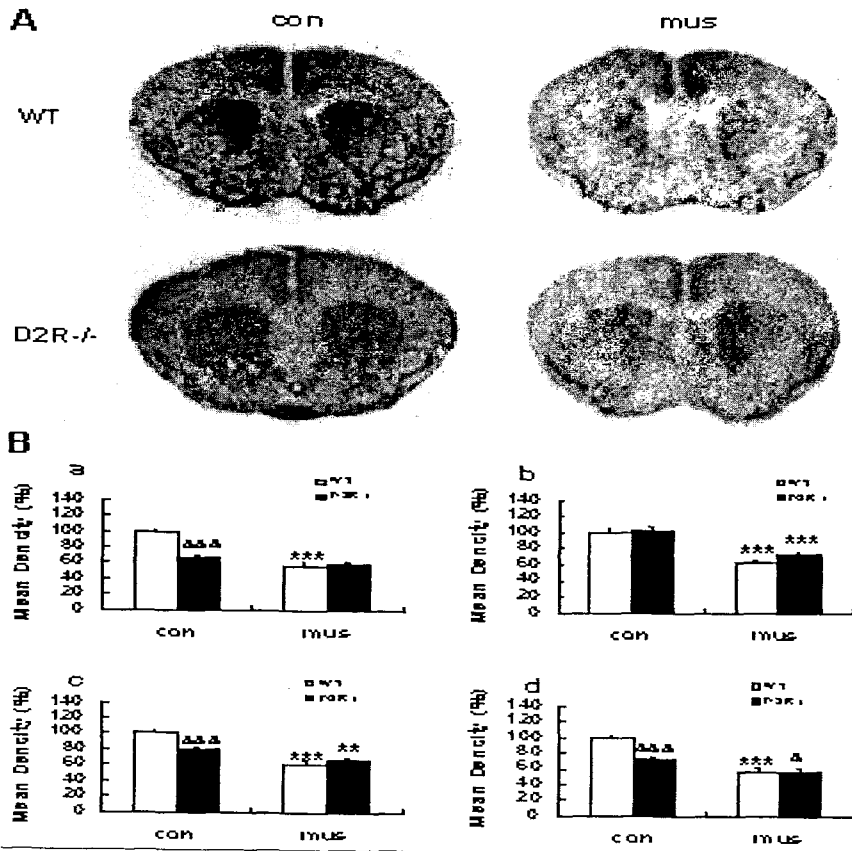


Figure 9. WT와 D2 receptor null mice에서의 muscimol에 의한 immediate early gene NGFI-B(nur77)의 발현조절

### 3)-4. 기타 조절관여 candidate들에 대한 분석

또한 최근, striatal neuronal MAPK pathway가 D2 dopamine receptor에 의한 locomotor activity 조절에 매우 중요하다는 보고가 잇따르고 있어, 본 연구팀에서는 WT와 D2 receptor null mice에서의 muscimol에 의한 ERK의 인산화를 분석하여보았다 (Figure 10). WT mice의 경우 D2 agonist인 quinpirole (Quin1)에 의해서도 ERK의 인산화가 증가하나 muscimol에 의해서는 ERK의 인산화가 감소하는 경향을 보였다. 반면, 흥미롭게도, D2R -/- mice에서는 quinpirole에 의한 ERK activation이 결여되었으며, muscimol 1mg/kg (Mus1)

의 조건에서는 강하게 인산화가 증가하는 것이 관찰되었다.

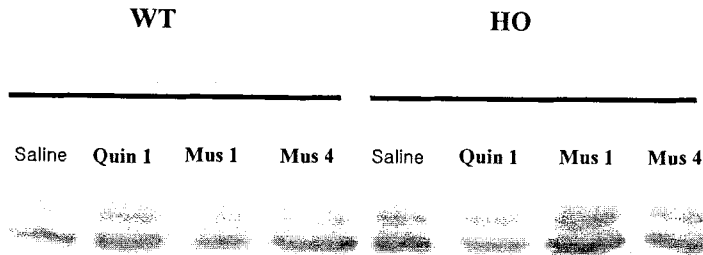


Figure 10. WT와 D2 receptor null mice에서의 muscimol에 의한 ERK의 인산화 조절, Q; quinpirole, Mus: muscimol

이외에 dopaminergic neuron과 같이 striatum에 발현되는 STEP (striatum-enriched tyrosine phosphatase)을 Northern analysis로 분석하였는데, 이들은 cortex와 midbrain에서는 D2R<sup>-/-</sup> mice에서 낮은 발현정도를 보였으며, MeCpGBP(Methyl CpG-binding protein) 등의 분석도 하였으나, 이들의 발현조절은 별다른 차이를 보이지 않았다 (Figure 11).

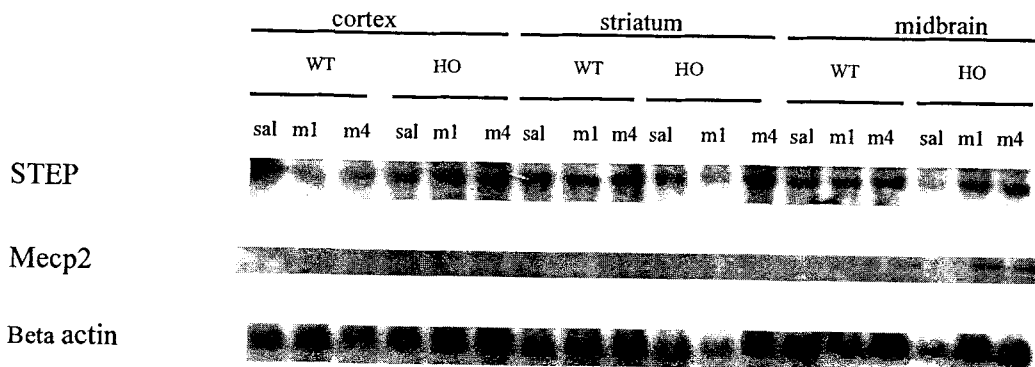


Figure 11. WT과 D2R<sup>-/-</sup> mice에서의 muscimol에 의한 STEP 과 MeCpGBP의 발현 조절 분석

이에 따라 본 연구에서는 D2R과 STEP간의 상호작용을 좀더 면밀히 연구하기로 하였고 그 결과는 다음 section II에 정리 하였다.

