

프로테오믹스를 이용한 경직성 뇌성마비 환자의 근조직 내 DJ-1 발현 분석

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

곽윤해 · 한수봉 · 공선영 · 홍승우 · 김현우

= Abstract =

Proteomic Analysis of DJ-1 Expression in the Muscles of Spastic Cerebral Palsy Patients

Yoon Hae Kwak, M.D., Soo Bong Hahn, M.D., Sun Young Kong, M.S.,
Seoung Woo Hong, M.D., Hyun Woo Kim, M.D.

Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Using proteomic analysis, this study was performed to see the characteristics of proteins expression in the muscles of spastic cerebral palsy patients.

Materials and Methods: We studied twelve specimens from six patients with spastic cerebral palsy, three patients with myelomeningocele, and three normal people who underwent orthopaedic surgeries due to trauma. We studied the extracted proteins showing differences in the two-dimensional electrophoresis, and the prominent thirteen proteins were re-evaluated by proteomics and the reverse transcriptional polymerase chain reaction, which was to clarify the relationship between gene and protein expression.

Results: Among fifteen proteins, six proteins were found to be higher in normal people, and nine were found to be higher in the groups of patients by spot histogram. The results of proteomic analysis with MALDI-TOF for fifteen proteins showed that the expression of DJ-1 was related to cerebral palsy.

Conclusion: This study shows that strong expression of DJ-1 is related to spasticity and cerebral palsy. We showed for the first time the possibility of any relationship between spastic condition and DJ-1 expression.

Key Words: Cerebral palsy, Muscles, Proteomic analysis, DJ-1

※ 통신저자: 김 현 우

서울특별시 서대문구 성산로 250

연세대학교 의과대학 정형외과학교실

TEL: 02) 2228-2187 FAX: 02) 363-1139 E-mail: pedhkim@yuhs.ac

* 본 연구는 연세대학교 의과대학 교수연구비로 이루어졌음.

서 론

경직성 뇌성마비(spastic cerebral palsy)에 관한 연구는 주로 근, 골격계 장애의 교정 및 이를 통한 보행의 개선에 중점을 두고 진행되어왔다. 질환 자체에 대한 연구는 신경학적인 측면에서 주로 진행되어 왔으며, 이환된 근육 자체에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다. 분자생물학적 관점에서 본 연구자들은 경직성 뇌성마비 환자의 경직도에 따른 근육에서의 조직병리학적 변화와 함께 Ubiquitin 및 neural cell adhesion molecule(N-CAM) 유전자 발현 양상을 관찰한 바 있다¹¹⁾. 그 결과 경직이 심한 환자에서 Ubiquitin 유전자의 발현은 증가하였고 N-CAM 유전자 발현은 감소하는 양상을 관찰하였다. 그러나 조직화학염색에서는 모든 환자들에서 Ubiquitin 단백질 발현이 관찰되지 않았으며, N-CAM 발현은 경직이 심했던 유전성 운동 및 감각 신경병증 환자에서만 강한 발현을 보여 유전자 발현과 단백질의 발현 양상이 일치하지 않았다. 이에 본 연구에서는 유전자 전사 후의 변화에 대한 연구의 필요성을 바탕으로, 프로테옴 분석을 통한 단백질 발현 양상을 관찰하였다^{16, 28)}.

프로테옴 분석은 단백질체의 기능 이상과 구조 변형 유무 등을 가려내는 분석 기술로서 특정 단백질의 발현 양상의 변화, 전사 후 조절(post-translational modification), 단백질간의 상호

작용과 단백질 전체 수준에서의 구성 및 기능 등을 연구하여 생체 내 변형과정을 질병의 진행과정과 연계시켜 총괄적으로 이해할 수 있는 연구 분야이다^{3, 4, 15, 21)}. 이차원 전기 영동은 한 개체 내에서 발현되는 단백질의 발현 양상과 생리적, 환경적 변화에 따른 발현 정도의 변화도 관찰할 수 있다. 또한 분석 대상 단백질 중 특정 spot에서 양적인 변화를 보이는 단백질을 Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight (MALDI-TOF) 질량 분석 방법으로 확인하여 아미노산 서열을 결정하고 단백질의 정체를 확인할 수 있다.

본 연구에서는 프로테옴 분석을 이용하여, 뇌성마비 환자에서 근육의 경직성을 유전자 수준 및 실질적인 단백질 발현 수준에서 관찰함으로써 근육의 경직도가 갖는 임상적 의의에 대하여 고찰하고자 하였다. 또한 유전자 발현과의 관계를 확인하기 위해 동정된 단백질을 역으로 역전사 효소를 이용하여 유전자 수준에서 추적하여, 경직성 뇌성마비 환자의 근육에서 발현되는 단백질의 특성을 규명하고자 하였다.

연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

경직성 뇌성마비 환자 6명, 척수수막류 환자 3

Table 1. Summary of patients

Patient No.	Age/Sex	Diagnosis	Biopsy Site
1	5 [♂] /M	Normal control	Abductor hallucis longus
2	25/F	Normal control	Gastrocnemius
3	69/M	Normal control	Gastrocnemius
4	6 ⁺¹ /M	Myelomeningocele	Abductor hallucis longus
5	13 ⁺⁴ /M	Myelomeningocele	Gastrocnemius
6	30/F	Myelomeningocele	Abductor hallucis longus
7	13 ⁺⁷ /M	Cerebral palsy	Gastrocnemius
8	18/F	Cerebral palsy	Abductor hallucis longus
9	18/F	Cerebral palsy	Abductor hallucis longus
10	7 ⁺¹⁰ /F	Cerebral palsy	Gastrocnemius
11	16/F	Cerebral palsy	Gastrocnemius
12	6 ⁺⁶ /M	Cerebral palsy	Gastrocnemius

명, 그리고 기저 질환이 없던 3명을 대상으로 수술 전 사전 동의 후 정형외과적 수술 시 근 생검을 실시하였다. 성별은 환자군은 남자가 3명, 여자가 6명이었고 대조군은 남자가 2명, 여자가 1명이었다. 환자군의 나이는 6년 1개월에서 30세까지로 다양하였으며 평균 10^{±7}세였고, 9명의 환자들은 모두 관절 구축이 있었다. 생검은 수술 부위에 따라서 장무지외전근과 비복근에서 실시하였으며 대조군은 신경학적으로나 근골격계에 이상이 없던 환자로 1명은 침내반죽 환자였고 그 외의 2명은 외상으로 수술을 시행 받은 경우였다(Table 1).

