원 저

대한신경과학회지 19(5):514~519, 2001 ISSN 1225-7044

# Tetrahydrobiopterin과 Tyrosine Hydroxylase 조절부위의 인위적 변이가 Tyrosine Hydroxylase의 발현에 미치는 영향

계명대학교 의과대학 신경과학교실, 서울대학교 의과대학 약리학교실*, 가천의대 신경과학연구소†

조용원 이상도 임정근 이 형 김용식* 이 언† 이영재†

# Effects of Cofactor Tetrahydrobiopterin and Deletions on the Regulatory Domain of Tyrosine Hydroxylase on the Expression of Tyrosine Hydroxylase

**Yong-won Cho, M.D., Sang-Doe Yi, M.D., Jung-Kun Lim, M.D., Hyung Lee, M.D., Yong-Sik Kim, M.D.*, Uhn Lee, M.D.†, Young-Jae Lee, Ph.D.†**

*Department of Neurology, Keimyung University, Department of Pharmacology, Seoul National University*, Neuroscience Research Institute, Gachon Medical School†*

**Background** : For the treatment of Parkinson's disease, dopamine-producing cells or genes involved in producing dopamine or supporting neurons have been tested to replace conventional chemical therapies. Of these, tyrosine hydroxylase (TH) was the most widely used gene for the therapy. Trials using TH via various vectors yielded behavioral improvements in animal models but the effectiveness did not last long enough. As one of the approaches for solving this problem, the regulation of expression of the protein and mRNA of TH was studied. **Methods** : Two approaches for a higher and/or more stable expression of TH were pursued. First, the effect of cofactor tetrahydrobiopterin ($BH_4$) on the expression level of TH and second, the effect of deletion which enables TH protein to escape from protease attack, were examined. **Results** : Cells producing $BH_4$ showed an approximately 10-fold higher TH expression than cells expressing TH alone. When the *in vitro* modified TH was expressed in NIH-3T3, mutant THs showed elevated protein (17.5 ~ 68.6 fold) and mRNA (1.8 ~ 4.6 fold) expression levels at a steady state. **Conclusions** : Results suggest that an addition of $BH_4$ has a more positive effect on mRNA expression levels than protein. However, the deletions seem to have a tremendous effect on the translation and/or protein stability, but a small effect on the mRNA level.

J Korean Neurol Assoc 19(5):514~519, 2001

**Key Words** : Parkinson's disease, Tyrosine hydroxylase, Regulatory domain, Phosphorylation, Cofactor, Expression

## 서 론

파킨슨병의 치료제는 L-dopa, 도파민 수용체 작용물질(agonist), 항콜린성 제제 등이 있으나, 한시적인 효과와 부작용으로 인하여 도파민을 생성할 수 있는 세포를 이용한 치료(cell therapy) 혹은 도파민의 생성을 유도할 수 있는 유전자치료(gene therapy)의 필요성이 대두되었다. 세포를 이용한 치료법 개발에 있어서 태아의 뇌조직을 환자의 뇌에 이식하는 방법(fetal tissue graft)을 가장 먼저 시도하였으며 그 효과 또한 상당히 장기간 지속되었으나 본 시술을 위해서는 8~12주 정도의 태아 10여 개체가 필요하여[1,2] 윤리적인 면에서나 실제적인 면에서 대단히 불합리한 방법이다. 한편 유전자를 이용한 치료법 개발에 이용된 유전자는 그 기능에 따라 크게 3가지로 나눌 수 있다. 이들은 첫째, 도파민성 세포의 생존에 관여하는 Brain derived neurotrophic factor (BDNF) 혹은 Glia derived neurotrophic factor (GDNF) 등의 신경영양인자이며 둘째, 도파민의 생성을 촉진할 수 있는 tyrosine hydroxylase (TH)와 aromatic amino acid decar-

Manuscript received February 3, 2001.
Accepted in final form July 21, 2001.
* Address for correspondence
Young-Jae Lee, Ph.D.
Neuroscience Research Institude, Gachon Medical School
Gilsang-myeon, Ganghwa-gun, Incheon, 417-840, Korea
Tel : +82-32-930-5045 Fax : +82-32-930-5007
E-mail : jlee@gachon.ac.kr

boxylase (AADC)를 들 수 있다. 또한 도파민성 세포의 사멸에 원인이 될 수 있는 발생기 산소(reactive oxygen species)를 해독하는 superoxide dismutase (SOD)가 세 번째에 해당한다. 이 중에서 가장 광범위하게 실험된 것은 TH이나 이의 효과 또한 만족할 만큼 장기간 지속되지는 못하였다. 이런 치료용 유전자의 발현을 장기화하여 실용화를 이루기 위해서는 이들 유전자를 옮기는데 쓰일 매개체(vector 혹은 liposome의 구성요소), 형질변환에 쓰일 세포의 특성 등이 깊이 있게 연구되어야 하겠지만 치료에 쓰일 유전자의 발현과 발현된 단백질의 안정성에 대한 연구가 우선되어야 할 것이다.