#### 4) Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와 의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자동 정

도파민 수용체 D2가 결여된 쥐에 신경전달물질인 GABA(  $\gamma$ -aminobutyric acid)의 항진제인 muscimol 을 저농도(1mg/kg)로 투여하면 정상적인 운동의 기능이 항진되는 것을 관찰할 수 있다.. 반면 정상적인 쥐에 같은 농도의 muscimol을 주입하면 행동이나 운동 기능에 변화가 나타나지 않는다. 특히 이때에 striatum에 발현되는 neuropeptide들인 enkephalin, substance P, 혹은 NGFI-A (Zif268), NGFI-B (Nur77)등의 발현이 빠르게 조절되는 것을 본 연구팀은 관찰할 수 있어서 이러한 운동기능의 조절이 basal ganglia에서 분자적 수준에서 조절된다고 추정하였다. 어떤 유전자들이 여기에 관여하는 지 보기위해 muscimol 주입후 polymerase chain reaction-based differential display (DDRT-PCR)로 RNA Imaging kit (Gen-Hunter Corporation, Nashville, TN) 를 사용하였다. muscimol 주입후 전사된 메신저 RNA의 발현정도를 측정하기 위해 다시 역전사하여 DNA를 만든후 이를 증폭하여 양의 변화가 있는 유전자를 찾는 방법이다. 정상적인 쥐와 도파민 수용체I D2가 결여된 쥐에 생리 식염수와 muscimol을 주사한 후 한시간 후 뇌를 적출하여 RNA를 얻은 후 이를 역전사한 후 PCR로 증폭하여 6% polyacrylamide gel에 내린후 양의 차이가 있는 유전자를 얻어 cloning하고 sequencing하였다. 이렇게 얻어진 염기서열은 National Centre for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/web/genbank>) 에서 제공하는 BLASTn 프로그램을 이용하여 GenBankTM에 있는 동일한 염기서열을 가진 유전자를 찾았다. 이 후보 유전자들은 다음과 같다.


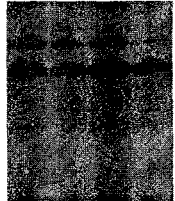
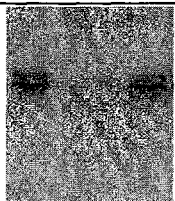
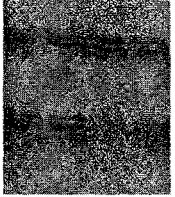
후보 유전자 (accession number)	DDRT-PCR 결과 (WS HS WM HM)	e- VALUE
Mus musculus.Similar to capping protein (actin filament) (BC016232)		4e-12
Mus CLIP associating protein 2 (Clasp2) (XM_135174)		1e-15
Rattus norvegicus kinase D-interacting substance of 220 kDa (Kidins220) (NM_053795)		4e-3
Mus musculus D6MM5e protein (D6Mm5e) and DOK protein (Dok) genes, and LOR2 protein (Lor2) gene, (AF084363)		4e-15

Table 1: Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석

(W:정상적인 쥐, H: 도파민 수용체가 결여된 쥐, S: 생리식염수를 주사, M: muscimol을 주사)

탐색된 후보 유전자:

1) capping protein: 다운 증후군에서 결핍되어 나타나는 유전자로 알려져있다. 이 유전자의 결핍으로 생식세포 분열 시 염색체 분열에 문제가 생겨 다운 증후군이 생기며 다른 한편으로 axon의 발달의 문제로 인해 뇌 발달에 장애가 생긴다고 설명된다. 따라서 이 유전자가 도파민 수용체가 없는 쥐에서 적게 발현되며 muscimol을 주사 하면 그 발현정도가 증가되는 것은 뇌의 운동을 관장하는 부분의 발달정도와 관계될 수 있다(Biochem Biophys Res Commun 2002 291(1): 62-7, Biochem Biophys Res Commun 2002 293(2): 836-41 ).

2) CLIP associating protein 2 (Clasp2): CLIP은 미세소관의 성장에 관련되어있는 단백질

로 이것의 결핍은 뉴런의 성장의 문제를 일으키는 윌리엄 증후군의 원인이다. 윌리엄 증후군은 뇌 발달의 문제를 비롯해서 해마의 비정상화와 행동장애를 포함한다. (Cell 2001 104(6):923-35, Nat Genet 2002 32(2): 116-27)

3) kinase D-interacting substance of 220 kDa (Kidins220): 이는 PKD(protein kinase D)의 기질이며 뇌에서 특히 많이 발현되는 것으로 알려져 있다. PKD는 PKC (Protein Kinase C)에 의해 그 활성이 조절되며 이는 이후에 Erk를 활성화 시킨다. Erk는 행동패턴에 영향을 준다고 널리 알려져 있으며 이런 의미에서 이 유전자는 중요한 의미를 갖는다. (J. Biol. Chem. 2000 27 5 (51): 40048-40056)

4) D6MM5e protein (D6Mm5e): DOK protein (Dok) genes, and LOR2 protein (Lor2) gene과 함께 염색체의 mnd2 지역에 존재하며 이것에 돌연변이가 생길 경우 근육의 퇴화를 가져 온다고 알려져 있다. (Genome Res 1999 Jan;9(1):53-61)

이 후보 유전자 모두 운동기능 조절에 영향을 주는 다양한 증후군들과 관련이 있는 것으로 보고되어 일단은 본 연구결과가 성공적인 것으로 추정되며 이런 유전자가 어떤 식으로 dopamine-GABA 상호작용에 의해 조절되는 가를 분석중이다.

## II. 운동 기능 조절 관련 basal ganglia-specific target gene 동정 및 조절기전 분석

본 연구팀에서는 1차년도부터 basal ganglia 특이적으로 운동기능조절에 영향을 줄 수 있는 유전자들에 대해 연구를 계속하고 있어, 1항의 유전자와 2항의 유전자들 중 가장 dopamine과 관련되어 basal ganglia의 운동기능조절에 중요한 역할을 할 수 있는 유전자를 탐색중이다. 그중 dopaminergic neuron에 분포되면서 dopamine에 의한 신호전달에 중요한 역할을 하는 STEP(striatum-enriched tyrosine phosphatase)에 대해 좀더 분석을 해 보았다.

STEP은 뇌의 여러 부위 중에서도 basal ganglia, striatum에 특이적으로 발현되며 도파민성 신경세포와 함께 존재한다. STEP은 alternative splicing에 의해 여러가지 이성체로 존재하게 되는 데 대표적인 것이 STEP61과 STEP46으로 STEP61은 membrane associated protein이며 STEP46은 cytosolic protein이다.

STEP이 존재하는 부위와 STEP이 도파민성 신경세포와 함께 발현한다는 보고로 미루어 도파민과 같은 신경전달물질에 의해 STEP이 조절될 수 있다고 추정할 수 있다. 따

라서 도파민 신호 경로에 의해 STEP과 같은 특정 PTP가 조절되는가를 규명한다면 중추신경계의 신경전달물질에 의한 신호전달체계를 이해하는 데 있어서 중요한 바탕이 될 것이다. 또한 도파민 시스템에 의한 중추신경계의 신호전달체계를 이해함으로써 파킨슨 증후군(parkinsons disease)과 같이 도파민 시스템 이상으로 발병한 중추신경계 질환의 병리기전을 이해하는 데 도움이 될 것이라고 생각되어 진다.

1) 정상적인 쥐와 D2R<sup>-/-</sup> mice에서 STEP의 발현변화

정상적인 쥐와 D2R<sup>-/-</sup> mice의 striatum 과 midbrain을 추출하여 RNA를 분리, STEP에 대한 발현을 Northern analysis로 측정하였다.