2. MALDI-TOF 및 Proteomic analysis를 통한 단백질 동정

2차원 전기 영동(2-dimensional electrophoresis; 2-DE)을 시행한 후 CBB G-250을 사용하여 염색하였다. CBB staining을 통해 이미지를 얻은 gel은 PowerLook 1100 scanner (UMAX technology, Dallas, Texas)를 사용하여 2-DE image digital data로 전환한 다음, 2-DE image analysis program인 Image Master™ analysis software (Amersham Pharmacia Biotech.)를 사용하여 이미지를 비교 분석하였다.

다음으로 Gel을 scan 한 후 PDQuest™ software (Huntington Station, NY, USA)를 이용하여 spot의 농도를 측정하였다. 원하는 spot을 gel에서 오려 내어 siliconized E-tube에 넣고, 30 mM potassium ferricyanide과 100

mM sodium thiosulphate을 1:1로 섞은 용액 1 ml를 첨가 한 후, 멸균된 막대기로 으깨 주고 37°C 교반기에서 10분간 방치했다. 그 후 증류수로 2번 세척한 후 증류수를 완전히 제거하였다. 이 튜브에 100% Acetonitrile (ACN)을 500 µl 첨가하여 천천히 섞어 주면서 gel이 뭉쳐지는 것을 확인한 후 원심분리기로 침전시키고, 상층액을 제거한 후 다시 한번 반복하고, SpeedVac으로 20~30분 정도 완전히 건조시켰다. 침전물에 10 mM DTT 25 µl를 첨가하고 56°C에서 섞어 주면서 30분간 방치하였다. 상층액을 제거 한 후 55 mM Iodoacetamide 25 µl를 첨가한 후 호일을 싸서 상온에서 25분간 방치했다. 다시 상층액을 제거한 후 100 mM Ammonium Bicarbonate (ABC) 30 µl를 첨가한 후 세척하고 다시 한번 원심 분리한 후 상층액을 제거하였다. 100% ACN을 100 µl 첨가하여 혼합한 후 원심 분리하여 상층액을 제거하고 이 과정을 다시 한번 더 반복한 다음 20~30분 정도 건조시켰다. Rehydrated gel 조각에 0.1 µg/µl trypsin 4 µl와 50 mM ABC buffer (pH 8.0) 30 µl를 첨가한 후 얼음에서 40분간 방치하였고, 37°C에서 12~16시간 교반기에 방치시켰다. 다음날 상층액을 제거하지 않고 50 mM ABC 50 µl를 2번, 100% ACN 50 µl을 첨가한 후 원심분리 후 각각의 상층액을 한 튜브에 옮겨 담은 후, 모아진 상층액을 SpeedVac에서 3시간 동안 건조시키고 ziptip을 이용하여 70% ACN, 1% TFA, matrix가 혼합된 용액으로 gel 조각을 녹였다. 이후 plate에 loading 한 후 MALDI-TOF로 분석하였고, MALDI-TOF로 분석된 펩타이드 분자량을 이용하여 ProFound-peptide mapping 분석시스템과 SWISS-PROT 단백질 database를 이용하여 각 단백질 spot의 형태를 분석하였다.

3. 유전자 발현

RNA 분리는 Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, Canada)를 이용한 acid guanidium thiocyanate-phenol chloroform extraction 방법을 이용하였으며, complementary DNA (cDNA)는 AccuPower-RT PreMix (Bio-

Table 2. Primer of DJ-1 and GAPDH

DJ-1	Forward	5'-GTG GAA AAA GAC GGC CTG AT - 3'
	Reverse	5'-CGC AGT TCG CTG CTCTAG TC - 3'
GAPDH	Forward	5'-GAA GGT GAA GGT CGG AGT - 3'
	Reverse	5'-GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC -3'

neer, Korea) Kit를 이용하여 제작하였고 이를 이용하여 AccuPower-PCR premix tube (Bioneer, Korea)에 제작된 cDNA 1 μ l와 primer 10 pmole를 넣고, 전체 부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 첨가하였다. 각 유전자에 대해 사용된 primer는 참고문헌과 Gene Bank를 이용하여 제작되었으며, 염기서열은 Table 2와 같다. DJ-1의 경우 94 $^{\circ}$ C 30초, 55 $^{\circ}$ C 30초와 72 $^{\circ}$ C 1분 조건으로 30 cycle을 시행하였고, 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 안정시켰다. GAPDH의 경우 DJ-1 primer와 동일한 조건으로 수행하였다. 이후, 2% Agarose gel에 RT-PCR (reverse transcriptional polymerase chain reaction) 결과로 얻어진 cDNA 3 μ l를 well에 넣고 100 volt에서 약 30분 전기영동 시켰다. 확인된 유전자 발현을 ultraviolet 디지털 카메라로 촬영 후 Image-pro[®] 프로그램을 이용하여 GAPDH 유전자 발현을 기준으로 상대적인 발현 정도를 측정하여 비교하였다.

