

단일 도파민뉴런을 이용한 새로운 유전자발현 검출기법

정 상 민

건국대학교 수의과대학 생리학실험실

(접수 : 2005. 6. 21., 게재승인 : 2005. 8. 23.)

The Novel Approach of Gene Detection by Single-neuronal Cell Manipulation

Sang Min Jeong†

Research Laboratory for the Study of Ginseng Signal Transduction and Department of Physiology,
College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

(Received : 2005. 6. 21., Accepted : 2005. 8. 23.)

RT-PCR is an useful method to investigate the expression of target gene as detection tools. Although RT-PCR is the powerful detection method for tissues, it was difficult to amplify the target gene product using the single cell. To clarify the expression level of the genes related to Parkinson's disease (PD), I performed the laser dissection of single cell from Substantia nigra. I examined the mRNA expression level in the dopaminergic neuron isolated from the PD patients by the single cell RT-PCR method. It is known that tyrosine hydroxylase (TH), DOPA decarboxylase (DDC) are involved in biosynthesis of the catecholamine such as dopamine. Little has been known about the gene expression features of these enzymes in single dopaminergic neuron. I could detect the specific gene products in single cell level. The different expression was observed in PD-related gene products from the single neuron of PD patients. Interestingly, TH gene expression was significantly decreased with comparing the ratio of decrease in other PD-related genes. Hence, I represented data that indicate the RT-PCR method described in this report is an effective method in detecting a specific single-cell mRNA level related with diseases.

Key Words : Parkinson's disease, single cell, dopamine neuron, RT-PCR

서 론

유전자의 발현을 검출하는 방법으로는 주로 Northern해 석법을 비롯하여 조직을 이용한 역전사 (RT)-PCR법 등이 있다. 특히 RT-PCR법은 특정 조직에서 원하는 유전자의 발현을 비교적 정확하게 알 수 있는 유용한 방법으로 알려져 있다. 최근에는 더욱 진보된 방법으로 증폭의 포화점에 이르기 전까지 실시간으로 그 증폭되는 양을 육안으로 식별할 수 있도록 고안된 real-time PCR (정량 PCR)법도 사용되고 있다. 그러나 이 모든 방법도 조직의 RNA를 추출하여 반응하는 것이므로 세포단위의 정확한 유전자 발

현을 알기에는 한계가 있다. 특히 두뇌와 같은 조직은 신경계의 각종 뉴런 (신경세포), 글리어 (glial cell) 등 그 기능과 성질이 다른 세포들이 무수하게 많이 혼재하고 있다. 그 중에 여러 원인에 의한 신경세포의 퇴행 (degeneration) 이라고 하는 기능저하 내지는 사멸 현상은 인체에 심각한 질병을 야기한다. 특히 치매 (Alzheimer's disease; AD), 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD), 헌팅턴질병 (Huntington's disease; HD), 그리고 성인에서 모터뉴런이 손실되어 근육 위축 (atrophy)을 유발하는 Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) 등이 바로 특정 신경세포의 사멸에 의해 유발되는 퇴행성 신경계질환이다.

파킨슨병은 지금까지 주로 흑질 (Substantia nigra) 뉴런 미토콘드리아의 호흡계통의 문제와 산화적 스트레스를 유발하는 환경적 요인 등 다원적 병인이 존재한다고 알려져 있다(1-5). 파킨슨병은 사람의 신경세포에 관련한 질병 중에 가장 일반적인 질병의 하나이다(6). 파킨슨 증상 (Parkinsonism)은 중뇌 흑질 부분의 신경세포 (뉴런)가 퇴화함으로써 분비되는 도파민의 양이 줄어서 발생하며 그 양

† Corresponding Author : Research Laboratory for the Study of Ginseng Signal Transduction and Department of Physiology, College of Veterinary Medicine, Konkuk University, Seoul 143-701, Republic of Korea

Tel : +82-2-450-3716, Fax : +82-2-450-3037

E-mail : jsmyh1981@yahoo.co.kr, 81-jsm@hanmail.net

의 정도에 따라, 병의 진전 정도에 따라 증상이 심해지는 것으로 알려져 있다.