그 결과 정상적인 쥐와 D2R<sup>-/-</sup> mice에서는 STEP의 발현에 있어서는 별다른 차이를 보이지 않았다. (Fig.12)

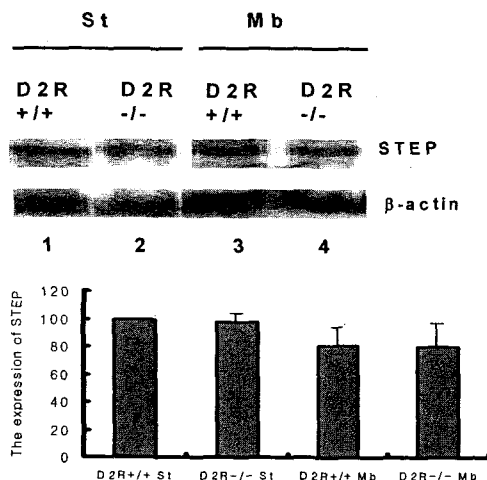


Fig. 12 정상적인 쥐 (WT)와 D2R<sup>-/-</sup> mice에서의 striatum(St)과 midbrain(Mb)에서의 STEP의 발현

2) D2 receptor에 의한 STEP-ERK 상호작용 변화

최근에 STEP의 하위작용단백질로 ERK1/2가 제시되었다. 실제로 STEP의 구조를 보면 ERK를 결합할 수 있는 KIM domain이 존재하는 것으로 알려져 있다. 도파민 D2 수용체

와 STEP을 발현하는 세포에 도파민을 시간별로 처리한 후 STEP을 분리하여 STEP과 ERK와의 결합 변화를 측정함으로써 도파민 D2 수용체 신호전달체계가 STEP과 ERK와의 결합에 끼치는 영향을 분석하였다. (Fig.13).

그 결과 D2 receptor agonist에 의해 특이적으로 STEP과 phospho-ERK가 결합하는 것을 관찰할 수 있었으며, 이러한 현상은 D2 receptor antagonist인 haloperidol에 의해 block이 되는 것을 보여, D2 receptor 특이적인 현상임을 볼 수 있었다.

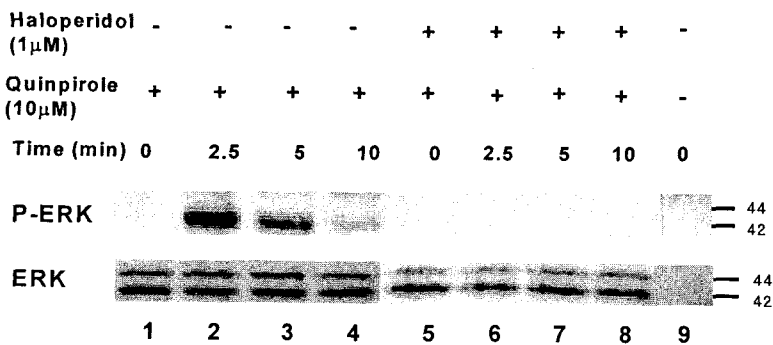


Fig.13 Dopamine D2receptor agonist quinpirole에 의한 STEP과 phospho-ERK의 결합  
D2 receptor-expressing cell line CHO-D2 cell에 STEP-FLAG을 transfection 한 후 quinpirole로 처리후 FLAG antibody로 immunoprecipitation한 후 phospho-ERK로 Western blot analysis를 하였다.

이러한 STEP과 ERK의 결합은 forskolin을 처리하거나 혹은 D1 receptor agonist, antagonist에 대해서는 조절되지 않는 것을 보여 D2 receptor에 의한 특이적인 조절임을 알 수 있었다.

ERK의 중추신경계에서의 신호전달의 역할은 매우 다양한 것으로 알려져 있으며, 특히 운동기능 조절에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 Dopamine D2 receptor의 STEP을 통한 활성화된 ERK의 결합은 D2 receptor를 통한 STEP과 ERK에 대한 특이적인 조절로 이것이 실제로 신경생리 기능에 어떤 역할을 하는지를 분석하는 것은 매우 중요한 의의가 있다고 본다.

### III. D2 receptor null mice에서의 GABA receptor A agonist에 의한 seizure-like behavior의 조절 분석

도파민 D2 수용체가 결여된 쥐에 신경전달물질인 GABA( g-aminobutyric acid)의 항진제인 muscimol 을 고농도(4mg/kg)로 투여하면 seizure-like한 행동을 보이는 반면 정상적인 쥐에 muscimol을 주입하면 catalepsy를 나타낸다. 도파민 D2 수용체가 결여된 쥐에서 나타내는 seizure-like behavior에 대한 scoring을 다음과 같이 분석하였다. (Fig.14)

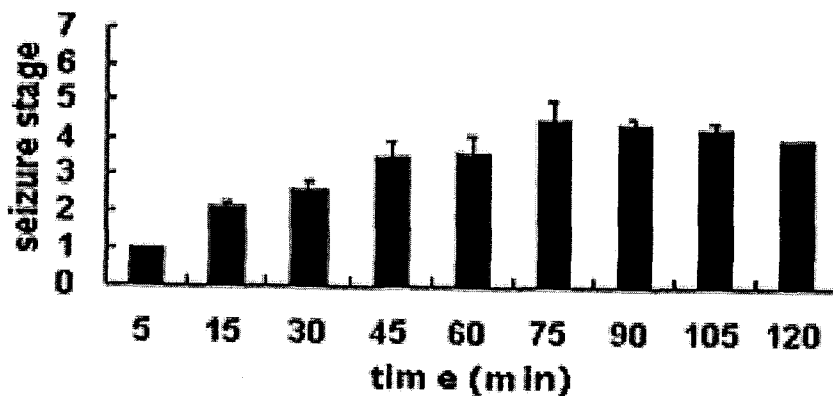


Fig. 14. D2R<sup>-/-</sup> mice에서의 muscimol 4mg/kg에 의한 seizure-like behavior의 severity  
 Stage 1: normal behavior; stage 2: immobility; stage 3: mouth and facial movements; stage 4: repetitive movements, head nodding; stage 5: rearing and falling; stage 6: severe tonic-clonic seizures; and stage 7, death.

이러한 seizure activity에 대한 성격을 좀 더 분석하고자 encephalographic recording (EEG)을 해 보았다.

#### EEG recording

Ketamine (100mg/kg) 과 Xylazine (8.8mg/kg) 으로 정상적인 쥐와 도파민 D2 수용체가 결여된 쥐를 마취시킨후 screw electrode 를 frontal cortex region (anterior 1.5mm , lateral  $\pm$  1.5mm from the bregma), grounding electrode 를 cerebellum region (posterior 1mm from lambda) 에 삽입하였다. 삽입된 screw는 dental cement 로 고정시킨다. 수술 후 약 1주일 정도의 회복시간을 준후 생리식염수 , bicuculline , muscimol 을 각각 농도별로 복강주사하고 Nihon Kohden Neuro Pack 8 을 이용하여 뇌파 기록을 하였다. 기록된 신호들은 CED 1401을 통하여 filter 하고 결과는 Spike 2 프로그램으로 분석을 했다.

