

Tyrosine Hydroxylase 조절부위의 인위적 변이가 단백질의 안정성과 효소적 특성에 미치는 영향

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

유영수 이상도 임정근 김용식* 남은주* 주완석* 이 언† 이영재†

Effects of Deletions in the Regulatory Domain on the Stability and Enzymatic Characteristics of Tyrosine Hydroxylase

Young-Soo Yoo, M.D., Sang-Doe Yi, M.D., Jung-Kun Lim, M.D., Yong-Sik Kim, M.D.*, Eun-Joo Nam, M.S.*, Wan-Suk Joo, Ph.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 : Various vectors have been developed and tried for the delivery of tyrosine hydroxylase (TH) in order to supplement dopamine, which is severely deficient in Parkinson's disease, however, none of the protocols tried have yielded fruitful results that can be applied directly to humans. One of the problems revealed from previous trials was a short duration of expression of the delivered gene, that is, tyrosine hydroxylase. **Methods** : To extend the stability and to improve the enzymatic characteristics of the protein, part of the regulatory domain was deleted via PCR technique. The cDNA for regulatory domain-deleted THs (dTH) were sub-cloned into a retroviral vector and the resulting recombinant retrovirus was used to infect NIH-3T3. After selection, expression levels of TH were determined by Western blot analysis and the enzymatic characteristics were examined. **Results** : The deletion increased steady state expression level of TH protein by 7-fold for d19TH (TH with amino acids #2-19 are deleted) and 3-fold for d31TH (TH with amino acids #2-31 are deleted). The elevated expression level of d19TH is likely due to the enhanced stability of the protein as determined by a treatment of cycloheximide. The activity of d19TH was also increased approximately by 3-fold but no increase of the L-dopa production was observed. However, the production of L-dopa was dramatically increased when GTP cyclohydrolase I (GTPCH I) was co-transfected suggesting that the activity of d19TH is dependent on the presence of cofactor. d19TH seem to be free of feedback inhibition at low concentration of dopamine (10 nM~1 µM) but more sensitive to the inhibition at high concentration of dopamine (10 mM). **Conclusions** : The deletion of 18 amino acids on the regulatory domain increases the stability of the protein, reduces the activity, and frees it from the feedback inhibition by the end product.

J Korean Neurol Assoc 20(1):60~66, 2002

Key Words : Parkinson's disease, Tyrosine hydroxylase, Regulatory domain, Stability, L-dopa production, Feedback inhibition.

서 론

파킨슨병(PD)은 50대 이후에 발병하여 점차 진행되는 퇴행성 신경질환으로서, 진전(resting tremor), 경직(rigidity), 운동완서(bradykinesia) 등이 대표적인 증상이나 이

외에도 보폭이 좁고 끄는 듯한 걸음걸이, 높낮이가 없는 음성, 무표정 등의 증상을 나타낸다.¹ 이 질병은 중뇌 내의 흑질(substantia nigra pars compacta, SNc)에 위치한 도파민성 신경세포(dopaminergic neuron)의 점진적인 퇴화로 인하여 발병한다. 이러한 퇴화는 SNc에서 신경섬유를 투사하고 있는 선조체(striatum)에서 신경전달체인 도파민의 결핍을 초래한다. 이런 병원적인 퇴화는 선조체 부위에서 도파민의 감소의 직접적인 원인이 되며 도파민의 감소가 80% 이상에 달할 경우 PD의 병세를 나타내며 일반인에서도 80세에 이르러서는 약 50% 정도의 감소를 보이지만

Manuscript received August 29, 2001.

Accepted in final form November 22, 2001.

* Address for correspondence

Young-Jae Lee, Ph.D.

Neuroscience Research Institute, Gachon Medical School

Gilsang-myun, Gangwha-gun, Incheon, 417-840, Korea

Tel : +82-32-930-5045 Fax : +82-32-930-5007

E-mail : jlee@gachon.ac.kr

이 경우 병세는 나타나지 않는다.²

파킨슨병의 치료는 약물 치료 외에 수술, 조직 이식 등이 시도되고 있다. 이식 조직으로는 태아의 중뇌조직(fetal mesencephalic tissue),^{3,4} 경동맥소체(carotid body),⁵ microcarrier에 쌓인 부신피질(adrenal medulla) 조직⁶ 외에도 도파민을 생산하도록 유전적 변형이 된 세포 등이 이용된다. 그러나 이들은 실용성, 윤리적인 문제 혹은 도파민 생성의 한시성 등의 문제점들을 갖고 있어서 이를 해결하기 위하여서는 많은 연구를 필요로 하고있다. Tyrosine hydroxylase (TH)를 이용한 유전자 변형세포의 이식법 역시 TH 발현이 한시성인 문제가 있다.