TH는 도파민성 세포에 대한 지표로 쓰일 수 있을 만큼 그 발현이 도파민성 세포에 제한되어 있으며 이의 활성과 안정성은 이의 조효소 tetrahydrobiopterin ($BH_4$)과 TH 조절부위의 인산화에 의해 조절된다. $BH_4$는 guanine triphosphate (GTP)를 선구물질로 사용하여 세 단계의 효소반응에 의해 만들어진다.[3,4] 이렇게 만들어진 $BH_4$는 phenyalanine hydroxylase, tyrosine hydroxylase, tryptophan hydroxylase, nitric oxide synthase 등의 효소에 조효소로 쓰일 뿐 아니라[5,6] PC12 cell과 murine erythroleukemia (MEL) 세포주에서는 세포분열 효과가 확인되었다.[4,7] 이와 같이 $BH_4$는 다양한 hydroxylase의 조효소로 쓰이며 이의 결핍은 dopa-responsive dystonia (DRD) 등의 증세를 일으키고[8,9,11] 또한 Shy-Drager 증후군, Alzheimer병 등[10] 신경계 질환에서도 $BH_4$의 농도가 정상인에 비해 낮다. 한편 GTP cyclohydrolase I (GTPCH I)의 활성이 약화된 쥐에서는 hyperphenylalaninemia (HPH)의 증세를 보였으며[12] TH와 tryptophan hydroxylase의 활성이 현저하게 낮아질 뿐 아니라 뇌에서 도파민, norepinephrine, serotonin등 catecholamine의 농도 또한 현저히 낮아지는 소견을 보였다.[13]

한편 TH의 조절부위에 위치한 4개의 serine/threonine은 아주 다양한 kinase에 의해 각기 다르게 인산화되고 또 그 다양한 kinase의 수만큼 인산화된 TH의 효소적 특성 또한 다양하다. 일반적으로 인정되는 이론은 본 단백질의 인산화 시 조효소 $BH_4$에 대한 결합상수($K_m$)는 줄어들고 catecholamine에 의한 억제상수($K_i$)는 증가하여 효소의 활성이 높아진다. 그러나 인산화로 인하여 활성이 높아진 TH는 protease의 표적이 되어 쉽게 분해되므로 안정성이 줄어들 수 있다.[14]

파킨슨병의 유전자치료에 있어서는 위에서 언급한 바와 같이 활성의 증가보다는 발현의 장기화 및 단백질의 안정화가 더 큰 과제로 인식되고 있다. 또한 본 질병의 증세는 흑질선조체(substantia nigra pars compacta)내의 도파민성 세포가 80% 이상 고사하여야 비로소 나타나므로 획기적인 TH활성의 증가보다는 꾸준한 도파민의 공급이 더 큰 치료 효과를 낳을 것으로 기대된다.

## 대상과 방법

### 1. TH의 조절부위에 인위적 변이(deletion)의 도입과 retroviral vector의 제작

조절부위에 인위적 변이를 가진 TH (dTH)는 이후의 subcloning을 용이하게 하기 위하여 PCR 증폭 시 Hind dIII 제한효소 자리를 삽입하였다. 각 serine/threonine까지 잘라지는 변이는 아래의 각 primer와 wTHxh (5' GCGCACCTCGAGGCGCAC 3')를 사용하여 PCR로 만들었다. Primer의 염기서열 중 Hind dIII와 initiation codon까지는 주형(template)과 수소결합을 이루지 못하므로 PCR의 처음 2~3 cycle은 낮은 온도(55 ℃)에서 annealing하여 PCR하고 나머지 25 cycle은 온도를 높여(63 ℃) 특이성을 높였다.

- Serine 19까지 잘라지는 변이

dTH19D; 5' ACAAGCTTGCCATGGAGCTG-GACGCCAAGCAGGCA 3'

- Serine 31까지 잘라지는 변이

dTH31D; 5' ACAAGCTTGCCATGCCGCGGT TCATTGGGCGCAGG 3'

위의 각 PCR에 의해 만들어진 PCR 산물은 pCR2.1 (Invitrogen, U. S. A.)에 subclone하고 염기서열을 확인한 후 Hin dIII로 잘라서 같은 효소로 처리된 pLNCX(retroviral vector)에 subclone하였다.