Seizure를 일으키기로 잘 알려진 GABA A receptor antagonist bicuculline (3mg/kg) 복



강주사후 뇌파 결과를 보면 정상적인 쥐와 도파민 D2 수용체가 결여된 쥐에서 모두 전형적인 seizure spike 를 관찰할 수가 있고 별다른 차이를 보이지 않았다 (Fig.15)

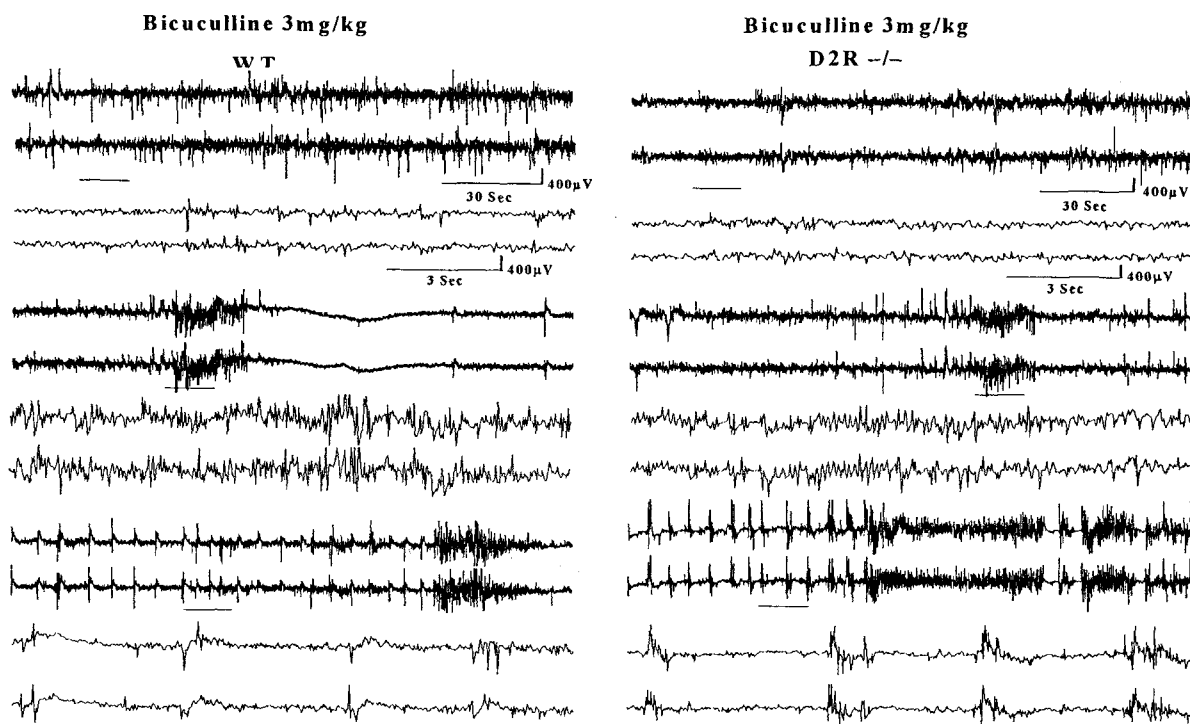


Fig.15 WT와 D2R-/- mice에서의 bicuculline (3mg/kg) 주입 후 EEG recording

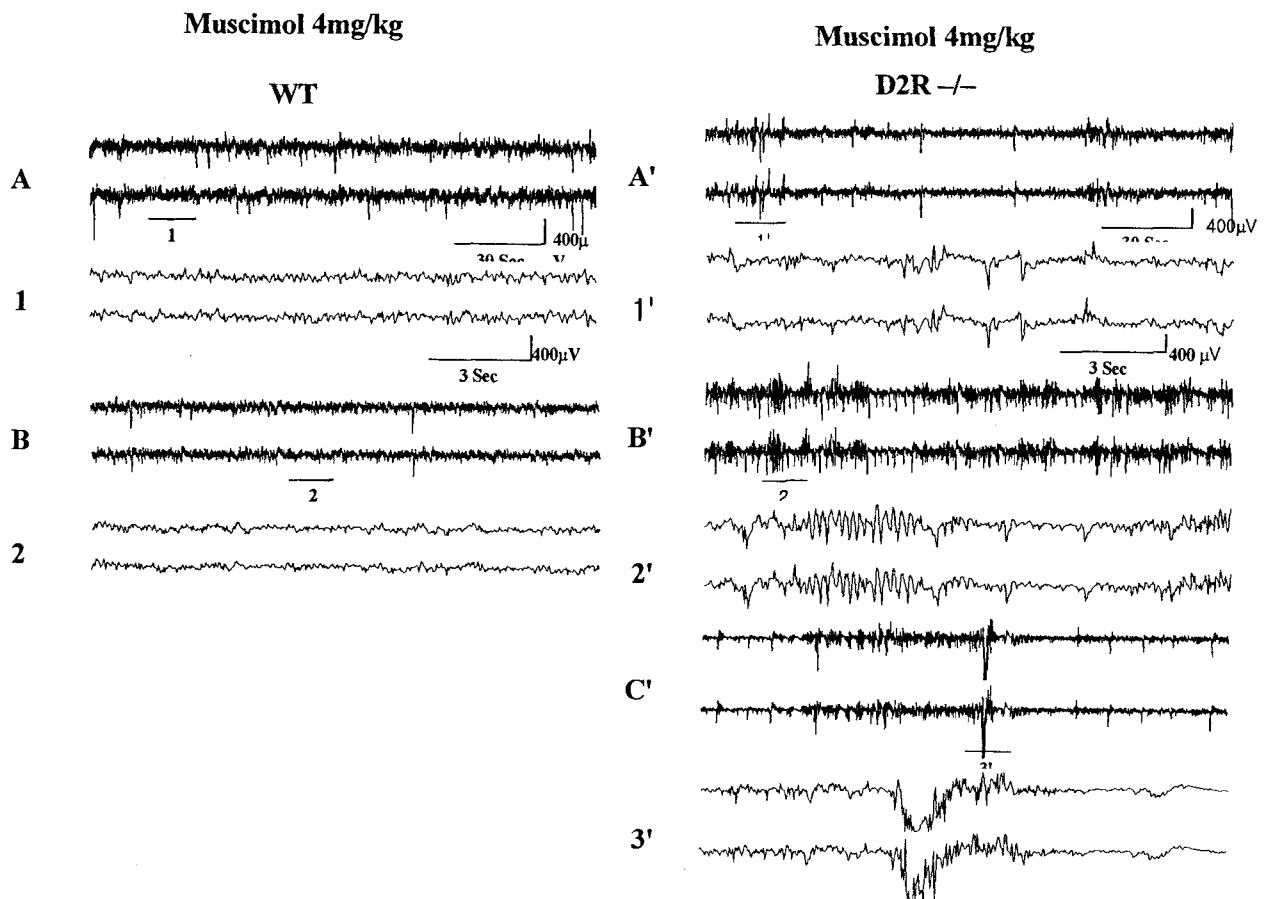


Fig. 16. WT와 D2R<sup>-/-</sup> mice에서의 muscimol (4mg/kg) 주입 후 EEG recording

그러나 muscimol (4mg/kg) 을 복강주사한후 뇌파기록 결과를 보면 정상적인 쥐에서는 생리식염수를 주사한 그룹에 비해 muscimol 을 주사한 그룹이 전체적으로 뇌파의 진폭이 감소하였고 이와 반대로 D2R<sup>-/-</sup> 쥐에서는 진동회수와 진폭이 크게 증가된 synchronous한 spike를 관찰할 수가 있다 (Fig. 16).