도파민은 신경세포에서의 생산량이 병의 증세와 깊은 관련이 있다고 할 수 있는데, 이런 도파민 (catecholamine; catecholamine)의 합성과정과 관련된 주요 효소로는 타이로신 수산화효소 (tyrosine hydroxylase: TH)나 방향족아미노산 탈탄산효소 (DOPA decarboxylase: DDC), 도파민 β -수산화효소 (dopamine β -hydroxylase), 페닐에탄올아민 N메틸기전이효소 (phenylethanolamine N-methyltransferase), 비오프테린 보효소 (tetrahydro biopterin) 등의 촉매반응으로 DOPA를 형성한 다음 생합성 되는 것으로 알려져 있으며 반면에, GABA는 도파민뉴런에서는 생산되지 않는 것으로 알려져 있다(7-10). 한편, PD의 중요한 병리학적 지표로 여겨지는 것은 흑질 신경세포에서 특이적으로 나타나는 inclusion body인 르위 소체 (Lewy bodies)가 그것이다. 르위 소체는 어떻게 형성되며, 도파민 신경세포를 선택적으로 죽게 하는지 그 기전은 알려져 있지 않다(6). 위와 같은 관련 유전자 산물의 생화학적인 연구는 되어 있지만 흑질 단일신경세포에서 이들 유전자의 발현 양상에 대해서는 거의 알지 못한다.

흑질 신경세포의 변화를 알 수 있는 방법은 다양하지만 대개가 신경세포와 글리어 세포 (glial cell)를 포함하는 조직을 이용한 결과였다. 그러나 신경세포의 변성은 모든 세포가 동조된 형태의 장애가 아니고, 한 개는 죽어있고 부근의 다른 하나의 세포는 죽어가며 또 다른 세포는 거의 온전한 상태를 유지하는, 다양한 상태의 세포가 혼재하는 양상을 보인다. 본 연구에서 행한 실험은 이들 세포를 한 개씩 별도로 해석할 수 있다면 부검두뇌에서 떼어낸 세포라 할지라도 신경세포가 변질되어 가는 과정을 밝힐 수 있을 것이라는 가정에서 출발하였다. 세포 한 개의 변화는, 예를 들면 전기생리학적 기법인 patch clamp법을 써서 세포의 이온채널 활동을 측정하는 것이 가능하기는 했지만 이것은 살아있는 상태의 절편이 필요하므로 사람에게 적용할 수 없는 불가능한 일이다. 그러나 최근 본인은 레이저 (laser)를 이용하여 사람의 신경세포 한 개에서 일어나는 변화를 알 수 있는 방법을 확립하여, 단일 신경세포의 유전자 발현 해석이 가능하게 되었으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

장비, 시약, 효소

실험에 사용된 주요 장비는 다음과 같다. Laser micro-dissector (HAMAMATSU 제작소, 일본), PCR cycler (MJ research 사 ATC 100, 미국), 원심분리기 (TOMY, 일본), microtome (LEICA, 독일), spectrophotometer (BECKMAN COULTER, Fullerton, CA) 사용된 시약 및 효소는 QIAGEN (Valencia, CA), Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England), BD science (Franklin Lakes, NJ), Novagen (Madison, WI) 등에서 구입하였다.

절편의 제작

초저온 냉동고 (-80°C)에 보존 중인 사람의 부검두뇌 (brain bank)를 이용하여 중뇌, 특히 흑질 부분을 사방 1 cm² 내외로 절단하였다. 절단된 조직덩어리는 microtome을 이용하여 -20°C에서 20~30 μ m의 두께로 절편을 만들어 -20°C로 미리 얼려놓은 청결한 slide glass에 얹어 약간의 체온을 가하여 기포가 생기지 않도록 달라붙게 하였다. 만들어진 slide 표본은 모아서 냉동 동결건조를 실시하였다. 동결 건조된 표본은 -80°C에 보관하거나 필요한 시기에 꺼내어 조직염색에 이용하였다.

