

모성 및 사회성 분리 백서 모델의 해마에서 유전자 칩을 이용한 유전자 발현 연구*

이희제**† · 손창희** · 곽형렬** · 이상현** · 한윤희**
김수영** · 박종익*** · 전완주** · 김성수**

Microarray Analysis of Gene Expression in Rat Hippocampus of Maternal Social Separation Model*

Hee Jae Lee, Ph.D.,**† Chang Hee Son, M.D.,** Hyong Ryol Kwak,**
Sang-Hyun Lee, M.S.,** Yoon Hee Han, M.D.,** Soo Young Kim, M.D.,**
Jong-Ik Park, M.D., Ph.D.,*** Wanjoo Chun, Ph.D.,** Sung-Soo Kim, M.D., Ph.D.**

ABSTRACT

Objectives : Alteration of hippocampus was demonstrated in the maternal social separation (MSS) pups, separated from dams on postnatal day (pnd) 14 and placed alone. Therefore, to understand the molecular events involved in the MSS, we have initiated a search for gene profiles that are up or down-regulated in the hippocampus of MSS pups.

Methods : Analysis of cDNA microarray was performed by using total RNA extracted from the hippocampus of control and MSS pups on pnd 17. Also, passive-avoidance test was demonstrated on pnd 35.

Results : Up-regulation of *Nedd4a* was observed in the hippocampus of MSS pups. Also, MSS rats showed less elongation of latency in passive avoidance test.

Conclusion : We suggest that environmental effects of MSS may be altered the neural and/or glial differentiation and synapse formation-related genes which may lead cognitive alterations in MSS rats.

KEY WORDS : Maternal social separation · Microarray · *Nedd4a* · Memory.

*본 연구는 2005년도 학술진흥재단 선도연구자지원 사업(KRF-2005-C00387) 및 강원대학교 일반연구지원 사업에 의해 수행되었음.

**강원대학교 의과대학 약리학교실

Department of Pharmacology, College of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

***강원대학교 의과대학 정신과학교실

Department of Psychiatry, College of Medicine, Kangwon National University, Chuncheon, Korea

†교신저자 : 이희제, 200-701 강원도 춘천시 효자동 1

전화) (033) 250-8852, 전송) (033) 242-7571, E-mail) heejaelee@kangwon.ac.kr

서 론

발달초기의 모성 분리(maternal separation), 사회성 분리(social separation), 학대(abuse) 등의 이상 경험들은 신경 또는 내분비 발달과정에서 다양한 신경생물학적 요인들과 행동의 이상 변화를 수반할 수 있다.¹⁾²⁾ 생후 초기에 어미로부터 분리된 흰쥐 새끼들을 대상으로 한 선행 연구들에서 뇌 발달과정을 포함한 다양한 생리학적 변화들이 일어나는 것으로 보고되었으며,³⁾⁴⁾ 이러한 이별 경험이 성장 후에도 행동 및 신경생리학적 이상에 영향을 미칠 것으로 여겨지고 있다.⁵⁻⁸⁾ 이처럼 어미로부터의 자극들이 많은 부분 새끼들의 생리적 항상성을 유지하도록 하나,⁹⁾ 생후 모성 분리, 모성 박탈(maternal deprivation), 또는 접촉(early handling) 등과 같이 새끼들을 어떻게 취급하였는가에 따라서, 혹은 새끼들의 처한 환경 또는 분리한 시간 등의 다양한 조건들에 따라서 발생과정을 이끄는 신경생물학적 시스템의 조절이 쥐의 경우에서 다양하게 달라질 수 있다.⁴⁾¹⁰⁾