도파민의 합성은 주로 중뇌에서 일어나며 catecholamine 생합성의 첫 단계는 tyrosine hydroxylase (tyrosine 3-monooxygenase, EC 1.14.16.2)에 의한 tyrosine의 수산화이다. 그 산물(L-dopa, L-3,4-dihydroxyphenylalanine)은 다시 aromatic amino acid decarboxylase (AADC)에 의해 도파민으로 전환되어 norepinephrine과 epinephrine 등의 합성에 선구물질로 작용한다.⁷ 이 생합성 과정에서 TH는 가장 첫 번째 효소이며 철분과 조효소(tetrahydrobiopterin, BH₄)를 필요로 하고 tyrosine, L-dopa, catecholamine, 인산화 등에 의해 대단히 엄격하게 조절된다.⁸

TH는 N-terminal의 조절부위와 C-terminal 쪽의 효소 부위로 이루어져 있으며 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 상에서 약 60 kD로 나타난다. 이의 조절부위에는 네 개의 serine/threonine (amino acid # 8, 19, 31, 40)이 있고 이들은 각기 다른 kinase에 의해 인산화된다.^{8,9} Ser8은 cell cycle dependent kinase (cdc2/cyclinA)에 의해 인산화되고 이것은 TH 활성과는 무관한 것으로 생각되고있다.¹⁰ 한편 Ser19는 calmodulin-dependent protein kinase II (CaM-PKII)¹¹ 혹은 MAP-kinase activated protein kinase (MAPKAP kinase)에 의해 인산화되지만¹² 이의 역할 또한 정확히 알려져 있지 않다. Ser31은 protein kinase C (PKC)와 mitogen-activated protein kinase (MAP kinase 1)와 MAP kinase 2¹³에 의해 인산화될 수 있으며 Haycock¹⁴과 Mitchell 등¹⁵은 PC12 cell에서 PKC의 활성제인 phorbol ester에 의해 Ser31이 인산화되고 이로 인하여 그 활성이 2배정도 증가된다고 발표하였다.¹⁶ 이와 같이 phorbol ester에 의한 PKC의 활성화, 이에 의한 TH의 인산화, PKC에 의한 MAP kinase의 활성화 등은 TH의 활성이 다른 신호전달체계와 “cross-talk”에도 관여할지 모른다는 가능성을 시사한다. Ser40은 다양한 kinase (PKA, PKC, CaM-PKII)에 의해 인산화될 수 있으며 그 다양한 kinase의 수만큼 이의 조절도 복잡하게 이루어진다. 일반적으로 protein kinase A (PKA)에 의한 Ser40의 인산화는 조효소(BH₄)에 대한 미카엘리스 상수(K_m)을 줄이고 도파민 등 catecholamine에 대한 억제상수(K_i)를 높여서 전체적인 효소의 활성을 높이는 것으로 알려져 있다.^{17,18} 그러나 TH를 PKC나 CaM-PKII로

인산화하였을 때는 위의 결과와 다르게 나타나고 있다.¹⁹

인산화된 TH는 쉽게 protease의 표적이 되어 분해된다.²⁰ 이는 필요 이상의 도파민 생성을 억제하여 도파민이 자가산화 됨으로 일어나는 신경세포에 대한 손상을 줄일 수 있도록 하기 위함이다.²¹ 조효소 BH₄는 TH 특이성 phosphatase를 활성화시켜 TH를 탈 인산화하고 protease의 공격을 피할 수 있도록 하여 단백질의 안정성을 증가시킬 수 있다.^{20,21} 즉 TH의 serine에 첨가된 인산기는 protease의 표적이 될 수 있다는 점이다. 본 연구에서는 TH 단백질의 비 인산화가 본 단백질의 안정성을 향상시킬 수 있는지를 확인하기 위하여 조절부위의 인산화 자리를 삭제하고 steady state에서 이들의 발현정도, 활성 및 L-dopa의 생성을 비교하였다. 또한 cycloheximide를 처리한 세포에서 일정시간 후 잔여 단백질의 양을 확인함으로써 인산화 자리의 삭제가 단백질의 안정성에 미치는 영향을 조사하고 end product 인 도파민에 의한 feedback inhibition 여부를 조사하였다.