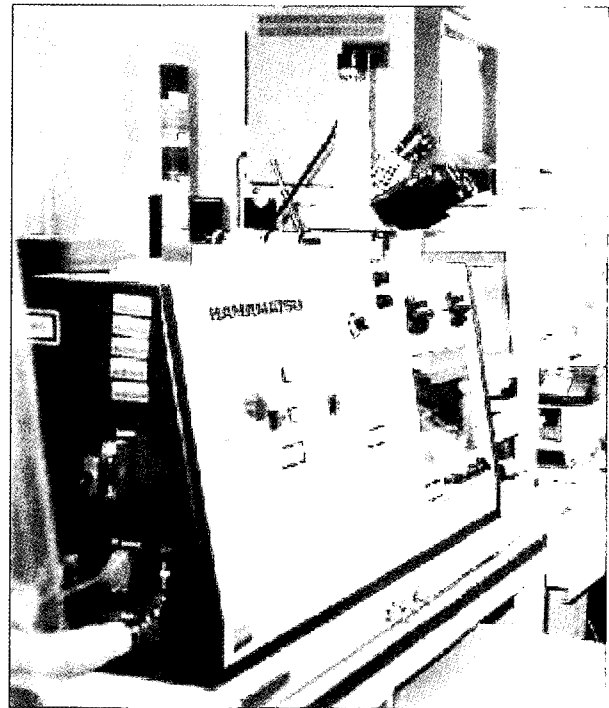


Figure 1. 레이저 마이크로 다이섹터 (laser micro-dissector). 특별 주문 제작한 레이저 마이크로 다이섹터로 작업할 주변 환경을 전용의 clean booth를 제작하여, 가능한 한 일정한 온도 조건과 청결함을 유지하도록 하였다. 청결한 환경을 유지함으로써 RNA 실험에 미치는 영향을 최소화할 수 있었다.

조직 염색

초저온 냉동보관 중인 절편표본은 상온에 장시간 노출되지 않도록 충분한 주의를 하며 전체적인 작업환경은 4°C를 유지하였다. 염색법으로는 신경세포의 변화를 보는데 가장 적합한 것으로 알려진 Nissl 염색법을 실시하였다 (Fig. 2 참조). Nissl 염색법은 특히, 뇌간이나 시상과 같은 신경세포가 신경섬유 속에 매몰되어 있는 장소를 아는 데는 위력을 발휘한다. 그 방법은 아래와 같다. -80°C에 보관한 절편표본을 메탄올에 약 5분간 담가 고정하였다. 0.1%의 cresyl violet용액 (1% cresyl violet-ethanol 용액 10 ml, 10% 초산용액 2 ml, DEPC 처리수 90 ml, 혼합 후 여과)으로 5분간 염색한 다음, DEPC (diethylpyrocarbonate) 처리수로 세척하였다. 수분을 줄이기 위하여 95% 에탄올로 2-3회 분별 세척한 다음 마지막으로 순수 에탄올로 탈수하였다.

Single neuronal cell의 분리 방법

Nissl 염색법으로 염색된 절편을 위로 향하게 하여 준비된 laser micro-dissector(Fig. 1)의 현미경 관찰을 통하여 처음에는 저배율 확대 (약 50배)로 신경세포 위치를 탐색한다. 정해진 위치를 고배율 확대 (약 550배)로 정한 뒤, 하나하나의 신경세포의 위치를 확인할 수 있도록 미조정 한다. 적합한 도파민 (혹질) 뉴런이 결정되면 세포 주변에 다른 세포가 들어가지 않도록 laser강도를 20 Hz, shot 10의 조건으로 레이저를 조사하는데 필요에 따라서는 같은 장소를 2-3회 부가적으로 조사할 수 있다. 이 때 다른 세포, 예를 들면 글리아 세포는 염색 정도가 효과적이지 않아 이 단계에서 제외할 수 있으므로 순수한 도파민 뉴런을 분리하는 데 적합하다. 세포 주변에 완전한 형태의 절개선이 완성되면 절편을 뒤집어 놓은 후, 원래의 위치를 찾아서 재차 미조정을 실시하여 절개선이 들어간 세포가 정확하게 정위치에 올 수 있도록 한다. 미리 RNA추출용 시약 (TRIZOL)을 microtube안에 적당량 담아 놓았다가 현미경 작업대 밑에 놓고 시료 표본의 뒷면에 laser강도 10 Hz, shot 10의 조건으로 1회 조사하여 세포가 시약 안으로 떨어지도록 한다(Fig. 2).