최근에 glucocorticoid 분비 증가에 따른 신경독성의 증가, neurogenesis의 억제, 그리고 신경 가소성의 붕괴 등이 monoamine 가설의 모순을 극복하는 기분장애의 병태생리로 설명되고 있다. 이러한 관점에서, Lee 등¹¹⁾은 생후(postnatal day ; 이하 pnd) 14일째에 백서 새끼를 어미와 한배의 새끼들과 따로 분리(maternal social separation ; 이하 MSS) 한 동물모델을 기분장애의 동물모델로 제안하였다. 이들 연구 결과, pnd 14 때 MSS를 7일간 수행한 백서 새끼들의 경우 뇌의 해마부위에서 세포 증식(cell proliferation) 및 과립세포층(granule cell layer) 부피의 감소, 그리고 과립세포(granule cell)들의 세포사멸(apoptosis)이 증가하였으며, 이 효과들은 항우울제의 일종인 fluoxetine 처치를 통해 약화되는 것으로 알려졌다. 또한, Cho 등¹²⁾은 nitric oxide synthase의 발현이 MSS 군의 paraventricular nucleus에서 대조 군보다 감소되었음을 보고하였다. 최근에는 7일간 분리한 MSS 군에서 neuropeptide Y의 발현 감소와,¹³⁾ 반대로 해마에서 glucocorticoid 수용체들의 발현 증가 등이 보고되었다.¹⁴⁾ 또한, MSS 군들의 체중을 측정할 결과, 처음 이틀간은 체중이 감소하다가 3일째를 기점으로 다시 점진적으로 증가하여 정상치로 회복하는 것으로 알려졌다.¹³⁾ 이처럼, MSS에 따른 뇌의 신경생물학적 이상 변화, 체

중 감소, 이외에 어두운 곳으로 이동한 후 움직이지 않는 등¹¹⁾의 행동학적 이상 등을 종합하면 모성 및 사회성 분리 초기부터 신경 가소성에 이상이 수반될 것으로 생각되며, 이로 인해 인지기능에도 영향을 줄 것으로 사료된다.

그럼으로, 본 연구에서는 초기 모성 및 사회성 분리한 백서의 새끼의 해마 내 신경 가소성 관련 유전자 발현이 정상 군과 어떻게 차이가 나는지 알아보려고 한다. 이를 위해서, 분리한지 3일째에 새끼들의 뇌에서 해마를 적출한 다음, 유전자 칩 분석을 통해 발현이 증가 또는 감소하는 유전자들을 동정하였다. 또한, 이들 유전자 발현 이상이 차후 인지기능(cognitive function)에도 연관이 있는지 알아보기 위해 기억력(memory) 정도를 측정할 수 있는 수동 회피 행동 실험을 수행하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험동물 및 처치

본 연구를 위해 여덟 마리의 암컷과 네 마리 수컷 백서(Sprague-Dawley, 250~300 g ; Dae han Bio Link, Umsong, Korea) 들을 구입하여 교미시켰다. 실험동물은 기준 온도($22 \pm 2^\circ\text{C}$) 하에서 하루 12시간씩의 낮/밤 주기를 유지한 상태로 충분한 물과 사료를 제공하면서 사육하였다. 암컷의 임신 상태가 확인되었으면 수컷을 옮긴 후 출산할 때까지 관찰하였다. 출산 일을 생후(postnatal day ; 이하 pnd) 0일로 지정하였다. Pnd 14까지는 어미와 함께 사육한 후, 절반의 새끼들은 어미로부터 분리한 다음 각 사육상자에 한 마리씩 사육하였으며(MSS군), 나머지 새끼들(대조군)은 일주일 간 어미와 함께 더 사육한 다음 한 사육상자에 네 마리씩 어미와 분리하여 사육하였다. 모든 연구들은 미국 국립보건원에서 제시한 실험동물 관리 및 사용법(NIH publications No. 8-23)의 지침을 준수하였다.

2. RNA 추출

Pnd 17째 MSS 군(n=4)과 대조 군(n=4) 새끼들을 Zoletil 50TM(0.5ml/kg, i.p. ; Virbac Labs, Carros, France)로 마취시킨 후, 뇌에서 해마를 적출하였다. Total RNA는 Mini RNA isolation IITM kit(ZYMO Research, Orange, CA, USA)를 사용하여 회사에서 제공하는 실험방법을 따라서 추출하였다. 추출된 RNA의 정성 및 정량분석은 Agilent 2100 bioanalyzer(Agilent Technolo-

gies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하였다.