이로부터 도파민 D2 수용체가 없을 때 GABA A 수용체가 흥분되면 seizure 가 나타난다는 것을 알수있으며 이것은 전형적인 inhibitory neurotransmitter인 GABA의 neurotransmission이 D2 receptor의 기여로 말미암아 완전히 변형되어있음을 보여주는 매우 흥미로운 결과이다. 특히 도파민 D2 수용체와 GABA A 수용체의 상호작용이 정상적인 basal ganglia 의 motor circuit 의 균형을 유지하여 정상적인 행동을 나타내는데 아주 중요하다는 것을 알 수 있다.

- WT와 D2R<sup>-/-</sup> mice에서의 basal ganglia Microinjection을 통한 muscimol의 운동기능

## 에 대한 효과

선행된 연구를 통해 이 dopamine receptor 중 D2 receptor의 knock-out mice는 wild type에 비해 운동기능조절 능력이 현저하게 줄었으며 이러한 운동조절 기능이상은 GABAergic drug을 통해 조절가능 됨을 알게 되었다. dopaminergic neuron과 GABAergic neuron의 interaction은 GABA A receptor를 통해 이뤄지며 D2 knock-out mice의 운동기작 이상은 GABA A receptor type drug으로 조절되어 회복될 수 있다는 가능성을 제시한다. GABA A receptor drug의 agonist인 bicuculline을 처리하고 antagonist인 muscimol을 D2R knock-out mice와 Wild type mice에 처리한 결과 agonist인 bicuculline은 두 mice에서 별다른 변화를 보이지 않았으나 antagonist인 muscimol의 경우 D2R knock-out mice에서 seizure-like behavior를 보이는 반면 wild type mice에서는 locomoter activity가 줄어드는 경향으로 2시간 가량 cataleptic immobility가 지속되었다. 이러한 현상은 Dopamine receptor와 GABA receptor의 상호작용으로 인한 운동기능의 영향으로 볼수 있으며 특히 D2R knock-out mice에서 보여진 seizure의 경우 EEG recording을 통해 seizure 범주에 속하는 속성으로 분석 확인하였다. 또한 muscimol에 의한 differential 수행하여 분석하며 얻어진 몇 개의 candidate gene을 확인하였다.

따라서 위에서 관찰한 효과가 실제로 central 하게 CNS의 basal ganglia를 통한 조절이라는 것을 알아보기위해 medium spiny neuron이 많이 분포하는 substantia nigra와 Globus pallidus, 그리고 dopaminergic neuron이 projection 된 Subthalamic nucleus 중 subthalamic nucleus에 muscimol을 국부적으로 microinjection 하여 WT mice와 D2R knock-out mice에서 운동기능을 비교하였다.

## WT와 D2R<sup>-/-</sup> mice의 STN에서의 muscimol microinjection.

WT와 D2R<sup>-/-</sup> mice를 마취액을 7:3의 비율인 N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gas와 섞어 마취시킨 후 각 mice의 bregma에서 AP가 1.8mm (caudal), L이 ±1.5mm (lateral), V가 4.5mm (depth)에 위치하는 STN(subthalamic nucleus)에 GABA A receptor의 agonist인 muscimol를 5pmol injection 한 후 WT와 D2R<sup>-/-</sup> mice에서 행동 양식을 관찰하였다 (Table 2). WT mice의 경우 STN의 injection 후 2~5분 안에 catalepsy가 일어났으며 3시간이후 완전하게 깨어나 정상적인 행동양식을 보였다. 반면 D2R<sup>-/-</sup> mice의 경우 injection 후 2분 이후부터 3시간

이상 tonic clonic seizure의 행동 양식을 보였다. 이는 muscimol을 4mg/kg으로 ip injection 했을 때와 동일한 결과로 이는 D2 receptor knock-out mice에서 GABA A receptor가 locomotor activity와 관련성이 있는 signal을 변형시킨 것으로 보인다 (Fig. 17). 즉, GABA A와 D2 receptor의 interaction은 striato-pallidal GABA neuron에서 일어나며 이들 neuron은 D2 receptor를 통해 매개되는 dopamine의 inhibitory 효과를 조절하는 것으로 보여진다. D2 knock-out mice에서 보여진 muscimol에 의한 GABAergic inhibition은 이로 인해 변형된 motor circuit을 보상하기 위한 것으로 생각된다. 또한 과도한 GABAergic neuron의 inhibition은 STN의 inhibition으로 되고 비정상적인 seizure를 야기하는 것으로 보여진다.

genotype	Body weight(g)	dose	injection site
WT	28	5 pmol, single	STN
WT	28	5 pmol, bilateral	STN
WT	27	5 pmol, bilateral	STN
WT	29	5 pmol, bilateral	STN
genotype	Body weight(g)	dose	injection site
HO	23	5 pmol, bilateral	STN
HO	26.5	5 pmol, bilateral	STN
HO	24.5	5 pmol, bilateral	STN
HO	28	5 pmol, bilateral	STN

Table 2. WT와 D2R<sup>-/-</sup> mice의 STN에서의 muscimol microinjection.

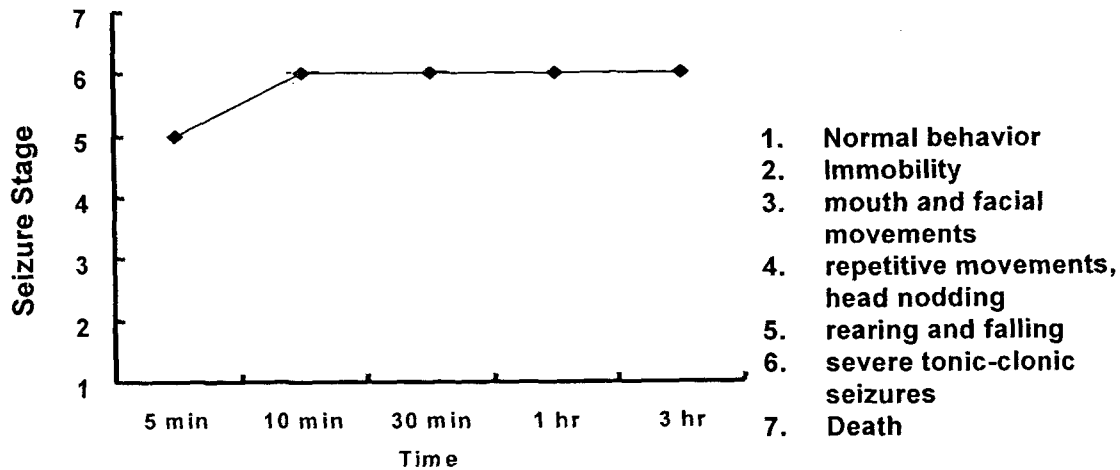


Fig. 17. Muscimol-induced seizure-like activity in D2R<sup>-/-</sup> mice by microinjection in STN