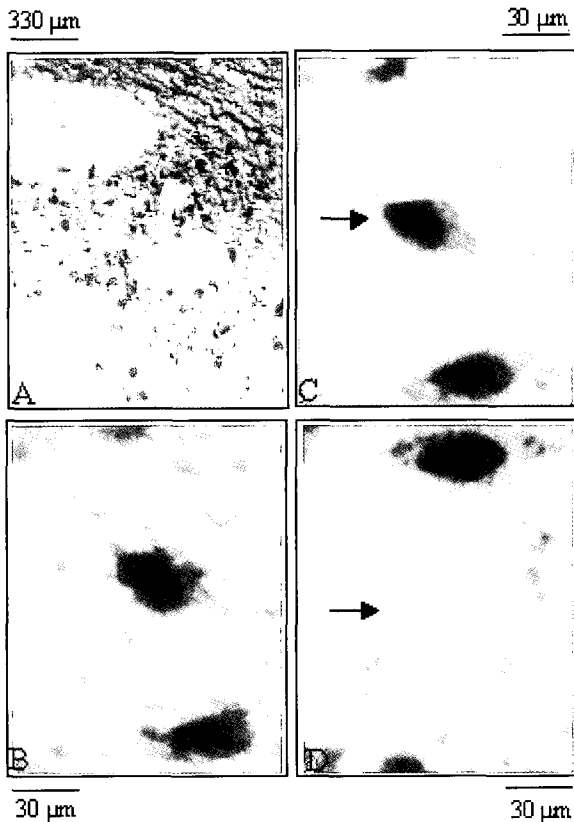


Figure 2. 단일 도파민 뉴런의 분리 (Nissl 염색한 20 mm 두께의 부검 흑질 절편을 레이저 마이크로 다이섹터로 20 Hz로 절단선을 넣고, 10 Hz에서 분리하였다. A: 저배율 확대 (50배), 슬라이드 표면, 사진에 김게 보이는 세포들이 도파민 뉴런이다. B: 고배율 확대 (550배), 슬라이드 표면. C: 고배율 확대 (550배), 슬라이드 표면. 세포를 분리하기 직전, 레이저로 뉴런 주변을 절단한 후에 나타난 절단 선은 화살표로 표시하였다. D: 고배율 확대 (550배), 슬라이드 뒷면, 레이저로 세포를 분리한 후에 나타난 빈 공간을 화살표로 표시하였다).

RNA의 추출

시판하는 TRIZOL시약에 의한 추출법을 약간 수정하여 단일 신경 세포에 적합하도록 고안한 방법을 사용하였다. 위에서 micro laser dissector로 절단한 여러 개 또는 한 개의 단일 세포를 TRIZOL시약에 모아 핵산 이외의 불순물을 제거하기 위해 폐놀 추출을 1회 실시하였다. 캐리어와 함께 2-프로판올로 침전시킨 침전물을 75% 에탄올로 세척하였다. 단시간 동안 자연 건조한 침전물에서 DNA를 분해하기 위하여 DNase I 처리를 실온에서 15분간 실시하였다.

Single neuronal cell의 역전사 (RT)-PCR

신경세포 한 개에서 얻은 RNA로부터 복수의 유전자 산물을 검출하기 위해, 우선 고효율로 1st strand cDNA를 합성하기 위한 방법을 모색하였다. 또한 상응하는 유전자의 서열에 특이적으로 결합할 수 있는 primer set를 제작하여, 조사하고자 하는 모든 유전자 산물이 검출 가능한 방법을 고안하였다. Primer set로서 RNA의 3'쪽 poly A-tail에 부합하는 anchor primer를 제작하고, 다른 한 쪽인 5'쪽에는 각각의 유전자에 특이적인 primer를 같은 조건의 PCR에서 작용할 수 있도록 Tm치를 고려하여 설계하였다. 1차 및 2차 PCR을 하는데 가장 적합한 annealing (결합) 온도, 신장 시간, 사이클 수 등의 조건을 검토하였다. 1st PCR 반응액에 제작해 둔 5'쪽 primer는 목적유전자 만큼 넣고 3'쪽 primer는 anchor primer만을 사용하여 20회 반응하였다. 1st PCR 산물은 spin 컬럼으로 정제하여 반응액의 일부를 주형으로 각각의 유전자에 맞는 특이적 primer set를 이용하여 2nd PCR 반응을 40회 더 실시하였다.

결과 및 고찰

단일 신경세포의 분리

분자 수준에서 연구를 진행시키기 위해서는 세포 분리가 정확해야 하는데, 일반적으로 *in vivo*이든 *in vitro*이든 신경세포만을 단독으로 분리해내는 가장 효과적인 방법은 그리 흔하지 않았다. 생리적 실험에서는 *in vivo*의 세포를 효소를 이용해 분리하여 배양세포로 쓰는 방법이 알려져 있다. 그러나 이들 방법은 원치 않는 세포를 만족할 만한 수준으로 배제하는 것은 어려운 일이다. 본인은 laser micro-dissector를 이용하여 재료 및 방법의 single cell neuron의 분리 방법에서 언급한 것과 같이 분리하는데 성공하였다(Fig. 2).