대상과 방법

1. TH의 조절부위에 인위적 변이의 도입과 retroviral vector의 제작

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

- Serine 19 까지 잘라지는 변이

dTH19D; 5' ACAAGCTTGCCATGGAGCTG-GACGCCAAGCAGGCA 3'

- Serine 31 까지 잘라지는 변이

dTH31D; 5' ACAAGCTTGCCATGCCGCGGTT CATTTGGGCGCAGG 3'

위의 각 PCR에 의해 만들어진 PCR 산물은 pCR2.1 (Invitrogen)에 subclone하고 염기서열을 확인한 후 Hind III로 잘라서 같은 효소로 처리된 pLNCX (retroviral vector)에 subclone한다. 본 실험에서 wTH는 wild type TH를 나타내며 PCR에 의해 serine 19까지 잘라진 돌연변이 TH는 d19TH로 serine 31까지 잘라진 돌연변이 TH는 d31TH로 명명하였다.

2. Transfection과 재조합 retrovirus의 생산

5×10⁵의 PA317 (virus producing cell line)은 6 cm 배양접시에 HAT 배양액으로 배양하다가 transfection 시 OPTI-MEM으로 갈아준다. 12 μg의 DNA는 500 μl의 CaCl₂/HEPES (125 mM CaCl₂, 0.74 mM Na₂HPO₄,

140 mM NaCl, 25 mM HEPES) 용액에 부유하고 상온에서 30분 정도 두어 침전이 생기게 한다. 이는 세포 위에 한 방울씩 떨어뜨려 전체를 덮은 후 다시 4시간 동안 37°C에서 배양하고 PBS로 두 번 씻은 후 일반 배양액(HAT 배양액)으로 갈아준다. 다음날 배양액을 일반 배양액으로 갈아주고 다시 하루 밤 지난 후 viral conditioned media는 0.45 μ m로 여과하여 불순물을 제거하고 -80°C에서 보관한다.

3. 세포주의 유전자 변형(Virus 감염)

1×10^5 의 감염될 세포(NIH-3T3)는 하루 전에 10 cm 배양접시에 배양하고 다음날 viral conditioned media 1 ml와 polybrene(4 μ g/ml)를 더한다. 37°C 배양기에서 밤새 감염시킨 후 viral media는 버리고 PBS로 씻는다. 감염된 세포는 하루 더 배양한 후 TH 재조합 virus로 감염된 경우 400 μ g/ml G418을 GTPCH I 재조합 virus로 감염된 경우는 200 μ g/ml hygromycin B를 포함한 선택 배양액(selection media)으로 교환한다. 한편 각종 TH와 GTPCH I을 이중발현하는 세포주 wTHGCN, d19THGCN, d31THGCN의 경우 이들 두 가지 항생제를 모두 포함한 배양액을 사용한다. 선택 동안 배양액은 1주일에 2번씩 갈아준다.

4. 단백질 발현의 측정(Western blot analysis)

세포는 trypsin으로 처리한 후 수거하여 hemacytometer로 세포의 수를 세고 1×10^6 세포당 100 μ l의 SDS lysis buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8, 10% glycerol, 5% β mercaptoethanol, 2.3% SDS)로 용해하고 10초간 sonication한다. SDS-PAGE는 10%, stacking gel은 pH 6.8, running gel은 pH 8.8로 한다. Polymerized gel에 250 μ g의 total protein에 해당하는 시료를 load한 후 glycine running buffer (200 mM glycine, 30 mM Tris-B, pH 8.3, 1% SDS)에서 120V, 18 mA로 3~4시간 영동한다. 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 옮긴다. 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(anti-TH, 자가제조)로 다시 한 시간 동안 처리한다. Membrane은 TBST에서 4번 (5분, 5분, 15분, 15분) 이상 씻은 후 horseradish peroxidase (HRP)가 결합된 2차 항체(Goat anti-rabbit, 1:2000, Amersham)로 다시 한 시간 처리하고 위와 같은 방법으로 4번 이상 씻는다. 다 씻은 membrane은 ECL kit (Amersham)로 발색하고 X-ray film에 노출한다.

5. TH의 활성 측정

시료는 5×10^6 의 세포를 300 μ l의 lysis buffer (10 mM potassium phosphate, pH 6.2, 0.2% Triton-