결 과

1. 단백질 동정

12명의 표본을 대상으로 전기 영동을 시행한 결과 정량적으로 두드러지게 동정되었던 15가지 단백질을 대상으로 분석하였다. 15가지 단백질 중에서 6가지 단백질은 대조군에서 더 많이 발현되었고, 나머지 9가지 단백질은 환자군에서 더 많이 발현되었음을 Spot histogram을 통하여 확인하였다(Fig. 1, 2). 강하게 발현된 15가지 단백질에 대하여 MALDI-TOF와 프로테오믹 분석을 통하여 성상을 확인한 결과, 2개의 단백질은 현재까지 명명되지 않은 종류로 확인되었으며 나머지 13개 단백질의 종류를 확인할 수 있었다(Table 3). 프로테오믹 분석 결과 동정된 단백질 중 2개의 확인되지 않은 단백질 외에 다른 13개의 단백질을 대상으로 하였다. 특히 뇌성마비 환자의 임상적 특징에 영향을 미칠 수 있는 물질로 추정되는 2가지 단백질로 대상을 좁혔으며, 대조군에서 정량적으로 더 많이 발현이 된 그룹 중 alpha 1 actin precursor (ACTA1)와 대조군보다 환자군에서 더 많이 발현된 그룹 중 DJ-1을 선택하였다(Fig. 3, 4).

이에 대하여 문헌 고찰을 통하여 경직에 영향을 줄 수 있는 물질을 감별하고자 하였고, 나머지 11

Table 3. Proteomic analysis

Spot No.	Protein name
13	74 for gi 4501881, alpha 1 actin precursor [Homo sapiens]
16	73 for gi 4501881, alpha 1 actin precursor [Homo sapiens]
17	122 for gi 21536288, muscle creatine kinase [Homo sapiens]
21	69 for gi 119390284, unnamed protein product [Homo sapiens]
24	66 for gi 10437767, unnamed protein product [Homo sapiens]
37	66 for gi 15826629, Chain A, Human Peroxiredoxin 5
51	94 for gi 999926, Chain, Annexin V (Lipocortin V, Endonexin II, Placental Anticoagulant Protein)
53	66 for gi 54695812, capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta [Homo sapiens]
57	61 for gi 119616263, cytosolic phosphoprotein DP58, isoform CRA_a [Homo sapiens]
61	69 for gi 5803225, tyrosine 3/tryptophan 5 -monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide [Homo sapiens]
62	136 for gi 2507187, Protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase (Protein-beta-aspartate methyltransferase)
64	110 for gi 4505303, smooth muscle and non-muscle myosin alkali light chain 6B [Homo sapiens]
65	68 for gi 31543380, DJ-1 protein [Homo sapiens]
68	61 for gi 42542978, Chain B, X-Ray Crystal Structure Of Human Galectin-1
70	132 for gi 4557966, Chain A, Ligand-Free Human Glutathione S-Transferase M2-2 (E.C.2.5.1.18), Monoclinic Crystal Form