진보된 RT-PCR법의 확립

재료 및 방법에서 언급한 대로 brain bank로부터 얻어진 단일 신경세포의 total RNA를 이용하여 단 한 개의 세포 또는 다수 (6개~11개)의 뉴런에서 원하는 유전자의 발현 산물 (mRNA)을 RT-PCR법을 이용하여 검출하는데 성공하였다(Fig. 3). 도파민의 생합성계에 관련한 효소 유전자는 여러 가지가 있지만, 가장 주요하게 여겨지는 TH, DDC 그리고 Lewy 소체의 구성성분인 α -synuclein 구조 유전자 산물, 그리고 도파민 뉴런에서는 그 산물을 검출할 수 없는

GABA 대사관련 유전자산물 (GAD)에 대하여 그 결과를 나타내었다(Fig. 3). 그림에서 보듯이 단 한 개의 신경세포의 결과(Fig. 3 상단)와 복수의 세포로부터 얻은 결과(Fig. 3 가운데, 하단)에서 별 다른 차이는 인정되지 않았다.

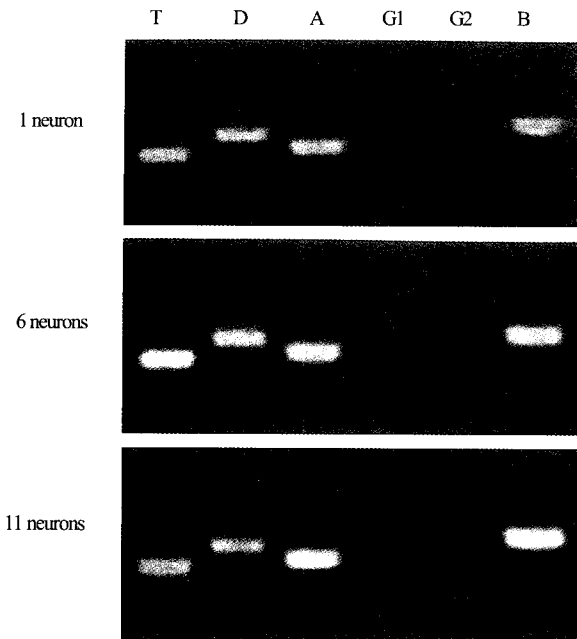


Figure 3. 단일 도파민 뉴런의 RT-PCR (T: tyrosine hydroxylase, D: DOPA decarboxylase, A: α -synuclein, G1: GAD1, G2: GAD2, B: β -actin). 단일세포 1개만을 모은 것과 11개를 가지고 실시한 것 사이에 증폭 산물의 차이는 거의 보이지 않는다. 즉, 단일세포 한 개만으로도 충분히 검출 가능한 실험방법임을 알 수 있다.

이 결과는 즉, 한 개의 신경 세포로도 원하는 유전자수만큼의 발현 산물을 충분히 만족할 만한 수준까지 검출할 수 있음을 입증한 것이다. 실험 중에 일부 (5% 이내; 20개 중에 하나정도)의 시료에서 도파민 신경세포에서는 검출 되는 유전자 산물이 대단히 낮은 양이지만 검출되기도 하였다. 그러나 그것은 실험적 수법으로 충분히 보완할 수 있는 수준이었다(data not shown). 이와 같은 방법은 여러 차례 반복된 실험에서 그 유의성을 충분히 검토하였으므로 결과의 신뢰도는 대단히 높다고 할 수 있다.

하나의 신경세포에서의 도파민 생합성계 유전자의 발현

위에서도 언급하였지만 하나의 도파민뉴런에서 안정적으로 다수의 유전자 산물을 동시에 검출할 수 있다는 장점은 귀중하게 얻은 brain bank의 두뇌 시료를 헛되이 하지 않고 한번에 실험을 종료할 수 있음을 의미한다. 이런 점을 활용하여 우선 non-PD (PD에 대하여 정상)의 뉴런을 각각 하나씩 분리하여 도파민 뉴런에 특이적인 주요 도파민 생합성유전자의 산물의 검출에 착수하였다. 수차례의 RT-PCR의 반복 실험으로 얻어진 결과를 Fig. 3B에 소개하였다. Fig.에서 보듯이, 10개의 뉴런에서 거의 완벽하게 동등한 수준의 유전자 산물을 검출하는 데 성공하였다(Fig. 4A).