3. cDNA microarray

Minoally Post DNA labeling kit (Digital-Genomics, Seoul, Korea)를 사용하여 대조군과 MSS군에서 추출한 10 µg의 total RNA으로부터 형광 cDNA probe들을 제작하였다. 대조군의 total RNA 샘플에는 Cy3 dye를 붙였으며, MSS군의 total RNA 샘플에는 Cy5 dye를 붙였다. Twinchip™-rat 5.0k microarray (Digital-Genomics)에 각각의 형광 probe들을 45°C에서 14시간 동안 교잡(hybridization)하였으며, 비특이적 결합 probe들을 제거한 후, ScanArray 5000 scanner (Gsi Lumonics, Ottawa, Japan)를 사용해서 슬라이드를 스캔하였다. 각 점들의 Cy3와 Cy5 형광 세기는 GenePix Pro software (Axon Instruments, Foster city, CA, USA)를 사용해서 분석하였다. 결과치의 표준화(normalization)는 내재된 internal control gene들의 결과 치와 각 dye들의 전체 평균 세기 비(average intensity ratio; Cy3/Cy5=1.0)의 보정을 통해서 이루어졌다. 각 군에서 발현이 증가 또는 억제된 유전자들의 선택은 전체 평균 세기 비가 2 이상일 경우를 기준으로 하였다. 통계적 유의성을 위해 각 군들의 dye를 교환해서 반복 실험을 수행하였으며, 두 실험에서 모두 일치한 결과만을 최종적으로 선택하였다.

4. 역전사 중합효소 연쇄 반응(Reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR)

각 군의 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해, 1 µg의 total RNA, 2.5 µM oligo(dT), 1mM dNTP, 20U의 RNasin, 100unit의 AMV reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA), 그리고 RT reaction buffer (50mM Tris-HCl, pH 8.3, 50mM KCl, 5mM MgCl₂)를 혼합하여 42°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 각 샘플들의 반응 효율은 glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) 유전자 증폭 정도를 통해서 보정하였다.

Nedd4a 유전자의 중합효소 연쇄 반응은 1 µl의 cDNA, 10pmol의 시발체(F: 5'-ggtatgggagttctgtctg-3', R: 5'-gagagggacatccacttgac-3'), 250 µM dNTP, 1X reaction buffer (7.5mM Tris-HCl, pH 9.0, 1.5mM Ammonium sulfate, 0.1mg/ml BSA, and 2.5mM MgCl₂),

1U Hot-start *Taq* DNA polymerase (Intron biotechnology, Sungnam, Korea)들을 혼합한 후, 95°C에서 5분간 변성에 이어, 94°C 30초, 59°C 30초, 72°C 30초로 이루어진 30회 반응을 GeneAmp PCR system 2400 (Applied Biosystem, Singapore, Singapore)를 사용해서 수행하였다. 증폭된 산물들은 2% 한천 겔에서 전기영동을 수행한 후, ethidium bromide으로 염색한 다음 자외선 등을 통해서 가시화하였다. 가시화된 증폭물의 양의 정도는 imaging densitometer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

5. 수동 회피 행동 실험(Passive avoidance test)

Passive avoidance test 기구(Gemini, SD Instruments, San Diego, CA, USA)는 두 개의 칸(25×25×35cm)이 가운데 활판 문으로 연결된 구조로 되어 있다. 한 쪽은 100W 등이 달린 밝은 칸이며, 다른 쪽은 암실로 되어 있으며 바닥은 전기 충격 발생기와 연결되어 있는 철판으로 구성되어 있다. 모성 및 사회성 분리를 수행한지 3주 후, 각 쥐들(각각 n=9)은 pre-training trial로 밝은 칸에 180초간 적응시켰다. 24시간 후, 다시 밝은 칸에 넣은 다음 어두운 칸에 들어가면 활판 문을 닫고 1mA scrambled foot shock를 2초간 가하였다. 다시 24시간 후, 동일한 방법으로 쥐를 밝은 칸에 넣고 어두운 칸으로 들어갈 때까지의 잠재 시간을 측정하였다. 실험은 최장 300초를 기준으로 수행하였다.

6. 통계 분석

모든 통계분석은 SPSS ver 12.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 수행하였다. RT-PCR를 통한 증폭량 비교 분석은 student's t-test를 이용하여 검증하였으며, passive avoidance test에서의 통계 분석은 Mann-Whitney's U test를 통해서 검증하였다. 모두 p value가 0.05 이하일 경우 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다. 결과 치는 평균±표준오차(S.E.M.)로 표시하였다.

결 과

1. 유전자 칩 발현 분석 결과

백서 뇌의 해마 부위에서 모성 및 사회성 분리(maternal social separation: 이하 MSS)에 의한 유전자 발현

프로파일을 사정하기 위하여 유전자 칩을 통한 발현 분석을 반복적으로 수행하였다(그림 1). 초록색 점들은 Cy3 dye로 라벨 되었으며, MSS군들보다 과 발현된 대조군의 유전자들이고, 빨간색 점들은 Cy5 dye로 라벨 되었으며, 대조 군보다 과 발현된 MSS군의 유전자들을 나타낸다. 노란색 점들은 대조군과 MSS군 사이에서 발현 정도 차이가 없는 유전자들이다. 이들 결과 치를 보정한 후, normalized intensity ratio의 차이가 2 이상인 것을 유의한 것으로 판단하여 발현의 차이를 나타내는 유전자들로 선택하였다.