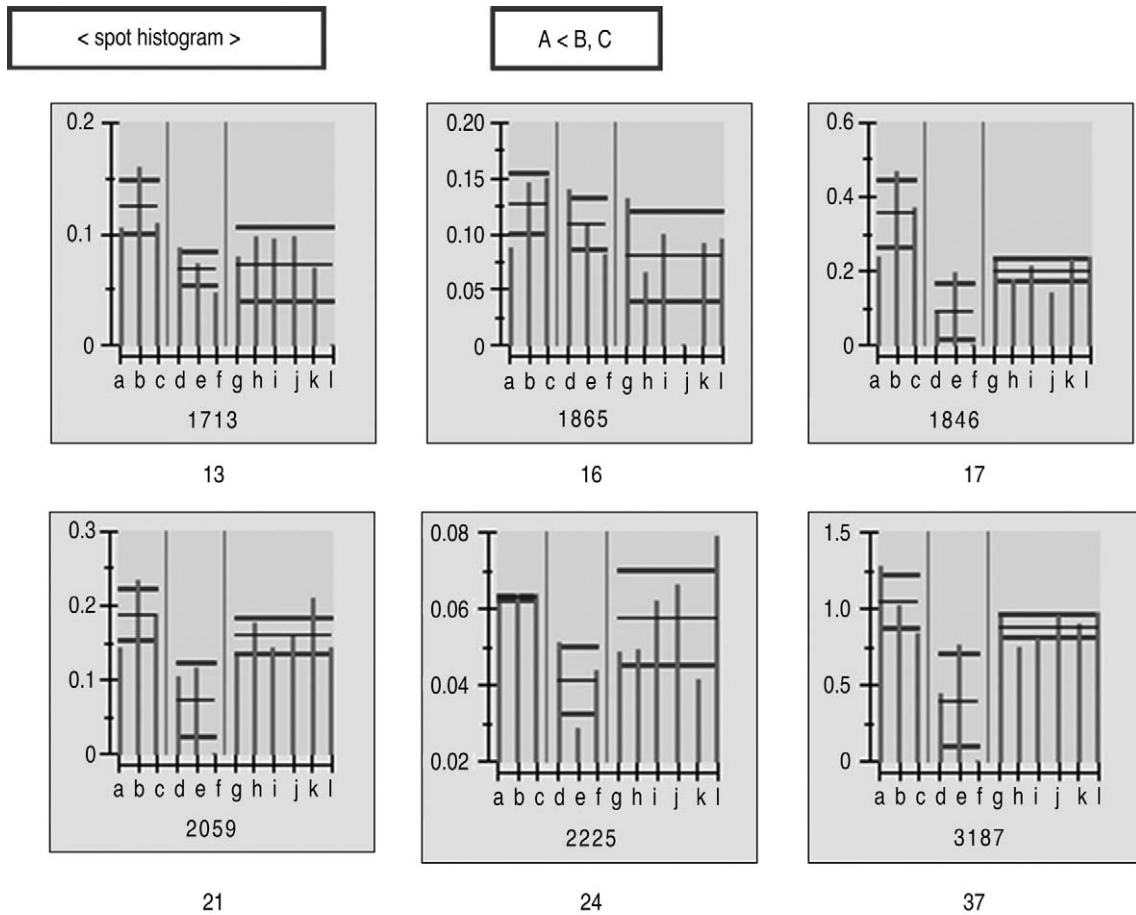


Fig. 1. Spot histogram I. A) a,b,c: normal control, B) d,e,f: myelomeningocele, C) g,h,i,j,k,l: cerebral palsy.

개의 단백질은 근조직을 구성하는 비특이적 단백질로서 실험 대상에서 제외하였다.

2. 유전자 발현

ACTA1은 뇌성마비 환자의 경직과의 연관성이 낮은 것으로 사료되어 DJ-1에 대하여 추가적으로 유전자 발현을 알아보고자 하였다. 생검한 근육의 일부를 이용하여 전체 RNA를 적출한 후 역전사 증합효소 연쇄반응을 시행한 결과, DJ-1 유전자의 발현이 대조군, 뇌성마비 환자군 및 척수수막류 환자군의 전체 대상에 있어서 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 수술 과정에서 채취한 근육조직을 이용하여 프로테오믹스 분석을 시행하였으며, 정량적으로 의미가 있는 15개의 단백질을 대상으로 한 결과 ACTA1 및 DJ-1을 중심으로 뇌성마비와의 연관성에 중점을 두고 연구를 진행하였다. 우선 ACTA1은 인체 게놈(human genome)에 분포하는 6개의 actin 유전자들 중 골격근을 구성하고 있으며, 변이의 발생으로 actin myopathy, myopathy with intranuclear rod 및 central core disease와 같은 질환과 연계되어 있는 것으로 알려져 있으며^{10,20)}, hypertrophic cardiomyopathy인 심근 질환에 관한 증례도 보

고된 바 있다²⁴⁾. 선천성 골격근 병변(congenital skeletal muscle myopathy)과 관련되어 100가지 이상의 ACTA1의 변이가 이미 밝혀진 바 있으며²⁵⁾, 골격근의 주요 성분인 actin과 관련되어

있다는 점에서 경직성 뇌성마비라는 하나의 질환과의 인과 관계를 찾기 어려울 것으로 사료된다. 따라서 비교적 비특이적인 물질이라고 생각할 수 있으며, 본 연구의 대상에서 배제하였다.