파킨슨병 환자 도파민 신경세포의 도파민 생합성계 유전자의 발현양상

PD환자의 도파민뉴런을 분리하여 그 형상에 따라 분류한 후 대표성이 있는 10개의 뉴런에 대하여 하나의 신경세포에서의 PD관련 유전자의 발현에서와 같은 방법으로 RT-PCR을 실시하였다. 서론에서도 언급했듯이, 예상했던 대로 죽어있는 세포, 죽어가는 세포, 정상에 가까운 세포에 따라 각각의 유전자의 발현 산물이 다르게 검출되는 결과를 보였다(Fig. 4B). 죽은 세포 (2번)에서는 GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) 대조구를 포함하여 일체의 산물이 검출되지 않았으며, 죽어가는 세포 (3, 4, 9번)에서는 검출되지 않는 유전자가 각각 세포마다 다르게 나타났으며, 나머지 6개의 세포에서는 거의 정상에 가까운 수준으로 검출되었다. 여기서, 흥미로운 사실은 죽어가는 세포에서 3개의 TH의 유전자 산물이 우선적으로 소멸된 것으로, 이결과는 이제까지의 생화학적 연구로 가장 중요한 생합성 관련 유전자가 TH (tyrosine hydroxylase)라는 사실과도 부합한 결과였다. 또 다른 하나는 DDC와 α -synuclein 유전자 산물의 소멸도 세포의 퇴행 (degeneration)과 깊은 관계가 있음을 나타내는 결과라 하겠다.

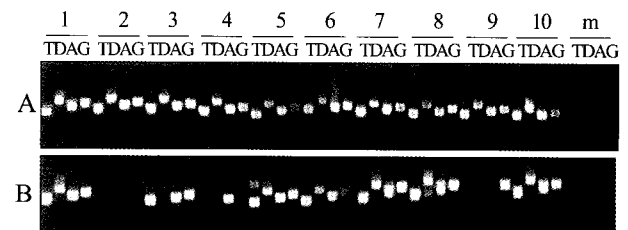


Figure 4. non-PD 또는 PD환자 도파민뉴런의 유전자 발현 (m: RNA를 넣지 않은 프라이머 대조구, T: tyrosine hydroxylase, D: DOPA decarboxylase, A: α -synuclein, G: GAPDH). 그림의 위에 표시된 숫자는 별개의 세포에 편의상 붙인 것이다. A. non-PD 도파민 뉴런의 RT-PCR. 각각의 단일세포 사이의 발현 산물의 차이가 있는지를 별개의 독립된 세포로 조사한 것이다. 적어도 본 논문의 방법으로 모든 세포에서 균일하게 검출되었다. B. PD 도파민뉴런의 RT-PCR. 죽어있는 세포(2번), 죽어가는 세포(3, 4, 9번), 정상에 가까운 세포에 따라 각각의 유전자의 발현양이 다르게 검출되었다. 2번에서는 모든 유전자의 산물이 검출되지 않았으며, 3, 4, 9번에서는 검출되지 않는 유전자가 각각 세포마다 다르게 나타났다. 형태상으로 정상에 가까운 세포의 발현양은 적어도 이 실험에서는 non-PD환자의 결과(가운데)와 비교하여도 그 차이가 거의 없었다).

요약

조직을 이용한 역전사 (RT)-PCR법을 이용하면 원하는 특정유전자의 발현을 비교적 정확하게 알 수 있지만 조직의 RNA를 이용하므로 세포단위의 정확한 유전자 발현을 알기에는 한계가 있다. 특히 그 기능과 성질이 다른 세포가 무수하게 많이 혼재하는 두뇌와 같은 조직은 신경계의 각종 뉴런(신경세포), 글리어 (glial cell) 등이 서로 얽혀 있다. 대표적인 신경세포의 degeneration 질병으로는 파킨슨병 (Parkinson's disease; PD)이 있다. 파킨슨병은 사람의 신경세포 관련 질병에 있어서 가장 일반적인 질병의 하나이다.