### 2. Transfection과 재조합 retrovirus의 생산

$5\times10^5$의 PA317 (virus producing cell line)은 6 cm 배양접시에 HAT 배양액으로 배양하다가 transfection 시 OPTI-MEM으로 갈아주었다. 12 μg의 DNA는 500 μℓ의 $CaCl_2$/HEPES (125 mM $CaCl_2$, 0.74 mM $Na_2HPO_4$, 140 mM NaCl, 25 mM HEPES) 용액에 부유하고 상온에서 30분 정도 두어 침전이 생기게 하였다. 이는 세포 위에 한 방울씩 떨어뜨려 전체를 덮은 후 다시 4시간 동안 37 ℃에서 배양하고 phosphate buffered saline (PBS)로 두 번 씻은 후 일반 배양액(HAT 배양액)으로 갈아주었다. 다음날 배양액을 일반 배양액으로 갈아주고 다시 하루 밤 지난 후 conditioned media는 0.45 ㎛ 여과지로 여과하여 불순물을 제거하고 -80 ℃에서 보관하였다.

### 3. 세포주의 유전자 변형(Virus 감염)

$1\times10^5$ 정도의 감염될 세포(NIH-3T3)는 하루 전에 10 cm 배양접시에 배양하고 다음날 viral conditioned media 1 ml와 polybrene (4 μg/ml)을 더하였다. 37 ℃ 배양기에서 밤새 감염시킨 후 viral media는 버리고 PBS로 씻었다. 감염된 세포는 하루 더 배양한 후 선택배양액(400 μg/ml G418 혹은 200 μg/ml hygromycin B)로 교환하였다. 이때 virus에 감염되지 않은 NIH-3T3에도 같은 선택배양액을 넣고 세포가 완전히 다 죽은 후 감염된 세포에 대한 선택을 끝내고 세포를 증식하였다. 선택동안 배양액은 1주일에 2번씩 갈아주었다.

#### 4. 세포주의 확립

GC/ΔgHC를 이용하여 만든 재조합 retrovirus는 NIH-3T3에 감염시키고 hygromycin B로 selection 하고 single colony를 골라내었다. TH를 발현하는 세포주는 TH/pLNCX를 이용하여 만든 재조합 retrovirus를 이용하였고 G-418로 선택한 후 생겨난 colony를 모두 합하였다(bulk selection). 한편 GTPCH I과 TH를 이중 발현하는 세포주는 GTPCH I을 발현하는 세포주에 다시 TH 재조합 retrovirus로 감염하고 hygromycin B와 G-418로 중복 선택한 후 생겨난 colony를 모두 합하였다.

#### 5. 단백질 발현의 측정(Western blot analysis)

세포는 trypsin으로 수거하여 hemacytometer로 세포의 수를 세고 $1\times10^6$ 세포당 100 μl의 SDS lysis buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol, 5% βmercaptoethanol, 2.3% sodium dodecyl sulfate (SDS)로 용해하고 10초간 sonication하였다. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)는 10%, stacking gel은 pH 6.8, running gel은 pH 8.8로 하였다. Polymerize된 gel에 5분간 끓인 시료는 20 μl($2\times10^5$ cell에 해당)를 load한 후 glycine running buffer (200 mM glycine, 30 mM Tris-B, pH 8.3, 1% SDS)에서 120 V, 18 mA로 3~4시간 영동하였다. 영동이 끝난 gel은 Towbin's buffer (192 mM glycine, 25 mM Tris, pH 8.3, 0.1% SDS, 10% methanol)에서 1000 mA로 1시간 동안 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane으로 옮겼다. 단백질이 옮겨진 membrane은 5% skim milk/TBST (10 mM Tris, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Triton)에서 한 시간 이상 block하고 1:1000으로 희석시킨 1차 항체(Rabbit anti-TH, 자가제조)로 다시 한 시간 동안 처리하였다. Membrane은 TBST에서 4번(5분, 5분, 15분, 15분) 이상 씻은 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체(HRP-conjugated donkey anti-rabbit, 1:2000, Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.)로 다시 한 시간 처리하고 위와 같은 방법으로 4번 이상 씻었다. 다 씻은 membrane은 ECL (Amersham Pharmacia Biotech, U.S.A.) kit로 발색하고 X-ray film에 노출하였다.