X100)로 lyse하고 10초간 sonicate한다. 12,0000 xg로 4°C에서 15분간 원심분리한 후 상층액만 떠내어 측정기에 사용한다. 측정의 균일성을 도모하기 위해 각 시료는 bovine serum albumine (BSA) standard를 기준으로 각 시료 당 단백질 양을 Bio-Rad protein assay kit (BIO RAD)를 사용하여 측정하여 표준화시킨다. 활성의 측정을 위해서는 먼저 반응당 5 μ l의 L-[3,5- 3 H] tyrosine을 질소가스 아래서 30분간 말린다. 건조된 radioactive tyrosine은 반응 당 50 μ l의 반응액에 부유한다. 반응액은 5 mM DTT, 1 mM D,L-6-methyl-5,6,7,8-tetrahydropterin (6-MPH4), 165 μ M tyrosine, 50 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid, 3,000 units/ml catalase로 제조한다. 반응은 50 μ l의 단백질 시료와 50 μ l의 반응액을 섞어 37°C에서 20분간 반응시키고 1N HCl로 만든 7.5% charcoal suspension 1 ml를 섞어서 반응을 중단시킨다. Reaction/charcoal mixture는 vortex한 후 원심분리하여 hydroxylation에 의해 유리된 3 H와 tyrosine을 분리한다. 이때 tyrosine은 charcoal과 단단히 결합하여 침전물에 남게되고 유리된 3 H는 상층액에 떠 있게 된다. 각 tube에서 일정 양(500 μ l 정도)의 상층액을 떠내어 scintillation counting fluid와 섞어 방사능을 측정한다. Feedback inhibition 여부는 활성측정 전에 도파민을 첨가하고 상온에서 10분간 incubation 한 후 활성을 측정한다.

6. L-dopa의 측정

배양접시에 자란 세포는 25 mM HEPES, 100 mM EDTA가 첨가된 Earl's balanced salt solution (EBSS)으로 37°C에서 30분간 extract 한다. 용액과 cell은 따로 harvest 하고 0.4 M perchloric acid/0.1 mM EDTA되게 한 후 -80°C에서 보관한다. Alumina extraction시에는 위의 용액 300 μ l에 20 mg의 alumina와 315 μ l의 Tris 용액(3 M Tris-base, 10 mM EDTA, 100 mM sodium sulfite, pH 8.0)을 첨가하고 2분간 vortex 하고 다시 30초간 원심분리한다. 상층액은 버리고 pellet은 증류수로 4번 이상 씻은 후 300 μ l의 0.1 M perchloric acid를 첨가한다. 다시 2분간 vortex 한 후 15분간 원심분리하고 100 μ l의 상층액은 C18 column을 이용하여 reverse-phase HPLC로 분리하고 ESA Coulochem II electrochemical detector를 이용하여 L-dopa의 양을 측정한다.

7. Stability 측정

1×10^6 세포를 p60의 배양접시에 배양한 후 70% ethanol에 녹인 cycloheximide (5 μ g/ml)를 첨가하고 4시간 혹은 10시간 후에 세포는 trypsin을 처리하여 수거한다. Pellet은 PBS로 씻고 50 μ l의 SDS lysis solution을 첨가한 후 sonicate하여 lyse한다. Cycloheximide 처리 후 각 시간별로 남아있는 TH 단백질의 양은 western blot analysis로 측정한다.

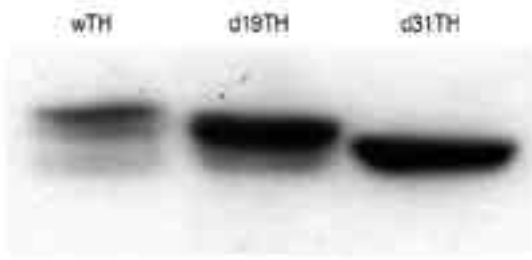


Figure 1. The effect of deletions on the expression of TH proteins. In order to see the effect of a removal of phosphorylation sites on the regulatory domain on the steady state expression level of TH protein, 18 amino acids (amino acid #2 through amino acid #19, d19TH) or 30 amino acids (amino acid #2 through amino acid #31, d31TH) are removed from the regulatory domain using PCR technique and the resulting cDNAs were expressed in NIH-3T3 cells using retroviral transfection system. Total amount of TH proteins in each cell lines are determined using western blot analysis and densitometric analysis of the band intensities shows that d19TH expresses approximately 7-fold and d31TH approximately 3-fold more proteins than wTH. Shown above is the typical of 7 separate experiments. TH: tyrosine hydroxylase, wTH: wild type tyrosine hydroxylase, d19TH: tyrosine hydroxylase with amino acids #2-19 are deleted, d31TH: tyrosine hydroxylase with amino acids #2-31 are deleted, PCR: polymerase chain reaction

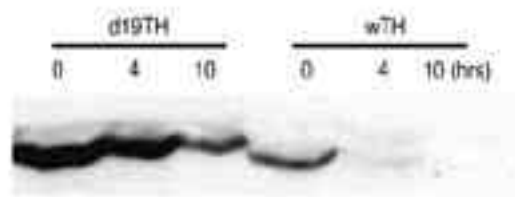


Figure 2. The effect of deletion on the stability of TH protein. To examine stability of TH proteins, cells are treated with cycloheximide and were harvested 4 or 10 hours after the treatment. After lysis, approximately 250 µg of total protein, measured using Bradford reagent, from each time point is loaded and the leftover TH protein is determined via western blot analysis. The deletion on the regulatory domain enhances the stability of the protein that approximately half of the d19TH protein is left 10 hrs after the treatment while wTH protein is almost completely degraded 4 hrs after the treatment. TH: tyrosine hydroxylase, wTH: wild type tyrosine hydroxylase, d19TH: tyrosine hydroxylase with amino acids #2-19 are deleted