γ -glutamyl carboxylase(*Ggcx*), neural precursor cell expressed developmentally down-regulated gene

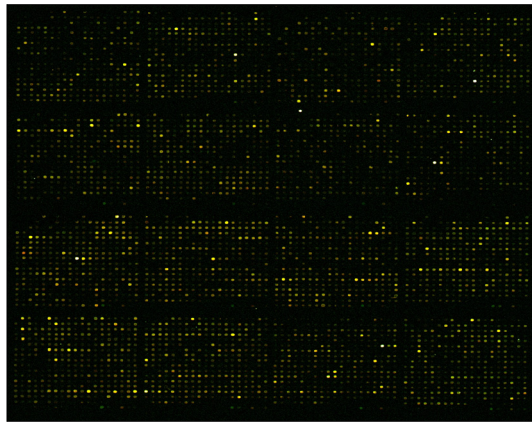


Fig. 1. Expression patterns of hippocampal genes between controls and maternal social separation (MSS) group in a 5.0k Rat cDNA microarray 3 days after MSS. Cy3 : Vehicle group, Cy5 : MSS group.

4A(*Nedd4a*), dihydropyrimidinase-like 3(*Dpysl3*), ATP synthase(*Atp5o*), biglycan(*Bgn*) 등 다섯 개의 유전자들의 발현 수준이 대조군과 비교해 MSS군에서 증가한 것으로 나타났다(표 1). 다른 한편, myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to 3(*Mllt3*), mannosyl(α -1, 6-)-glycoprotein β -1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase(*Mgat2*), peroxisome proliferators activated receptor gamma(*Pparg*), hydroxyl- δ -5-steroid dehydrogenase, 3 β -and steroid δ -isomerase 1(*Hsd3b1*) 등 네 개의 유전자들의 발현 수준이 대조 군과 비교해서 MSS군에서 감소한 것으로 나타났다(표 2).

MSS군에서 상향 또는 하향 조절된 유전자들 가운데 유전자 기능을 살펴본 결과, 신경 가소성과 가장 연관성이 있는 *Nedd4a*를 선택하였으며, RT-PCR 분석을 통해 유전자 칩의 결과에 대한 재 검증을 수행하였다. 그림 2에서 보이는 바와 같이 유전자 칩 발현 분석 결과와 유사하게 *Nedd4a* 발현 수준이 MSS 군에서 대조 군보다 증가하였다. 발현 밀도를 측정해 본 결과 대조 군과 MSS 군 사이에 유의한 차이가 관찰되었다[MSS/controls(mean \pm S.D.), 3,444.2 \pm 21.2% ; p<0.001].

2. 수동 회피 행동 실험(Passive avoidance test) 결과

모성 및 사회성 분리의 효과가 학습과 기억에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 3주간 분리된 쥐들을 사용하여 수동 회피 행동 실험을 수행하였다. 생리적으로 빛에 길항함에도 불구하고 암실에 들어갈 때까지의 잠재 시간이 대조 군에 비해 MSS 군이 유의하게 짧았다(p=0.026).

Table 1. List of up-regulated genes after 3 days in hippocampus of maternal social separation group

Symbol	Gene name	Cytoband	M-value
Ggcx	Gamma-glutamyl carboxylase	4q33	1.60
Nedd4a	Neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4A	8q24	1.40
Dpysl3	Dihydropyrimidinase-like 3	18p11	1.30
ATP5o	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	11q11	1.23
Bgn	Biglycan	Xq37.2	1.14

Table 2. List of down-regulated genes after 3 days in hippocampus of maternal social separation group

Symbol	Gene name	Cytoband	M-value
Mllt3	Trithorax(Drosophila) homolog	5q32	-1.53
Mgat2	Mannosyl(α -1,6-)-glycoprotein β -1, 2-N-acetylglucosaminyltransferase	6q24	-1.45
Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor	4q42	-1.22
Hsd3b1	Hydroxyl- δ -5-steroid dehydrogenase, 3 β -and steroid δ isomerase 1	2q34	-107

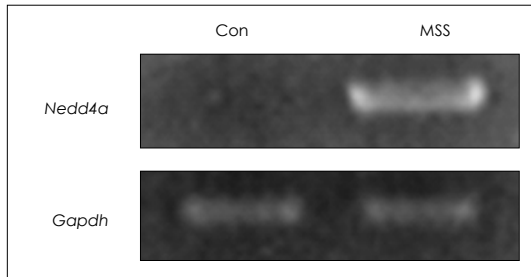


Fig. 2. Confirmation of cDNA microarray results of *Nedd4a* by RT-PCR. As an internal control, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) was amplified.