#### 6. RNA 분리와 Northern blot analysis

RNA 분리 시에는 배양된 세포를 PBS로 씻어내고 10 cm 배양접시 당 1 ml의 Zol B (Gibco BRL, U. S. A.)용액을 넣어 세포를 용해하였다. 용해된 시료는 원심분리관에 모으고 100 μl의 chloroform을 섞어 vortex하여 lipid를 녹여내고 원심분리하여 맑은 상층액은 새 원심관에 옮겨 담았다. 같은 분량의 isopropanol을 첨가하고 -80 ℃에 1시간 동안 냉동시킨 후 4 ℃, 12,000 xg에서 5분간 원심분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA는 70% 알코올로 씻어낸 후 상온에서 말리고 20 μl의 diethyl pyrocarbonate (DEPC)로 처리된 물에 부유한 후 optical density를 재어 전체 수거양을 측정하였다. 분리된 RNA는 1%의 formaldehyde gel에서 전기영동하고 영동이 끝난 gel은 DEPC로 처리된 물에서 20분간 두 번씩 씻어 formaldehyde를 제거하고 7.5 mM NaOH에서 nylon membrane으로 옮겼다. 옮겨진 시료는 2X sodium chloride, sodium citrate (SSC), 0.1% SDS 용액에서 가볍게 씻고 상온에서 말렸다. Nylon membrane은 UV로 RNA를 cross link 하고 25 ng의 탐식자 DNA (Xho I-Bst XI fragment, 1.3 kb)는 50 μCi의 [$\alpha^{32}$P]dCTP를 이용하여 random priming법(Random primed DNA labeling kit, Boehringer Mannheim)으로 표지하였다. 방사능으로 표지된 탐식자는 1~5×$10^6$ cpm/ml의 농도로 5X SSC, 2X Denhardt's, 100 μg/ml carrier DNA, 0.2% SDS, 5% Dextran sulfate에 섞고 42 ℃에서 16시간 이상 hybridization하였다. Hybridization이 끝난 membrane은 2X SSC, 0.2X SSC/0.1% SDS에서 씻은 후 말리고 X-ray film에 노출하였다.

Tissue culture, recombinant DNA technology 등 일반적으로 흔히 쓰이는 방법은 Molecular Cloning, 2nd ed.[15]과 Cells[16]에 준하여 행하였다.

## 결 과

조절부위에 위치한 serine은 이의 인산화에 따라 TH의 활성은 2배 정도 향상될 수 있으나 인산화된 단백질은 protease에 의해 쉽게 분해된다.[14] 즉 TH의 조절부위의 인산화가 불가능해지면 본 단백질의 안정성을 기대할 수 있을 것이다. 본 가설을 증명하기 위하여 본 연구에서는 PCR 방법을 이용하여 TH의 amino acid #2-#19까지 삭제된 TH(d19TH)와 #2-#31까지 삭제된 TH (d31TH)를 만들었

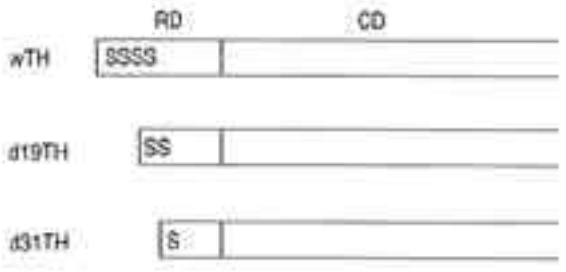


**Figure 1.** Schematic diagrams of wTH, d19TH, and d31TH. PCR amplification is used to remove the phosphorylation site from the regulatory domain of TH. Four S denote for serine #8, 19, 31, and 40, respectively. Amino acids #2~#19 covering serine #8 and serine #19 are deleted in d19TH and #2~#31 covering serines at #8, #19, and #31 were deleted in d31TH. RD; regulatory domain of TH protein, CD; catalytic domain of TH protein, TH; tyrosine hydroxylase, wTH; wild type TH, d19TH; TH with amino acids #2-#19 are deleted, d31TH; TH with amino acids #2-#31 are deleted.

다. 즉 d19TH에서는 본 단백질의 효소적 특성과 연관된 serine 중 #8과 #19가 제거되었고 d31TH에서는 #8, #19와 #31이 제거되었다. d19TH와 d31TH에서 Hind Ⅲ-Xho I 조각은 pLNCX에 clone되어 있는 wild type TH(wTH/pLNCX)의 Hind Ⅲ-Xho I 조각과 바꾸어 subclone하고 성공적으로 결찰된 것은 d19TH/pLNCX 혹은 d31TH/pLNCX라 명명하였다. 이를 이용하여 만든 재조합 retrovirus는 섬유아세포 NIH-3T3에 감염시켜서 두번째와 세번째 세포주 d19THN과 d31THN을 확립하였다(Fig. 1).