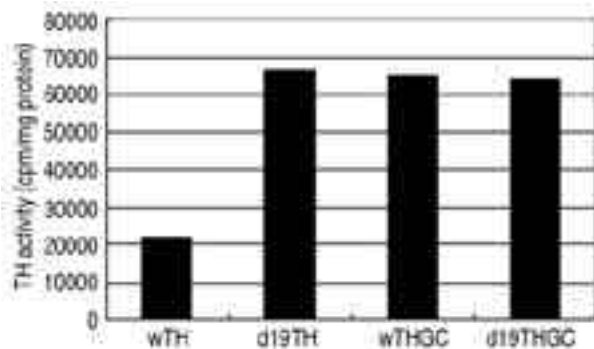


Figure 3. The activities of TH with deletion on the regulatory domain with or without GTPCH I. To measure the activities of both TH proteins with or without GTPCH I, cell lysates equivalent to 250 µg of total protein are used from each cell lines as enzyme source. The assay reveals that either deletion of 18 amino acids or presence of GTPCH I increases the activity by approximately 3-fold. However, effect of the deletion and the presence of GTPCH I are not additive, suggesting that deletion alone can increase the activity up to a maximum level which cells can tolerate. TH: tyrosine hydroxylase, GTPCH I: guanine triphosphate cyclohydrolase I

결 과

조절부위의 인산화 자리의 제거가 단백질의 steady state 발현에 미치는 영향은 Western blot analysis로

확인하였다. 단백질의 발현은, 정확한 이유는 알 수 없으나, 상당히 큰 편차(3~60배)를 보이고 있었으며 7차례의 실험에서 얻은 평균치는 d19TH 단백질의 발현이 wTH에 비해 약 7배 정도 증가하였다(Figure 1). 또한 조절부위의 인위적 변이는 그 변이의 크기에 따라 TH의 발현이 다르게 나타났으며 d31TH의 경우 wTH에 비해 약 3배의 TH 단백질을 발현하고 있었다(Figure 1). 한편 steady state에 있어서 단백질의 발현 정도는 translation과 degradation의 평형으로 유지되며 어느 한쪽의 변화는 steady state의 발현정도에 영향을 미칠것으로 기대된다. 이를 확인하기 위하여 wTH와 d19TH를 발현하는 세포에 cycloheximide (CHX)를 처리하고 4시간 혹은 10시간 후에 세포를 수거하여 남아있는 TH 단백질의 양을 확인한 결과 wTH는 CHX 처리 4시간 후 겨우 감지할 수 있을 정도만 남아있었고 10 시간이 지난 후에는 거의 감지되지 않았다(Figure 2). 그러나 d19TH의 경우 CHX 처리 4시간 후에는 대부분이 그대로 남아 있었으며 10시간이 지났어도 거의 반 정도가 남아 있어서 d19TH 단백질이 wTH에 비해 안정성이 확연히 뛰어난 것으로 확인되었다. 한편 TH의 활성의 증가는 d19TH의 경우 wTH에 비해 약 3배 정도 높은 활성을 보였다(Figure 3). 그러나 wTH, d19TH 혹은 d31TH만을 발현하는 세포주는 아주 작은 양의 L-dopa (45~80 nM/mg protein)를 생산하였으며 서로간에 통계적인 유의성을 나타내지 못하였다(Figure 4). 이는 조효소의 부족으로 인하여 최소한의 활성만 나타났기 때문이라 볼 수 있다. 그러나 wTHGC 혹은 d19THGC 세포주에서 GTPCH I에 의해 충분한 조효소가 공급되었을 때 L-dopa의 생산은 7~9배(320~450 nM/mg protein) 증가하였다. 한편 TH단백질의 활성은