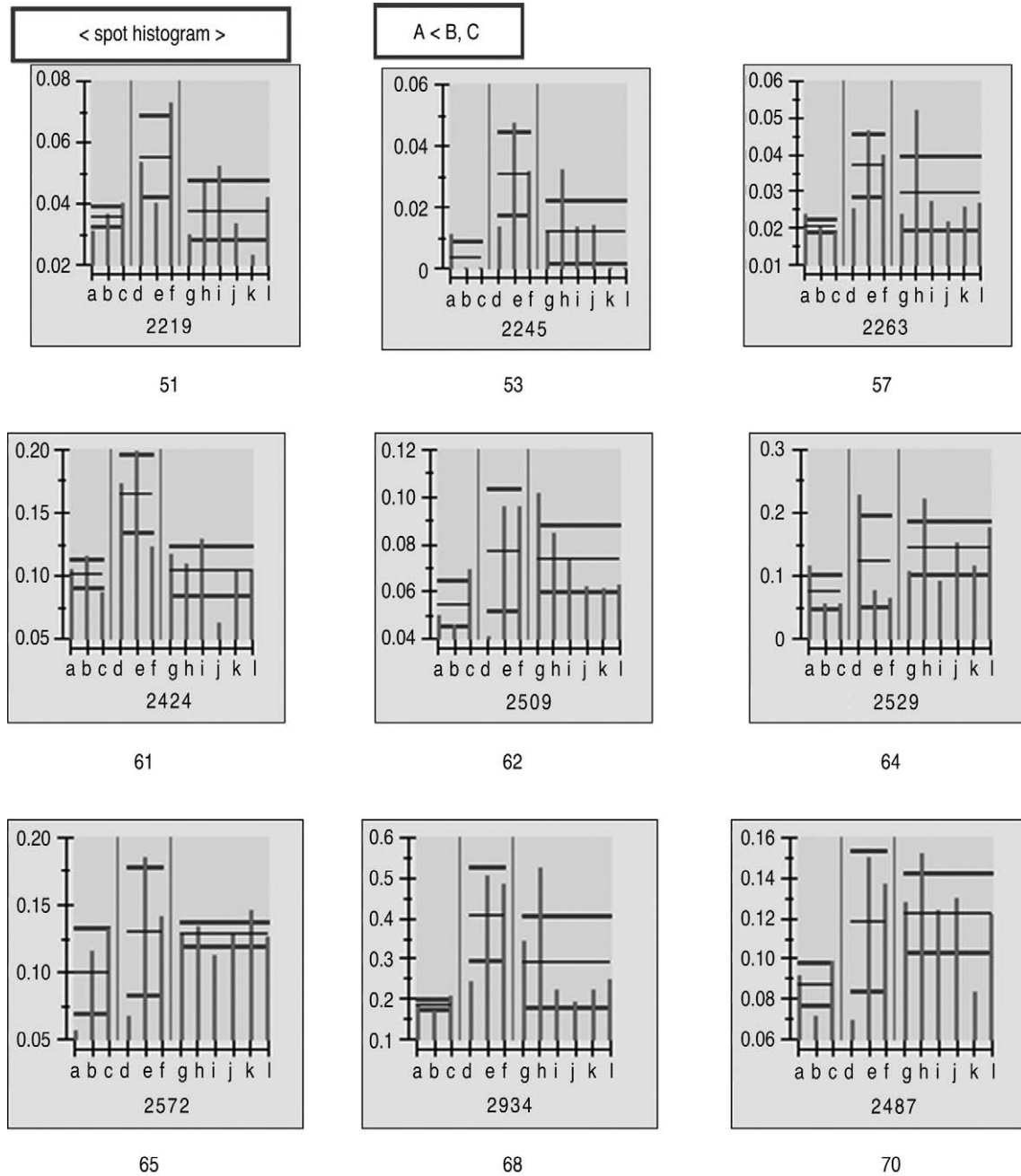


Fig. 2. Spot histogram II. A) a,b,c: normal control, B) d,e,f: myelomeningocele, C) g,h,i,j,k,l: cerebral palsy.

한편, DJ-1의 작용은 확실히 밝혀진 바 없으나 Human DJ-1은 처음에 유방암, 전립선암 및 흡연 유발 폐암에서 발현되는 종양유발인자(oncogene)로 알려졌고, 그 이후 regulatory subunit of an RNA-binding protein (RBP) 조절 인자로 밝혀진 물질로서 DJ-1은 PIAS (protein inhibitors of activated STAT) 즉, 다양한 전사 과정 인자의 활성을 조절하는 기능을 갖는다고 보고되었다. 또한 DJ-1은 hydroperoxide-responsive protein으로서 H₂O₂와 같은 산화 자극에 반응하여 항산화 단백질의 성격을 갖는다고 알려져 있다^{5,23}. 산화로 인한 손상(oxidative damage)은 신경 사멸(neuronal death)에 영향을 줄 수 있으며, 이러한 반응은 본 연구의 대상 질환인 뇌성마비 및 척수 수막류에도 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료되어 본 연구에서는 DJ-1을 대상으로 하여 추가적인 연구를 진행하였다. DJ-1은 정상인의 뇌조직에서도 발현될 수 있으나 퇴행성 신경질환 환자의 조직에서 발현되는데 현재까지 파킨슨 병 및 여러 기관의 위축을 보이는 질환에서 발견되었다^{1,14}. 현재까지 연구된

DJ-1과 파킨슨 병(Parkinson disease)의 관계는 특별한 신경 섬유 병리적 변화와 세포의 괴사는 결국 비정상 단백질의 축적과 연관이 있으며^{5,13,19}, 이러한 퇴행성 신경질환의 진행 과정에서 비정상적인 단백질의 축적에 반하여 세포 보호 기전이 활성화되는 것은 잘 알려진 사실이다². Chaperone machinery는 비정상 단백질의 축적에 저항하는 보호 시스템을 대변하는 것으로서 DJ-1의 chaperone 활동은 DJ-1이 보호 기전으로 작용한다는 사실을 암시한다.

DJ-1의 산화적 스트레스 반응(oxidative stress response)이 미치는 영향은 직접적으로 유전자 발현 수준에서 작용할 수 있으며, 혹은 전사 과정 이후의 단백질 발현 단계에서 영향을 줄 수 있다. 따라서 본 연구에서는 프로테옴 분석을 통한 단백질의 발현을 관찰하고 그 중 가장 의미가 있을 것으로 추정되는 DJ-1 단백질을 동정한 후에 역으로 유전자 수준에서 DJ-1의 발현을 확인하였고 유전자의 발현은 뇌성마비 환자에서 유의한 차이를 보이지 않음을 확인하였다. 따라서 DJ-1은 유전자 수준에서 뇌성마비 환자의 근육

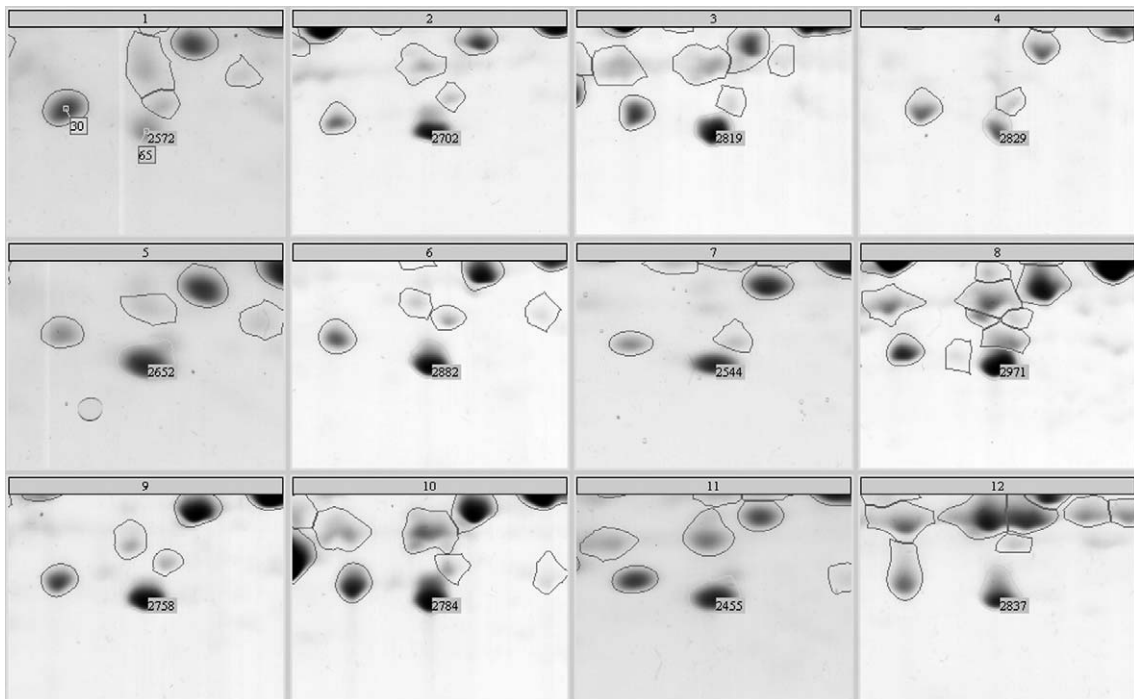


Fig. 3. The spot area of DJ-1 in all samples.