어떤 한 시점(steady state)에서 발현되는 총 단백질의 양은 단백질과 이에 해당하는 RNA의 발현과 분해가 평형상태에 있다고 할 수 있다. 위의 세포주에서 조효소 혹은 조절부위의 변이가 평형상태의 총 단백질 발현의 양에 미치는 영향은 western blot analysis로 확인하였다. 같은 조건에서 배양된 같은 수의 세포는 10% PAGE에서 분리하고 항-TH 항체로 확인한 결과 조효소는 단클론성 세포에서 확인한 바와 같이17 TH단백질의 발현을 약 10배 증가시켰다(Fig. 2A). 한편 조절부위의 deletion은 deletion의 크기에 따라 TH의 발현이 다르게 나타났으며 d19THN의 경우 wTHN에 비해 68.6배, d31THN는 17.5배의 많은 TH를 발현하고 있었다(Fig. 2B). 또한 d19TH와 d31TH는 deletion의 크기에 따라 wild type TH보다

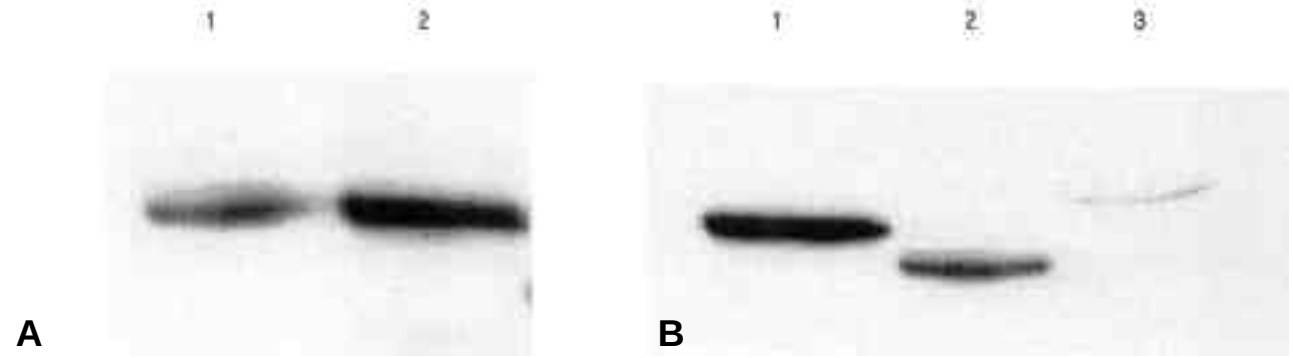


**Figure 2.** The effect of cofactor and deletions on the expression level of TH proteins. **A.** Protein samples equivalent to $2\times10^5$ cells are loaded in each lanes, separated on 10% PAGE, transferred to PVDF membrane, and blotted with αTH antisera (1:1000). Lane 1 contains samples from wTHN and lane 2 from wTHGCN. **B.** Same as in panel A except that samples are from $5\times10^5$ cells of d19THN (lane 1), d31THN (lane 2), and wTHN (lane 3). TH; tyrosine hydroxylase, PAGE; polyacrylamide gel electrophoresis, PVDF; polyvinylidene difluride, wTHN; NIH-3T3 cells expressing wild type TH, wTHGCN; NIH-3T3 cells expressing both wild type TH and GTPCH I, d19THN; NIH-3T3 cells expressing d19TH, d31THN; NIH-3T3 cells expressing d31TH