### GABA A receptor and Dopamine 2 receptor의 상호작용

위의 결과로 본 연구팀은 D2 receptor와 GABA receptor A가 매우 긴밀하게 상호작용하고 있음을 알 수 있었으며 특히 이러한 상호작용이 실제로 receptor간의 물리적인 상호작용도 있을 수 있다는 가설을 세우게 되었다. 이를 증명하기 위해 본 연구팀은 Dopamine D2 receptor의 short form(D2S)와 long form(D2L), 그리고 GABA receptor와 *in-vitro*상에서의 interaction 여부를 GST pull down assay와 Co-immunoprecipitation을 통해 확인하려 하였다. 따라서 GABA subunit,과 D2L,D2S receptor를 E.Coli 에서 발현시켜 GST pull down assay를 통해 *in-vitro* 상에서 직접적인 binding 여부를 확인하였다. 사용한 GABA의 subunit은 가장 보편적인  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$  type을 사용하였다.

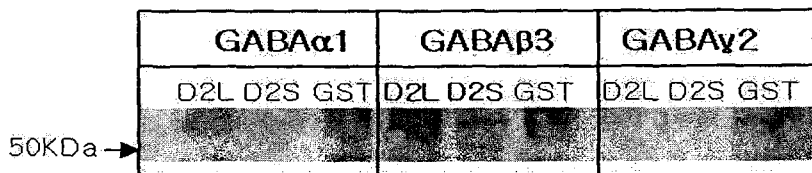


Fig 18. GABA A receptor와 Dopamine 2 receptor의 GST pull down assay

Fig. 18는 D2L과 D2S가 GABA A receptor subunit 중  $\beta 3$  type과 binding 가능성이 있음을 보여주는 것으로 D2S와 는 확연하게 상호작용을 하는 것으로 보여진다.. 본 실험을 바탕으로 GABA의  $\beta 3$ 와 D2L,D2S를 각각 transfection후 dopamine이나 GABA로

stimulation하고, GABA,와 dopamine을 동시에 stimulation하여 immunoprecipitation을 실시하고 실제 이들 수용체들의 signaling이 상호작용에 의해 변화되는 지를 보는 것이 현재 진행중인 연구이다. 결국 GABA A receptor가 Dopamine receptor와 물리적으로 상호작용 하며 이두 수용체의 상호작용은 특히 basal ganglia의 motor circuit에서는 운동기능을 조절하기위해 매우 중요한 역할을 수행한다고 볼 수 있다. 특히 최근에 basal ganglia의 STN 부분에 GABA 합성 효소인 GAD를 gene transfer하여 파킨슨증후군의 증상을 호전시키거나 (2002. Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. Science 298, 425-429) 혹은 파킨슨 증후군 환자에 muscimol을 주입하여 운동기능의 호전을 보는 등의 (2001. Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. Brain 124, 2105-2118) 본연구팀의 결과를 뒷받침하는 보고들이 발표되고 있어 본 연구팀이 얻은 일련의 결과는 매우 고무적이다.

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

본 과제에서는 Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자를 동정하고 이 유전자를 뇌의 basal ganglia에 특이적으로 과 발현하여, 운동기능조절을 분석하고 D2 receptor knockout mice와 비교분석하고자 하는계획으로 본 연구를 시작하였다. 제한된 연구비 내에서 WT과 D2R<sup>-/-</sup> mice를 사용, dopamineD2 receptor-GABA A receptor 상호작용과을 면밀히 분석한 그 결과 GABA A receptor를 활성화 시킴으로서 운동기능이 현저히 줄은 D2R<sup>-/-</sup> mice의 운동기능을 증가시키고 한편 excessive한 GABA A receptor의 활성화 경우 오히려 seizure activity를 유발하는 것으로 추정할 수 있는 중요한 결과를 얻었다. 또한 관련유전자 pool 및 STEP의 striatum에서의 D2receptor에 의한 특이적인 조절등 관련 단백질에 대한 많은 정보를 얻을 수 있었다. 특히 최근에 basal ganglia의 STN 부분에 GABA 합성 효소인 GAD를 gene transfer하여 파킨슨증후군의 증상을 호전시키거나 (2002. Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. Science 298, 425-429) 혹은 파킨슨 증후군 환자에 muscimol을 주입하여 운동기능의 호전을 보는 등의 (2001. Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. Brain 124, 2105-2118) 본 연구팀의 결과를 뒷받침하는 보고들이 발표되고 있어 매우 고무적이다. 따라서 이러한 결과를 배경으로 GABA A receptor agonist, antagonist를 basal ganglia에 microinjection하여 실제로 어떠한 GABAergic neuron이 D2R<sup>-/-</sup> mice에서 영향을 받고 운동기능이 호전 되는지를 분석하고 실제 운동기능에 관계되는 유전자를 분석하고자 하였다. 원래 3차년도에서는 striatum에서 운동기능관련 유전자를 과 발현하는 transgenic mice를 제작하기 위한 준비를 수행하려 하였으나, 현재까지의 연구결과를 통해 basal ganglia의 여러 부위에 GABAergic drug을 microinjection하는 것이 지금까지 얻은 결과에 대한 타당성을 입증하고 실제 관련 동물모델을 만들 수 있는 확실한 정보를 주리라 생각되어 이런 중요성에서 3차년도의 본래계획을 수정하여 basal ganglia에서의 D2R과 GABA A receptor의 상호작용부위를 규명하였다. 운동기능이 떨어진D2R<sup>-/-</sup> mice를 이용하여 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자를 동정하고 이 유전자를 뇌의 basal ganglia에 특이적으로 과 발현하여, 운동기능조절을 분석하고 D2 receptor knockout mice와 비교분석하고자 하는 앞으로의 최종목표는 변함이 없으나, 제한된 연구비 내에서 좀더 확실한 target gene validation을 위해, 또한 D2R-GABA A receptor의 상호작용부위를 basal ganglia 내에서 좀더 확실히 규명하여 어떤 GABAergic neuron이 조절을 받는지를 규명한다면 앞으로



의 운동기능 관련 유전자를 과발현하는 transgenic mice를 만들기 위해서 중요한 선행연구라 생각된다.