변화에 영향을 주지 않으며 단백질 발현 단계에서 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 이는 DJ-1의 발현이 기존의 파킨슨 병, 혹은 악성 종양에서 유전자 발현이 증가하는 것과 차이가 있으며, 따라서 뇌성마비 환자의 유전자 전사 후 단백질 발현에서 차이를 보이는 것으로 생각된다.

산화 스트레스의 정도 및 부적절한 항산화력은 질환의 진행에 있어서 중요한 역할을 하며¹⁷⁾, 항산화력의 저하는 미토콘드리아 관련 병변(mitochondrial disorder), 뇌경색(cerebral ischemia), 간질(epilepsy) 및 뇌성마비와 같은 뇌손상과 연관되는 질환에서의 하나의 병인으로서²⁶⁾ 신경 퇴행성 질환에서 항산화력과 신경 기능의 연관 관계에 다양한 연구가 진행되어 왔다⁷⁾. 처음 DJ-1과 파킨슨 병과의 연관 관계는 파킨슨병에서 보이는 유전자인 alpha-synuclein, Parkin 그리고 UCH-L1 등에 관한 연구에서 이 유전자들

이 Ubiquitin-proteasome 기능 장애를 나타내는 것을 밝혔으며²²⁾, 동시에 산화 스트레스가 파킨슨병에 있어 도파민 세포의 퇴화를 유발하는 일련의 과정을 나타내나 그 기전이 분명하지 않았다. 기존에 발암성 물질, 불임 등에 관련이 있는 것으로 알려졌던 DJ-1의 발현이 산화 스트레스 하에서 유발되는 것이 밝혀졌고, 2004년 Taira 등²⁴⁾은 DJ-1의 항산화 작용과 DJ-1 유전자의 변이가 세포 괴사를 유발하는 과정을 보고하였다. DJ-1과 파킨슨병과의 관계에서 DJ-1이 뇌성마비에서 노출된 산화 스트레스에 대한 반응을 연계시킬 수 있다⁸⁾.

본 연구자들은 뇌성마비 환자를 대상으로 시행된 선행 연구 결과 Ubiquitin 및 N-CAM 유전자의 발현에 관하여 유전자 수준에서는 대조군과 비교하여 실험군에서 발현의 차이를 관찰할 수 있었지만 이것은 조직화학검사와 연관성이 낮음을

Spot No. 65

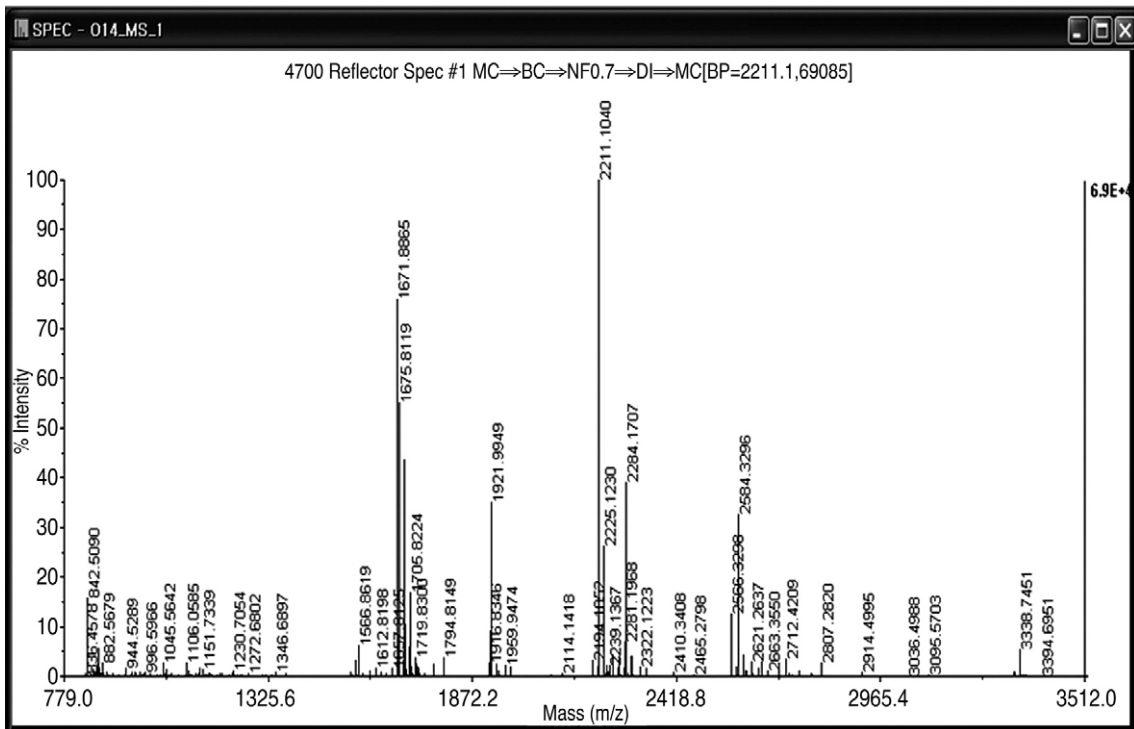


Fig. 4. MALDI-TOF spectrum of protein spot (DJ-1).