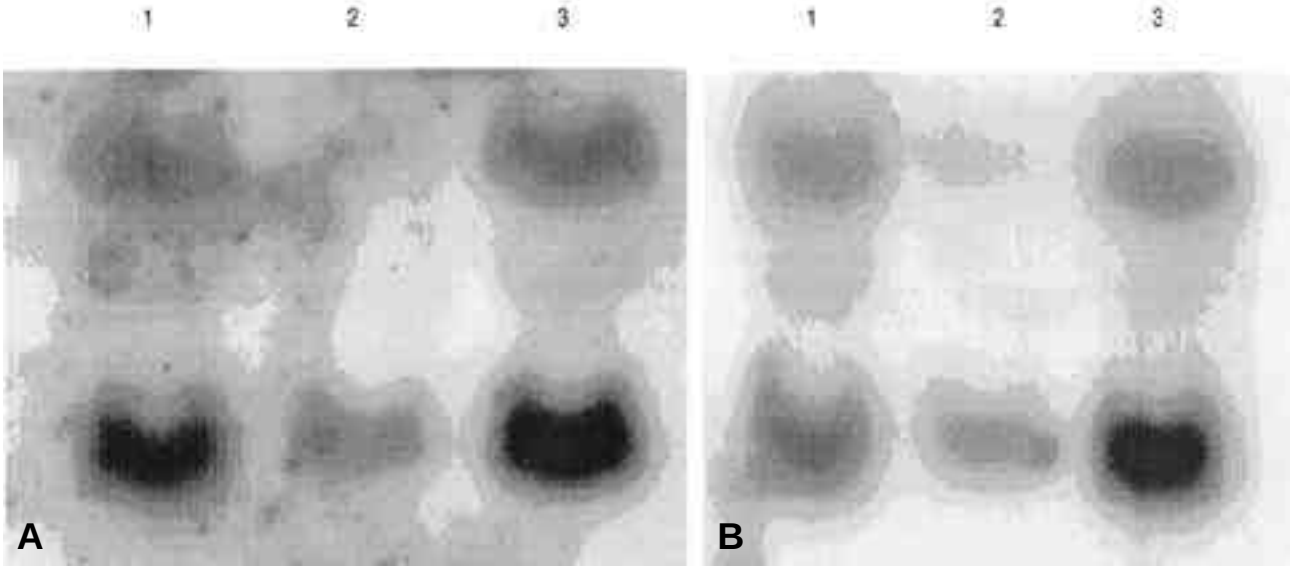


**Figure 3.** The effect of cofactor and deletions on the expression level of TH mRNA. **A.** To determine the steady state expression levels of TH mRNA 20 μg of total RNA isolated from d19THN (lane 1), wTHN (lane 2), wTHGCN (lane 3) are separated on 1% agarose gel and probed with $^{32}$P-dCTP labelled full length TH cDNA after transfer to Nylon. **B.** Same as above except that the lane 1 contains RNA isolated from d31THN. TH: tyrosine hydroxylase, wTHN; NIH-3T3 cells expressing wild type TH, wTHGCN; NIH-3T3 cells expressing both wild type TH and GTPCH I, d19THN; NIH-3T3 cells expressing d19TH, d31THN; NIH-3T3 cells expressing d31TH

PAGE상에서 더 빨리 migration함을 확인할 수 있었다.

세 가지 세포주 d19THN, d31THN과 wTHGCN에서 TH mRNA의 발현율은 Northern blot analysis로 확인하였다. 이들 세 가지 세포주는 같은 조건에서 배양된 wTHN 세포주에 비해 d19THN은 4.6배(Fig. 3A), d31THN은 1.8배의 TH mRNA를 발현하고 있었으며(Fig. 3B) TH의 조효소를 가진 wTHGCN은 wTHN에 비해 4.9~6.8배의 TH mRNA를 발현하고 있다(Fig. 3). 이들의 발현 정도는 densitometric reading으로 확인하였으며 Table 2에 정리하였다.

## 고 찰

파킨슨병에 대한 유전자치료는 TH뿐만 아니라 BDNF,[18] GDNF,[19-21] fetal tissue[1,2,22] 등을 이용하여 다양한 각도에서 시도되었으나 크게 성공적이지 못하였으며 최근에는 TH와 GTPCH I을 함께 이용하여 TH의 발현 혹은 안정성을 향상시키고자 하는 노력이 있었다.[23] 그러나 신경영양인자 혹은 TH를 이용한 유전자치료법에서 TH의 발현은 실험동물의 행동에서 확실한 효과가 확인되었으나 그 효과는 기대만큼 장기간 지속되지는 못하였다.

본 연구에서는 평형상태에서 조효소 $BH_4$가 TH 단백질의 발현에 미치는 영향을 연구하였다. TH의 조효소 $BH_4$는 GTP를 선구물질로 사용하여 세 번의 효소반응을 통하여 $BH_4$를 생합성 한다.[10] 본 연구에 사용한 NIH-3T3에서는 GTPCH I의 발현만 유도함으로써 $BH_4$를 생합성 할 수 있는데 이는 GTPCH I 외에 $BH_4$의 생합성에 필요한 다른 효소는 항시 발현하고 있기 때문이다.[12] $BH_4$가 TH의 발현에 미치는 영향은 wTHN과 wTHGCN에서 TH 단백질의 발현을 확인함으로써 유추할 수 있다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 GTPCH I 유전자에 의한 충분한 BH4의 공급은 TH 단백질의 발현을 10배, TH mRNA의 발현을 4.9~6.8배 증가시킨다. 본 세포주의 유일한 차이점은 GTPCH I의 유무이므로 본 발현의 차이는 $BH_4$에 의한 것이라고 할 수 있다. 본 결과에서 mRNA의 발현의 증가에 대한 정확한 이유는 알 수 없으나 단백질 발현의 증가는 조효소 $BH_4$가 TH 활성의 조절 외에도 TH의 특이적 phosphatase를 활성화 시켜서 TH를 탈 인산화함으로써 protease의 공격을 피할 수 있고 또한 mRNA의 증가로 translation이 증가되었기 때문일 것이다.