### (1) 연구개발의 최종목표

운동기능조절에서의 Dopamine receptor와 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자 동정 및 상호작용 분석- basal ganglia에서의 운동기능 조절 target gene 도출

### (2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2001)	운동기능조절에서의 Dopamine receptor와 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자 동정 및 분석- 1. 이미 검증된 5종의 candidate gene 발현 조절 면밀 분석 2. muscimol에 의한 expression profiling	1. methyl CpG-binding protein, striatum-specific protein tyrosine phosphatase (STEP) 및 MAPK, NGFI-A (zif 268), NGFI-B (nur77)등 이미 검증을 거친 5종의 candidate gene 발현 조절 면밀 분석 (50%) 2. muscimol에 의한 expression profiling (50%)
2차년도 (2002)	1. Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자동정, 2. 운동 기능 조절 관련 basal ganglia-specific target gene 동정 및 조절기전 분석 3. D2 receptor null mice에서의 GABA receptor A agonist에 의한 seizure-like behavior의 조절 기전 분석	1. Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자동정-muscimol에 의한 expression profiling 결과에 대한 분석으로 target gene identification. 2. 동정된 유전자에 대한 관련 기능분석 3. muscimol의 높은 농도에 의해 D2R-/- mice에서 seizure-like behavior의 분석-seizure typing 및 기전 분석
3차년도 (2003)	뇌의 basal ganglia에서의 GABA receptor A agonist, antagonist의 microinjection을 통한 D2R-GABA A receptor 상호작용부위규명을 통한 운동기능 조절 및 관련 유전자 조절 분석	-WT, D2R-/- mice의 basal ganglia에서의 GABA A receptor agonist microinjection을 통한 운동기능 분석 -D2-GABA A receptor의 상호작용부위 규명 -관련부위에서 특이적으로 조절되는 유전자 분석

(3) 계획대비 달성도

번호	세부연구목표	달성내용	달성도 (%)
1	운동기능조절에서의 Dopamine receptor와 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현 분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자 동정 및 분석- 1. 이미 검증된 5종의 candidate gene 발현 조절 면밀 분석 2. muscimol에 의한 expression profiling	- NGFI-A, NGFI-B는 WT와 D2R-/- mice에서 운동기능과 관련된 유전자 발현조절 양상을 보임 - ERK의 인산화는 WT와 D2R-/- mice운동기능 조절과 관련성을 보임 - striatum-specific protein tyrosine phosphatase (STEP)은WT와 D2R-/- mice에서 muscimol에 의해 조절을 보임 - methyl CpG-binding protein 은WT와 D2R-/- mice에서 별다른 차이를 보이지 않음 - 48조합의 random primer를 이용한 differential display-PCR을 이용한 WT와 D2R-/- mice의 muscimol에 의한 expression profiling	100
2	1.Dopamine receptor와 중요한 상호작용을 하고있는 GABA A receptor와의 상호작용에 따른 유전자 발현분석에서 중요한 target으로 알려진 유전자동정, 2. 운동 기능 조절 관련 basal ganglia-specific target gene 동정 및 조절기전 분석 3.D2 receptor null mice에서의 GABA receptor A agonist에 의한 seizure-like behavior의 조절 기전 분석	- Dopamine receptor D2 knockout mice에서 주입시 운동기능 향상을 보이는 GABAA receptor agonist muscimol에 의한 expression profiling 결과에 대한 분석 - Dopamine receptor D2 knockout mice에서 주입시 운동기능 향상을 보이는 GABAA receptor agonist muscimol에 의한 expression profiling으로부터 도출된 유전자와 striatum에서 dopamine receptor에 의해 조절되는 유전자들의 신호전달 분석 - Dopamine receptor D2 knockout mice에서 GABAA receptor agonist muscimol을 높은 농도로 주입하였을 때의 seizure-like behavior의 seizure scoring과 electroencephalogram recording을 통해 epileptiform의 탐색	100
3	뇌의 basal ganglia에서의 GABA receptor A agonist, antagonist의 microinjection을 통한 D2R-GABA A receptor 상호작용부위규명을 통한 운동기능 조절 및 관련 유전자 조절 분석	- WT/ D2R-/- mice에서의 basal ganglia중 특정부위에 muscimol microinjection을 통해 muscimol에 의해 seizure가 발생됨을 밝혀 실제로 CNS에서 조절되는 현상임을 밝힘 - D2 receptor와 GABA A receptor를 발현시켜 pulldown assay를 통해 서로 물리적으로 상호작용함을 밝힘	100

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

Dopaminergic-GABAergic interaction이 motor circuit에서 중요한 상호작용을 하고 있으며 이것이 GABA A-receptor를 통해 이루어진다는 중요한 결론을 얻었으며, 결국 이것은 dopaminergic pathway가 손상된 운동기능조절 이상질환에 GABAergic A type drug으로 일종의 회복을 기도할 수 있다는 가능성을 시사하는 중요한 결과이다. 특히 최근에 basal ganglia의 특정 부분에 GABA 합성 효소인 GAD를 gene transfer하여 파킨슨증후군의 증상을 호전시키거나 (2002. Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. Science 298, 425-429) 혹은 파킨슨 증후군 환자에 muscimol을 주입하여 운동기능의 호전을 보는 등의 (2001. Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. Brain 124, 2105-2118) 본연구팀의 결과를 뒷받침하는 보고들이 발표되고 있어 매우 고무적이다. 또한 이러한 결과를 배경으로 GABA A receptor agonist, antagonist를 basal ganglia에 microinjection하여 실제로 어떠한 GABAergic neuron이 D2R-/- mice에서 영향을 받고 운동기능이 호전 되는지를 분석하였다. 앞으로 Basal ganglia에서도 D2-GABAA receptor들의 작용부위를 좀더 자세하게 규명할 수 있다면 basal ganglia에서의 운동기능 조절에 있어서의 분자생물학적 기전확립에 큰 영향을 미칠 것이며, 이를 통해 최종적으로는 파킨슨병과 같은 뇌의 운동 조절 기능 이상에 대한 관련 질환에 대한 진단 및 치료법개발에 중요한 단서를 제공할 수 있으리라 본다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

중추신경계의 운동기능이상조절과 가장 관계가 있는 뇌질환은 파킨슨증후군이라 할 수 있으며 가장 큰 원인으로 추정되고 있는 것은 도파민성 신경세포의 선택적인 사멸이라 할 수 있다. 이러한 관점에서 파킨슨증후군을 이해하고 치료제를 개발하려는 연구접근은 도파민성 신경세포의 사멸 기전, 또한 줄기세포 등을 이용한 도파민성 신경세포의 대치 등을 말할 수 있으며 실제로 활발한 연구가 일어나고 있다. 그러나 실제로 파킨슨증후군이 만성적으로 느리게 발병하는 질환임을 보면 이러한 연구도 중요하지만 실제로 파킨슨증후군의 운동기능이상을 치료하고자 하는 연구접근도 매우 중요할 수 있다. 실제 신경전공 임상의를 중심으로 운동기능에 중요한 basal ganglia의 문제되는 부분들을 전기적 자극을 주거나 특히 문제되는 GABA성 신경세포의 신경활동성에 비중을 두어 basal ganglia에 GABA성 신경전달기전에 관여하는 단백질을 발현시켜 손상된 basal ganglia motor circuit의 전체적 기능을 회복시키려는 연구도 활발히 진행되고 있다고 볼 수 있다. 본 연구팀의 연구는 바로 이러한 연구접근과 상당히 일치하여 향후 신경과 임상분야 연구자들과도 공동연구를 통하여 basal ganglia motor circuit의 분자적 조절기전, 분자요법을 통한 기능회복 등에 좀더 중요한 결과를 얻을 수 있다고 생각한다.