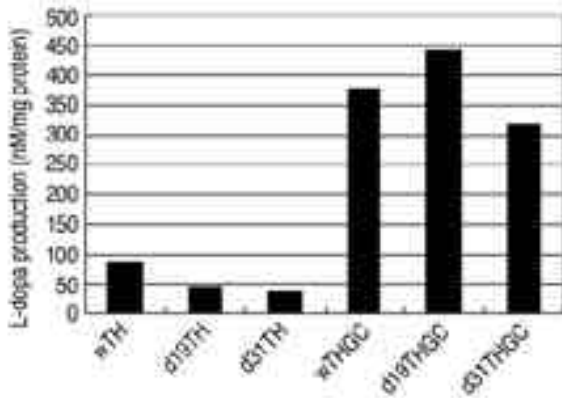


Figure 4. The effect of deletions and GTPCH I on the L-dopa production. Cells grown in a similar condition are harvested, lysed in 0.4 M perchloric acid, and filtered through 0.4 μ M filter. Catecholamines are extracted using alumina and the purified samples are analysed in HPLC using C18 column followed by a detection with ESA Coulochem II electrochemical detector. Cells expressing wTH, d19TH or d31TH produce a basal level of L-dopa but a supply of cofactor BH₄ by GTPCH I dramatically increase the intracellular L-dopa levels. The inability of the cells producing L-dopa without GTPCH I could be due to the shortage of cofactor. TH: tyrosine hydroxylase, wTH: wild type tyrosine hydroxylase, d19TH: tyrosine hydroxylase with amino acids #2-19 are deleted, d31TH: tyrosine hydroxylase with amino acids #2-31 are deleted, GTPCH I: guanine triphosphate cyclohydrolase I, BH₄: tetrahydrobiopterin

활성측정 전에 첨가한 도파민의 양에 따라 활성이 낮아졌다 (Figure 5). 이 경우 wTH는 도파민에 의한 feedback inhibition에 의해 비교적 예민하게 반응하여 낮은 농도의 도파민에서 활성이 급격히 낮아져서 10 nM의 도파민이 첨가된 경우 첨가되지 않은 경우에 비해 78%의 활성을 나타내었고 1 μ M의 도파민이 첨가된 경우 73%로 낮아졌다. 그러나 d19TH는 10 nM의 도파민이 첨가된 경우 96%의 활성을 유지하고 있었으며 비교적 높은 농도의 도파민(100 μ M) 이 첨가된 후 활성이 56%로 낮아졌다.

고 찰

파킨슨병은 약물 치료의 한시성과 부작용으로 인하여 세포를 이용한 치료(cell therapy) 혹은 도파민의 생성을 유도할 수 있는 유전자 치료(gene therapy)의 필요성이 대두되었다. 세포치료법에는 태아의 뇌조직을 환자의 뇌에 이식하는 방법(fetal tissue graft)이 가장 먼저 시도되었으며 그 효과 또한 상당히 장기간 지속되었으나 본 시술을 위해서는 8~12주된 태아 10여 개체가 필요하여^{3,4} 윤리적인 면에서나 실제적인 면에서 대단히 불합리한 방법이라 할 수 있겠다. 이외에 부신피질 세포,⁶ carotid body를 이용한 방법⁵ 등이 시도되었으나 성공적이지는 못 하였다. 한편 유전자를 이용한 치료법에는 도파민성 세포의 생존에 관여하는 BDNF^{22,23} 혹은 GDNF^{24,25} 등의 신경영양인자(neurotrophic factor), 도파민의 생성을 촉진할 수 있는

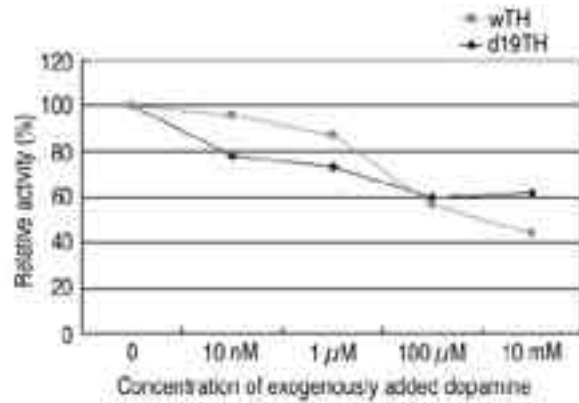


Figure 5. Feedback inhibition of TH activity by exogenously added dopamine. Modulation of TH activity by dopamine is examined using a wide range of dopamine concentration added 10 minutes prior to the initiation of TH activity assay. At lower concentration of dopamine added, d19TH is more resistant to feedback inhibition but at higher concentration of dopamine, wTH becomes more resistant to the inhibition. The squares represent the activities of d19TH with a various amount of dopamine and the rhombuses represent those of wTH. The activity at each point is expressed as percentage of the activity without dopamine as 100%. TH: tyrosine hydroxylase, wTH: wild type tyrosine hydroxylase, d19TH: tyrosine hydroxylase with amino acids #2-19 are deleted

TH²⁶와 AADC²⁷ 등이 시도되었다. 이 중에서 가장 널리 실험된 것은 TH였으나 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 되겠지만 치료에 쓰일 유전자의 발현과 발현된 단백질의 활성 및 안정성에 대한 연구가 우선되어야 할 것이다.