위에서 언급한 바와 같이 TH의 인산화는 활성화 후 protease에 의한 분해, TH 단백질 양의 감소, 도파민 생성의 억제 등으로 이어져 전체 도파민의 양을 줄임으로써 자가산화로 인한 신경세포에 대한 손상을 줄이는 자가보호 기전으로 작용한다고 할 수 있다.[14] 그러므로 TH 단백질의 안정성 측면에서는 TH의 인산화 자리의 제거는 TH 단백질의 안정성에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 기대된다. 이런 가설에 근거하여 TH의 인산화를 방지하고 TH의 안정성을 높이기 위해 wild type TH의 조절부위에서 serine을 포함한 18개(amino acid #2-#19까지, d19TH) 혹은 30개(amino acid #2-#31까지, d31TH)의 아미노산을 삭제하였다. d19TH를 발현하는 NIH-3T3 (d19THN)는 세포의 배양조건에 따라 다소간의 차이는 있었지만 wTHN에 비해 약 68.6배 많은 TH 단백질을 발현하고 있었고 d19TH mRNA는 wTH mRNA에 비해 4.6배 높은 발현을 보이고 있었다. 앞의 실험에서 wTHGCN은 wTHN보다 약 10배 높은 TH 단백질 발현을 보이고 있었으므로 이와 비교할 때 d19TH는 wTHGC 보다도 약 7배정도 높은 TH 단백질의 발현을 보이고 있다. 본 결과에 국한하여 생각할 때 조절부위의 변이는 transcription 혹은 mRNA의 안정성 보다 단백질의 안정성 혹은 translation의 정도에 더 많은 영향을 미친다고 볼 수 있겠다. 이는 위의 wTH와 wTHGC의 비교에서 조효소 BH4를 첨가함으로써 TH mRNA와 단백질이 4.9~6.8배 TH 단백질은 10배 증가한데 반해 조절부위의 인산화 부위의 변이는 단백질의 안정성 혹은 translation에 더 많은 영향을 미치는 것으로 생각된다. 본 결론은 d31TH에도 그대로 적용되어서 d31TH 단백질은 wTH 단백질에 비해 17.5배의 높은 발현율을 보이고 있지만 d31TH mRNA는 wTH mRNA에 비해 1.8배의 발현율을 보이고 있어서 조절부위의 인산화 자리의 삭제는 TH의 RNA보다 단백질의 발현 혹은 안정성에 더 큰 영향을 주고 있다. 한편 d19TH 단백질은 d31TH 단백질에 비

**Table 1.** Comparison of expression level of TH protein with deletions on the regulatory domain.

| Cell line | Ratio to wild type TH |
|---|---|
| d19THN | 68.6 |
| d31THN | 17.5 |
| wTHN | 1.0 |

d19THN; NIH-3T3 cells expressing d19TH
wTHN; NIH-3T3 cells expressing wild type TH
wTHGCN; NIH-3T3 cells expressing both wild type TH and GTPCH I

**Table 2.** The relative expression levels of TH mRNA with cofactor or deletions on the regulatory domain.

| | Cell line | Ratio to wild type TH | | Cell line | Ratio to wild type TH |
|---|---|---|---|---|---|
| | d19THN | 4.6 | | d31THN | 1.8 |
| | wTHN | 1.0 | | wTHN | 1.0 |
| **A** | wTHGCN | 6.8 | **B** | wTHGCN | 4.9 |

d19THN; NIH-3T3 cells expressing d19TH
wTHN; NIH-3T3 cells expressing wild type TH
wTHGCN; NIH-3T3 cells expressing both wild type TH and GTPCH I

d31THN; NIH-3T3 cells expressing d31TH
wTHN; NIH-3T3 cells expressing wild type TH
wTHGCN; NIH-3T3 cells expressing both wild type TH and GTPCH I

해 3.9배의 높은 발현율을 보이고 있다. 이는 아미노산 #2~#19 혹은 이의 인산화가 본 단백질의 분해에 깊은 관계가 있음을 시사하고 이에 반해 아미노산 #20~#31은 본 단백질의 안정성 혹은 translation의 향상에 긍정적인 요소를 포함하고 있으며 이의 영향력은 아미노산 #2~#19에 비해 다소 약한 것으로 유추해 볼 수 있겠다. 그러나 ser #19 혹은 ser #31의 인산화가 본 단백질의 발현 혹은 안정성에 미치는 영향에 대한 명쾌한 해답은 본 인산화 자리에 대한 site directed mutagenesis 등을 통한 연구를 비롯한 보다 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과는 TH의 조절부위에 약간의 인위적인 돌연변이를 가함으로써 TH의 steady state에서 발현율을 현저히 증가시켰으므로 이는 TH를 이용한 파킨슨병의 유전자치료를 위해서는 대단히 유리한 조건으로 생각된다.