PD의 가장 중요한 원인은 도파민 생성 신경세포의 퇴행 혹은 사멸에 기인하여 도파민 (dopamine)이라는 신경전달 물질이 감소하는 것이 그 원인이다. 도파민과 같은 카테콜 아민의 생합성에 관련된 효소는 타이로신 하이드록실레이스 (TH), 도파 데카르복실레이스 (DDC) 등이 알려져 있다. 그러나 그런 효소들의 생화학적 연구는 많이 되어 있음에도 불구하고 단일 흑질 신경세포에서의 이들 관련 유전자의 발현 양상에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. PD와 관련된 유전자의 발현 정도를 밝히기 위하여, 레이저 다이섹터 (laser micro-dissector)에 의한 단일 신경세포의 분리에 착수하였다. 정해진 방법에 따라 정상 대조구 (비PD)와 PD 환자에서 각각 한 개 또는 여러 개를 성공적으로 분리한 흑질 신경세포를 이용하여 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 RT-PCR을 행하였다. 그 결과, 단 한 개의 신경세포에서도 여러 개의 세포를 사용한 것과 같은 동일한 결과를 얻는 데 성공하였다. PD환자의 뇌에서 분리한 10개의 독립적인 세포의 예에서는 각 세포간의 발현차이가 인정되었으며, 특히 TH 유전자의 발현은 상당히 높은 확률로 검출되지 않았다. 이 결과로 단일 신경세포에서의 mRNA양을 검출하기 위해서는 본 본문의 RT-PCR법이 효과적인 방법임을 알 수 있다.

감 사

본 연구는 일본 과학기술진흥사업단의 전략적 기초연구사업 (CREST)의 연구비 및 인건비 지원을 받아 행하여졌으며, 이에 감사드립니다. 한편, 연구 지원을 아끼시지 않은 동경대학 의학부 (동경대학병원) 신경내과 명예교수이신 카나자와 이치로오 (金澤一郎, 현재, 일본 국립신경연구소 소장) 선생님, 그리고 물심양면으로 도와주신 건국대학교 수의과대학 나승열 교수님, 후원하여 주신 이상목 교수님께 감사드립니다.

REFERENCES

- Gasser, T. (1998), Genetics of Parkinson's disease, *Ann. Neurol. (Suppl 1)* **44**, S53-S57.
- Riess, O., R. Jakes, and R. Kruger (1998), Genetic dissection of familial Parkinson's disease, *Mol. Med. Today* **4**, 438-444.
- Jenner, P., A. H. V. Schapira, and C. D. Marsden (1992), New insights into the cause of Parkinson's disease, *Neurology* **42**, 2241-250.
- Schapira, A. H. (1996), Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration, *Curr. Opin. Neurol.* **9**, 260-264.
- Mizuno, Y., H. Yoshino, N. Hattori, T. Kobayashi, S. Shimoda-Matsubayashi, H. Matsumine, and T. Kondo (1998), Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease, *Ann. Neurol.* **44**, 99-109.
- Kitada, T., S. Asakawa, H. Matsumine, N. Hattori, H. Shimura, S. Minoshima, N. Shimizu, and Y. Mizuno (2000), Progress in the clinical and molecular genetics of familial parkinsonism, *Neurogen.* **2**, 207-218.
- Nagatsu, T., T. Kato, I. Nagatsu, Y. Kondo, S. Inagaki, R. Iizuka, and H. Narabayashi (1979), Catecholamine related enzymes in the brain of patients with Parkinsonism and Wilson's disease, *Adv. Neurol.* **24**, 283-292.
- Nagatsu, T., T. Tamaguchi, T. Kato, S. Matsuura, M. Akino, I. Nagatsu, R. Iizuka, and H. Narabayashi (1981), Biopterin in human brain and urine from controls and Parkinsonian patients, *Clin. Chim. Acta.* **109**, 305-311.
- Nagatsu, T., K. Oka, T. Yamamoto, H. Matsui, T. Kato, C. Yamamoto, I. Nagatsu, R. Iizuka, and H. Narabayashi (1981), Catecholaminergic enzymes in Parkinson's disease and related extrapyramidal disease, *Transmitter Biochemistry of Human Brain Tissue*, (ed. by Riederer, P., and Usdin, E.), Macmillan Publ., 291-302.
- Kalkman, H. O. and E. Loetscher (2003), GAD(67): the link between the GABA-deficit hypothesis and the dopaminergic-ang glutamatergic theories of psychosis, *J. Neural. Transm.* **110**, 802-812.