TH의 활성은 매우 다양한 방법으로 조절되며 이들 중 활성에 가장 큰 영향을 미치는 두 가지가 조절부위의 인산화와 생성된 도파민에 의한 feedback inhibition이다.⁸ TH의 조절부위에 위치한 serine은 이의 인산화에 따라 TH의 활성을 2배정도 향상시킬 수 있으나 인산화된 단백질은 protease에 의해 쉽게 분해된다.⁸ 그러므로 조절부위의 인산화 자리를 포함한 deletion은 TH의 인산화를 불가능하게 만들어서 낮은 활성을 보이는 반면 분해가 늦게 되므로 비교적 높은 단백질 발현을 보일 것으로 기대된다. 본 실험에서 두 개의 인산화 자리가 삭제된 d19TH에서 발현되는 단백질의 양은 wTH에 비해 7배 이상이나 높게 나타났으며 약 3배 정도의 높은 활성을 보였다. 이것은 TH의 발현과 활성 측정시 각 세포주에서 얻은 전체 단백질의 양을 측정하여 각 실험 시 동량을 사용하였으므로 d19TH를 발현하는 세포주로 만든 시료에는 wTH를 발현하는 세포주로 만든 시료에서 보다 약 7배 정도의 많은 TH 단백질이 있다고 할 수 있다. 그러므로 전체의 활성이 약 3배 정도 증가하였으나 단위 단백질 당 활성을 비교하였을 때는 약

43% 정도(3배÷7배)로 감소했다고 할 수 있다. 조절 부위의 인산화는 TH의 활성에 중요한 요인이므로 인산화 자리의 삭제는 활성감소의 한 요인이 될 수 있으며 본 실험의 결과는 기존의 연구와 일치한다고 할 수 있다.^{17,18} 한편 wTH 단백질의 활성은 GTPCH I으로 인한 조효소 BH₄의 공급에 따라 약 3배 정도 증가(wTH와 wTHGC의 경우)한 반면 d19TH의 경우 GTPCH I에 의해 충분한 조효소가 공급되어도 활성은 더 이상 향상되지 않았다(d19TH와 d19THGC의 경우). 이는 d19TH의 활성이 조효소에 의해 향상되지 않았다고 보다 활성측정 시 첨가하는 BH₄의 analogue MPH₄에 의해 세포가 나타낼 수 있는 최대한으로 활성화되었으므로 더 이상의 조효소가 이의 활성을 더 증진시키지 못한 것으로 추정할 수 있다.

생성된 도파민에 의한 feedback inhibition은 필요 이상의 도파민이 생겨나는 것을 막아서 이로 인하여 세포가 산화되는 것을 방지한다. 그러므로 활성이 높은 TH에 의한 과다한 도파민의 생산은 파킨슨병의 유전자 치료에는 오히려 불리한 요소로 작용할 수 있으며, 낮은 농도이나 지속적인 TH의 활성이 더 유리한 조건으로 사료된다. 조절부위에 인위적 변이를 가진 TH가 도파민에 의한 feedback inhibition여부는 cell lysate에는 각기 다른 농도의 도파민을 첨가하고 TH의 활성을 측정하였다. 그 결과 d19TH의 활성은 낮은 농도의 도파민에 의해서는 feedback inhibition을 적게 받아서 비교적 높은 활성을 유지하고 있지만 이의 농도가 증가하였을 때는 wTH보다 feedback inhibition에 더 예민해 졌다. 이는 d19TH에서 삭제된 부분이 과다하게 생성된 도파민에 의한 feedback 과 관여하는 부분이라고 추론할 수 있으나 이에 대해서는 보다 더 정밀한 실험이 행해져야 할 것이다.

본 연구에서는 조절부위의 인위적 변이가 TH 단백질과 본 효소의 효소적 특성에 미치는 영향에 대하여 연구하였으며 그 결과 조절부위의 변이는 TH 단백질의 발현 혹은 이의 안정성에 큰 영향을 미치고 있음을 발견하였다. 이러한 조건은 현재 시도되고 있는 유전자치료의 결점을 한결 보완하여 보다 실용적인 방법의 개발에 공헌할 것으로 기대된다.