## 제 7 장 참고문헌

- Alexander GE, Crutcher MD (1990) Functional architecture of basal ganglia circuits; neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13:266-272.
- Aoyama S, Kase H, Borrelli E (2000) Rescue of locomotor impairment in dopamine D2 receptor-deficient mice by an adenosine A2A receptor antagonist. *J Neurosci* 20:5848-5852.
- Baik JH, Picetti R, Saiardi A, Thiriet G, Dierich A, Depaulis A, Le Meur M, Borrelli E (1995) Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377:424-428.
- Bartholini G, Scatton B, Zivkovic B, Lloyd KG (1987) GABA receptor agonists and extrapyramidal motor function: therapeutic implications for Parkinson's disease. *Adv Neurol* 45:79-83.
- Baufreton J, Garret M, Dovero S, Dufy B, Bioulac B, Taupignon A (2001) Activation of GABA(A) receptors in subthalamic neurons in vitro: properties of native receptors and inhibition mechanisms. *J Neurophysiol* 86:75-85
- Cole AJ, Bhat RV, Patt C, Worley PF, Baraban JM (1992) D1 dopamine receptor activation of multiple transcription factor genes in rat striatum. *J Neurochem* 58:1420-1426.
- Gerfen CR, Engber TM, Mahan LC, Susel Z, Chase TN, Monsma Jr FJ, Sibley DR (1990) D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250:1429-1432
- Gerfen CR (1992) The neostriatal mosaic: Multiple levels of compartmental organization. *Trends Neurosci* 15: 133-139.
- Graybiel AM (1990) Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia. *Trends Neurosci* 13: 244-254.
- Hornykiewicz O (1966) Dopamine and brain function. *Pharmacol Rev* 18:925-964.
- Irifune M, Sato T, Kamata Y, Nishikawa T, Dohi T, Kawahara M (2000) Evidence for GABA(A) receptor agonistic properties of ketamine: convulsive and anesthetic behavioral models in mice. *Anesth Analg* 91:230-236.
- Jung HY, Kang UG, Joo YH, Cho SC, Jeon SH, Park JB, Kim YS. (1998) Electroconvulsive shock does not induce c-fos and junB, but TIS1 and TIS8/zif-268, in neonatal rat hippocampus. *Brain Res Dev Brain Res* 108:303-306.
- Kang HJ, Song MR, Lee SK, Shin EC, Choi YH, Kim SJ, Lee JW, Lee MO (2000) Retinoic acid and its receptors repress the expression and transactivation functions of Nur77: a possible mechanism for the inhibition of apoptosis by retinoic acid. *Exp Cell*

Res 256:545-554.

- Kultas-Ilinsky K, Leontiev V, Whiting PJ. (1998) Expression of 10 GABA(A) receptor subunit messenger RNAs in the motor-related thalamic nuclei and basal ganglia of *Macaca mulatta* studied with in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 85:179-204.
- Levy R., Lang AE, Dostrovsky JO, Pahapill P, Romas J, Saint-Cyr J, Hutchison WD, Lozano AM. (2001) Lidocaine and muscimol microinjections in subthalamic nucleus reverse Parkinsonian symptoms. *Brain*.124: 2105-2118.
- Luo J, Kaplitt MG, Fitzsimons HL, Zuzga DS, Liu Y, Oshinsky M L, During MJ. (2002) Subthalamic GAD gene therapy in a Parkinson's disease rat model. *Science* 298: 425-429.
- Milbrandt J (1987) A nerve growth factor-induced gene encodes a possible transcriptional regulatory factor. *Science* 238:797-799.
- Milbrandt J (1988) Nerve growth factor induces a gene homologous to the glucocorticoid receptor gene. *Neuron* 1:183-188.
- Moratalla R, Robertson HA, Graybiel AM (1992) Dynamic regulation of NGFI-A (*zif268*, *egr1*) gene expression in the striatum. *J Neurosci* 12:2609-2622.
- Nakanishi H, Kita H, and Kitai ST (1987) Electrical properties of rat subthalamic neurons in an in vitro slice preparation. *Brain Res* 437: 35-44
- Nguyen TV, Kosofsky BE, Birnbaum R, Cohen BM, Hyman SE (1992) Differential expression of *c-fos* and *zif268* in rat striatum after haloperidol, clozapine, and amphetamine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:4270-4274.
- Paladini CA, Tepper JM (1999) GABA(A) and GABA(B) antagonists differentially affect the ring pattern of substantia nigra dopaminergic neurons in vivo. *Synapse* 32:165-176
- Paladini CA, Celada P, Tepper JM (1999) Striatal, pallidal, and pars reticulata evoked inhibition of nigrostriatal dopaminergic neurons is mediated by GABA(A) receptors in vivo. *Neuroscience* 89:799-812.
- Perez de la Mora M, Ferre S, Fuxe K (1997) GABA-dopamine receptor-receptor interactions in neostriatal membranes of the rat. *Neurochem Res* 22:1051-1054.
- Picetti R, Saiardi A, Abdel Samad T, Bozzi Y, Baik JH, Borrelli E (1997) Dopamine D2 receptors in signal transduction and behavior. *Crit Rev Neurobiol* 11:121-142.
- Racine, R. J. (1972) Modification of seizure activity by electrical stimulation. II. Motor seizure. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32: 281-294.
- Robertson, R. G., C. A. Clarke, S. Boyce, M. A. Sambrook, and A. R. Crossman (1990) The role of striatopallidal neurons utilizing gamma-aminobutyric acid in the pathophysiology of MPTP-induced parkinsonism in the primate: Evidence from

[3H]flunitrazepam autoradiography. *Brain Res* 531: 95104.

- Soghomonian JJ, Chesselet MF (2000), GABA in Basal Ganglia, in *GABA in the nervous system: The view at fifty years*, p265-291. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Stasi K, Mitsacos A, Giompres P, Kouvelas ED, Triarhou LC (1999) Partial restoration of striatal GABAA receptor balance by functional mesencephalic dopaminergic grafts in mice with hereditary parkinsonism. *Exp Neurol* 157:259-267.
- Steiner H, Gerfen CR (1999) Enkephalin regulates acute D2 dopamine receptor antagonist-induced immediate-early gene expression in striatal neurons. *Neuroscience* 88:795-810.
- Titulaer MN, Kamphuis W, Pool CW, van Heerikhuizen JJ, Lopes da Silva FH (1994) Kindling induces time-dependent and regional specific changes in the [3H]muscimol binding in the rat hippocampus: a quantitative autoradiographic study. *Neuroscience* 59:817-826.
- Watson MA, Milbrandt J (1990) Expression of the nervegrowth factor-regulated NGFI-A and NGFI-B genes in the developing rat. *Development* 110:173-183.
- Wichmann T, Kliem MA, DeLong MR. (2001) *Exp. Neurol.* 167: 410-424.