## REFERENCES


1. Brundin P, Nilsson OG, Lindvall O, Astedt B, Bjorklund A. Behavioral effects of human fetal dopamine neurons grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Exp Brain Res* 1986;65:235-240.
2. Bjorklund A: Better cells for brain repair. *Nature* 1993; 362:414-415.
3. Nichol CA, Smith GK, Duch DS. Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin. *Ann Rev Biochem* 1985;54:729-764.
4. Li XM, Juorio AV, Boulto AA. Reduction in glial fibrillary acidic protein mRNA abundance induced by (-)-deprenyl and other monoamine oxidase B inhibitors in C6 glioma cells. *Neurochem Res* 1993;18:915-919.
5. Nelson TJ, Kaufman S. Activation of rat caudate tyrosine hydroxylase phosphatase by tetrahydropterins. *J Biol Chem* 1987;262:16470-14675.
6. Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ. Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J Biol Chem* 1989;264:20496-20501.
7. Anastasiadis PZ, States JC. Imerman BA, Louie MC, Kuhn DM, Levine RA. Mitogenic effects of tetrahydrobiopterin in PC12 cells. *Mol Pharmacology* 1996;49:149-155.
8. Ichinos H, Ohye T, Takahashi E, Seki N, Hori T, Segawa M, Nomura Y, Endo K, Tanaka H, Tsuji S, Fujita K, Nagatsu T. Hereditary progressive dystonia with marked diurnal fluctuation caused by mutations in the GYP cyclohydrolase I gene. *Nature Genetics* 1994;8:236-242.
9. Fukuwara Y, Shimadzu M, Rajput AH, Shimizu Y, Tagawa T, Mori H, Yokochi M, Narabayashi H, Hornykiewicz O, Mizuno Y, Kish S. GTP-cyclohydrolase I gene mutations in hereditary progressive and dopareponsive dystonia. *Ann Neurol* 1996;39:609-617.
10. Williams AC, Levine RA, Chase JN, Lovenberg W, Calne DB. CSF hydroxylase cofactor levels in some neurological diseases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1980;43:735-738.
11. LeWitt PA, Miller LP, Levine RA, Lovenberg W, Newman RP, Papavasiliou A, Rayes A, Eldridge R, Burns RS. Tetrahydrobiopterin in dystonia: identification of abnormal metbolism and therapeutic trials. *Neurology* 1986;36:760-764.
12. McDonald JD. The PKU mouse project: its history, potential and implications. *Acta Paediatr* 1994;407:122-123.
13. Hyland K, Gunasekera RS, Engle T, Arnold LA. Tetrahydrobiopterin and biogenic amine metabolism in the hph-1 mouse. *Neurochem* 1996;67:752-759.
14. Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 1996;67:443-462.
15. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Press. 1989.
16. Spector DL, Goldman RD, Leinwand, LA. Cells, *A labo - ratory manual*. Cold Spring Harbor Press. 1998.
17. Lee YJ, Han IS, Yi SD, The effect of GTP cyclohydrolase I on the activity and expression of tyrosine hydroxylase and cell growth. *J Korean Neurol Assoc* 1999;17:122-130.
18. Yoshimoto Y, Lin Q, Collier TJ, Frim DM, Breakefield XO, Bohn MC: Astrocytes retrovirally transduced with BDNF elicit behavioral improvement in a rat model of Parkinson's disease. *Brain Res* 1995;691:25-36.
19. Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang Y-N, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC: Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 1997;275:838-841.
20. Mandel RJ, Spratt SK, Snyder RO, and Leff SE: Midbrain injection of recombinant adeno-associated virus encoding rat glial cell line-derived neurotrophic factor protects nigral neurons in a progressive 6-hydroxydopamine-induced degeneration model of Parkinson's disease in rats. *Proc Natl Acad Sci* 1997;94:14083-14088.
21. Cheng FC, Ni DR, Wu MC, Kuo JS, Chia LG: Glial cell line-derived neurotrophic factor protects against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced neurotoxicity in C57BL/6 mice. *Neurosci Lett* 1998;252:87-90.
22. Hauser RA, Freeman TB, Snow BJ, Nauert M, Gauger L, Kordower JH, Olanow CW: Long-term evaluation of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson disease. *Arch Neurol* 1999;56:179-187.
23. Bencsics C, Wachtel SR, Milstein S, Hatakeyama K, Becker JB, Kang UJ. Double transduction with GTP cyclohydrolase I and tyrosine hydroxylase is necessary for spontaneous synthesis of L-dopa by primary fibroblasts. *J Neurosci* 1966;16;4449-4456.