REFERENCES

1. Youdim MBH, Riederer P. Understanding Parkinson's disease. *Scientific American* 1997;January:752-59.
2. Chiueh CC, Miyake H, Peng MT. Role of dopamine autooxidation, hydroxyl radical generation, and calcium overload in underlying mechanism involved in MPTP-induced Parkinsonism. *Adv Neurol* 1993;60:251-258.
3. 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.
4. Bjorklund A. Better cells for brain repair. *Nature* 1993;362:414-415.
5. Espejo EF, Montoro RF, Armengol JA, and Lopez-Barnneo J. Cellular and functional recovery of Parkinsonian rats after intrastriatal transplantation of carotid body cell aggregates. *Neuron* 1998;20:197-206.
6. Borlongan CV, Saporta S, Sanberg PR. Intrastriatal transplantation of rat adrenal chromaffin cells seeded on microcarrier beads promote long-term functional recovery in hemiparkinsonian rats. *Exp Neurol* 1998;151:203-214.
7. Kopin IJ, The Pharmacology of Parkinson's disease: An update. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 1993;32:467-495.
8. Kumer SC, Vrana KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. *J Neurochem* 1996;67:443-462.
9. Grima B, Lamouroux A, Blanot F, Biguet NF, Mallet J. Complete coding sequence of rat tyrosine hydroxylase mRNA. *Proc Natl Acad Sci* 1985;82:617-621.
10. Ramsey AJ, Fitzpatrick PF. Effects of phosphorylation of serine 40 of tyrosine hydroxylase on binding of catecholamines: Evidence for a novel regulatory mechanism. *Biochemistry* 1998;37:8980-8986.
11. Campbell DG, Hardie DG, Vulliet PR. Identification of the four phosphorylation sites in the N-terminal region of tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem* 261;1986:10489-10492.
12. Sutherland C, Alterio J, Campbell DG, LeBourdelle B, Mallet J, Haavik J, Cohen P. Phosphorylation and activation of human tyrosine hydroxylase in vitro by mitogen-activated protein (MAP) kinase and MAP-kinase-activated kinases 1 and 2. *Eur J Biochem* 1993;217:715-722.
13. Haycock JW, Ahn NG, Cobb MH, Krebs EG. ERK1 and ERK2, two microtubule-associated protein 2 kinases, mediate the phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-31 in situ. *Proc Natl Acad Sci* 1992;89:2365-2369.
14. Haycock JW. Phosphorylation of tyrosine hydroxylase in situ at serine 8, 19, 31, and 40. *J Biol Chem* 1990;265:11682-11691.
15. Mitchell JP, Hardie DG, Vulliet PR. Site-directed phosphorylation of tyrosine hydroxylase after KCl depolarization and nerve growth factor treatment of PC12 cells. *J Biol Chem* 1990;265:22358-22364.
16. Halloran SM, Vulliet PR. Microtubule-associated protein kinase-2 phosphorylates and activates tyrosine hydroxylase following depolarization of bovine adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* 1994;269:30960-30965.
17. Zigmond RE, Schwarzschild MA, Rittenhouse AR. Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitter via phosphorylation. *Ann Rev Neurosci* 1989;12:415-461.
18. Daubner SC, Lauriano C, Haycock JW, Fitzpatrick PF. Site-directed mutagenesis of Serine 40 of rat tyrosine hydroxylase. *J Biol Chem* 1992;267:12639-12644.
19. Funakoshi H, Okuno S, Fujisawa H. Differential effects on activity caused by phosphorylation of tyrosine hydroxylase at serine-40 by three multifunctional protein kinases. *J Biol Chem* 1991;266:2044-2052.
20. Vrana KE, Roskoski R. Tyrosine hydroxylase inactivation following cAMP-dependent phosphorylation activation. *J*

- Neurochem* 1983;40:1692-1700.
21. Ribeiro P, Kaufman S. The effect of tetrahydrobiopterin on the in situ phosphorylation of tyrosine hydroxylase in rat striatal synaptosomes. *Neurochem Research* 1994;19:541-548.
 22. Levivier M, Przedborski S, Bencsics C, Kang UJ. Intrastriatal implantation of fibroblast genetically engineered to produce brain-derived neurotrophic factor prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neurosci* 1995;15:7810-7820.
 23. Lucidi-Phillipi CA, Gage FH, Shylts CW, Jones KR, Reichardt LF, Kang UJ. Brain-derived neurotrophic factor-transduced fibroblasts: Production of BDNF and effects of grafting to the adult rat brain. *J Comp Neurol* 1995;354:361-376.
 24. Choi-Lundberg DL, Lin Q, Chang, YN, Chiang YL, Hay CM, Mohajeri H, Davidson BL, Bohn MC. Dopaminergic neurons protected from degeneration by GDNF gene therapy. *Science* 1997;275:838-841.
 25. 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.
 26. Lundberg C, Horellou P, Malet J, Bjorklund A. Generation of DOPA-producing astrocytes by retroviral transduction of the human tyrosine hydroxylase gene: In vitro characterization and in vivo effects in the rat Parkinson model. *Exp Neurol* 1996;139:39-53.
 27. Moffat M, Harmon S, Haycock J, O'Malley K. L-dopa and dopamine-producing gene cassettes for gene therapy approaches to Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1997;144:69-73.