확인하였다. 이는 유전자 정보가 실질적인 질병의 발현과 완전히 일치되지 않는 결과를 보이는 것으로, 유전자 정보는 단지 정적인 정보만을 제공하며 동적인 세포의 실질적 발현에 관한 정보를 주지 못한다. 프로테옴 분석을 통하여 유전자와 단백질 그리고 질병의 관계를 파악하여 실제로 환자의 증상 발현과 연관된 보다 실제적인 접근을 가능하게 한다는 점에서 의의가 있다^{6,9,12,18,23,27}.

DJ-1 단백질의 발현과 관련하여 역으로 유전자 단계에서 DJ-1의 발현 정도를 확인하기 위하여 역전사 중합 연쇄 반응을 이용하였으며, 그 결과 전체 대상의 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 DJ-1의 발현이 기존의 파킨슨병 및 악성 종양 등의 질환에서와 달리 유전자 수준에서의 변이는 보이지 않으며, 전사 후 단백질 발현 단계에서 변화를 초래하였음을 의미하여 이러한 변화를 유발하는 과정에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 사료된다. 뇌성마비 환자에서 유전자 자체의 문제보다는 단백질 발현에 영향을 줄 수 있는 환경의 변화에 대한 개선을 통해 환자의 경직성에 영향을

줄 수 있는 요인을 밝히는 것이 실제 환자의 예후의 개선에 영향을 줄 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구의 한계는 환자 수가 많지 않은 점과 생검 부위가 동일 부위가 아닌 점 등이 있다. 또한 척수수막류 환자군도 함께 그 대상으로 하여 실험 결과에 영향을 줄 수 있다. 그러나 동물 실험이 아닌 인체를 대상으로 하였으므로 결과의 도출에 의의가 있을 것으로 생각이 되며, DJ-1의 발현이 기존의 연구에서 파킨슨병 및 악성 종양과의 연관성에 국한되어 있어 뇌성마비에 대해서는 기초 자료의 초석이 된다고 하겠다. 앞으로의 연구 방향은 DJ-1 단백질과 뇌성마비 질환의 직접적인 인과 관계의 분석을 위하여 질환을 유발하는 직접적인 기전에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

결 론

본 연구에서는 경직을 유발하는 뇌성마비 환자에 있어 단백질 발현 단계에서의 차이를 관찰하고자 하였다. 프로테옴 분석을 통하여 뇌성마비 환

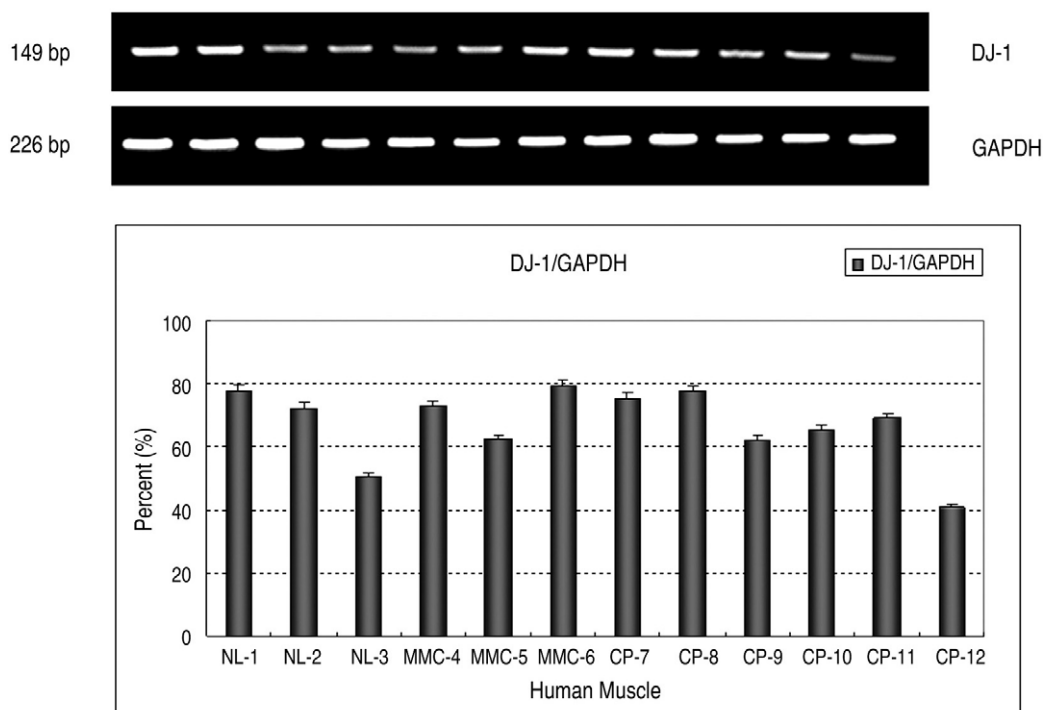


Fig. 5. DJ-1 gene expression.

자에서 DJ-1 단백질 발현이 우세함을 확인하였고, 이는 실제적인 단백질 발현 단계에서의 결과이며 유전자 수준에서는 대조군과 실험군에서 뚜렷한 차이를 보이지 않았으므로 유전자 전사 단계 이후의 변화로 사료된다.

REFERENCES

- 1) **Aycicek A and Iscan A:** Oxidative and antioxidative capacity in children with cerebral palsy. *Brain Res Bull*, 69(6): 666-668, 2006.
- 2) **Bast A and Goris RJ:** Oxidative stress. Biochemistry and human disease. *Pharm Weekbl Sci*, 11(6):199-206, 1989.
- 3) **Blackstock WP and Weir MP:** Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol*, 17(3): 121-127, 1999.
- 4) **Bonifati V, Rizzu P, van Baren MJ, et al.:** Mutations in the DJ-1 gene associated with autosomal recessive early-onset parkinsonism. *Science*, 299(5604): 256-259, 2003.
- 5) **Choi J, Sullards MC, Olzmann JA, et al.:** Oxidative damage of DJ-1 is linked to sporadic Parkinson and Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 281(16): 10816-10824, 2006.
- 6) **D'Amico A, Graziano C, Pacileo G, et al.:** Fatal hypertrophic cardiomyopathy and nemaline myopathy with ACTA1 K336E mutation. *Neuromuscul Disord*, 16(9-10): 548-552, 2006.
- 7) **Gajendran N, Frey JR, Lefkovits I, et al.:** Proteomic analysis of secreted muscle components: search for factors involved in neuromuscular synapse formation. *Proteomics*, 2(11): 1601-1615, 2002.
- 8) **Hague S, Rogaeva E, Hernandez D, et al.:** Early-onset Parkinson's disease caused by a compound heterozygous DJ-1 mutation. *Ann Neurol*, 54(2): 271-274, 2003.
- 9) **Hutchinson DO, Charlton A, Laing NG, Ilkovski B and North KN:** Autosomal dominant nemaline myopathy with intranuclear rods due to mutation of the skeletal muscle ACTA1 gene: Clinical and pathological variability within a kindred. *Neuromuscul Disord*, 16(2): 113-121, 2006.
- 10) **Jenner P:** Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 53 Suppl. 3: S26-36, 2003.
- 11) **Jung SH, Hahn SB, Kong SY, Kim HW:** Expression of Ubiquitin and neural cell adhesion molecule in the muscles of spastic cerebral palsy patients. *J Korean Orthop Res Assoc*, 10: 35-44, 2007.
- 12) **Kainal AM, Ruschendorf F, Krause S, et al.:** Missense mutations of ACTA1 cause dominant congenital myopathy with cores. *J Med Genet*, 41(11): 842-848, 2004.
- 13) **Kulak W, Sobaniec W, Solowej E and Sobaniec H:** Antioxidant enzymes and lipid peroxides in children with cerebral palsy. *Life Sci*, 77(24): 3031-3036, 2005.
- 14) **Lee EH, Kim JC and Byun SY:** Proteome analysis of amniotic fluid by gradient 2-D PAGE. *Korean J Biotechnol Bioeng*, 18(1): 35-38, 2003.
- 15) **Lee SJ, Kim SJ, Kim IK, et al.:** Crystal structures of human DJ-1 and Escherichia coli Hsp31, which share an evolutionarily conserved domain. *J Biol Chem*, 278(45): 44552-44559, 2003.
- 16) **Li HM, Niki T, Taira T, Iquchi-Ariga SM and Ariga H:** Association of DJ-1 with chaperones and enhanced association and colonization with mitochondrial Hsp70 by oxidative stress. *Free Radic Res*, 39(10): 1091-1099, 2005.
- 17) **Marshall T and Williams KM:** The simplified technique of high resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Biomedical application in health and disease. *Electrophoresis*, 12(7-8): 461-471, 1991.
- 18) **Miller DW, Ahmad R, Hague S, et al.:** L166P Mutant DJ-1, causative for recessive Parkinson's disease, is degraded through the ubiquitin-proteasome system. *J Biol Chem*, 278(38): 36588-36595, 2003.

- 19) **Mutch L, Alberman E, Hagberg B, Kodama K and Perat MV:** Cerebral palsy epidemiology: where are we now and where are we going?. *Dev Med Child Neurol*, 34(9): 547-551, 1992.
- 20) **Neumann M, Muller V, Gorner K, Kretzschmar HA, Haass C and Kahle PJ:** Pathological properties of the Parkinson's disease associated protein DJ-1 in alpha-synucleinopathies and tauopathies: relevance for multiple system atrophy and Pick's disease. *Acta Neuropathol*, 107(6): 489-496, 2004.
- 21) **Plebani M:** Proteomics: the next revolution in laboratory medicine?. *Clin Chim Acta*, 357(2): 113-122, 2005.
- 22) **Rabilloud T:** Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics*, 2(1): 3-10, 2002.
- 23) **Srisomsap C and Subhasitanont P:** Detection of cathepsin B up-regulation in neoplastic thyroid tissues by proteomic analysis. *Proteomics*, 2(6): 706-712, 2002.
- 24) **Taira T, Saito Y, Niki T, Iguchi-Arigo SM, Takahashi K and Ariga H:** DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO Rep*, 5(2): 213-218, 2004.
- 25) **Takahashi-Niki K, Niki T, Taira T, Iguchi-Arigo SM and Ariga H:** Reduced anti-oxidative stress activities of DJ-1 mutants found in Parkinson's disease patients. *Biochem Biophys Res Commun*, 320(2): 389-397, 2004.
- 26) **Tryoen-Toth P, Richert S, Sohm B, et al.:** Proteomic consequences of a human mitochondrial tRNA mutation beyond the frame of mitochondrial translation. *J Biol Chem*, 278(27): 24314-24323, 2003.
- 27) **Wallefeld W, Krause S, Nowak KJ, et al.:** Severe nemaline myopathy caused by mutations of the stop codon of the skeletal muscle alpha actin gene (ACTA1), 16(9-10): 541-547, 2006.
- 28) **Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, et al.:** Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13: 19-50, 1996.