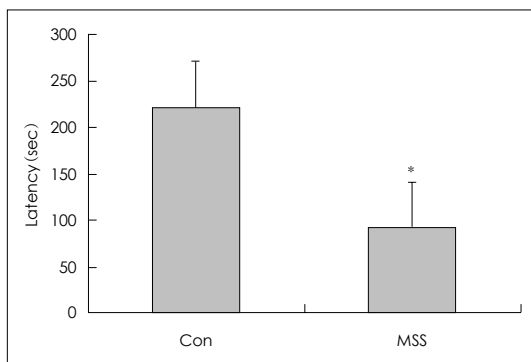


Fig. 3. Comparison between controls (Con) and maternal social separation (MSS) group on the passive avoidance test. * : $p=0.026$ (Mann-Whitney U-test).

고 찰

어미로부터 새끼를 분리함으로써 극심한 스트레스를 새끼에게 가하는 모델은 신뢰성 있는 기분장애 동물 모델 가운데 하나로 제시되어 왔다.²⁾ Lee 등¹¹⁾은 생후 14일에 어미와 분리하여 단독으로 사육한 새끼 쥐들에서 해마의 신경 세포 발달 과정에 이상을 유발하나 항우울제 투여로 인하여 완화 되었다고 보고하였다. Anderson 등¹⁵⁾은 만성적으로 어미와 분리한 흰쥐 새끼들의 변연계에서 serotonin과 norepinephrine의 감소를 보고하였으며, Katz 등¹⁶⁾은 흰쥐에서 모성 분리 후에 serotonin 수용체를 매개로 한 성장 호르몬의 감소를 보고하였다. 이처럼 유아기 동안 모성 분리에 의한 신경발달의 이상은 스트레스 매개 경로 혹은 단순히 신경발달 과정의 중단에 기인해서 이루어질 것으로 사료된다.¹⁷⁾

본 연구에서도 생후 14일에 모성 및 사회성 분리한 백서 모델을 사용하였으며, 분리한지 3일째의 새끼를 대상

으로 해마에서의 유전자 발현 차이를 탐색하였다. 백서의 경우, 생후 14일에 눈을 뜬으로 어미의 돌봄 없이도 독립적으로 생존할 수 있으나, 신경의 분화는 미완성 상태이다. Zimmer²⁶⁾의 연구에 따르면 백서는 생후 17일이 되어서야 해마의 mossy fiber system이 완성된다고 한다. Mossy fibers는 치상 과립세포(dentate granule cell)들의 축삭 돌기로 치랑문(dentate hilus ; CA4)의 추체세포와 CA3 추체 세포들에 방사되어 있으므로, 이 시기에 치랑골-CA4와 치랑골-CA3 영역에서 mossy fiber와의 연결이 완성되는 것이 학습 및 공간 기억력에 있어 특별히 중요할 것으로 사료된다. 한편, Lim 등¹³⁾의 결과에 의하면 모성 및 사회성 분리 후 3일째까지 새끼들의 체중이 감소하였고 정동 상태를 유지하는 등 초기에 생리적 교란이 수반된 것으로 사료되었다. 종합해 보면 3일 동안의 극심한 환경적 변화는 다양한 유전자들의 발현 변화를 유발할 수 있을 것이며, 특히 신경 가소성 관련 유전자들의 발현 이상을 수반할 수 있다. 본 연구 결과 해마에서 *Nedd4a* 유전자 발현이 MSS군에서 대조군에 비하여 유의하게 차이가 나는 것을 확인하였다. *Nedd4*는 ubiquitin ligase family에 속해 있으며 초기 배 발생기의 중추신경계에서 하향 조절되는 유전자로 알려져 있고,¹⁸⁾ C 말단 부위에 N-terminal calcium-dependent lipid binding domain (C2), specific protein-protein interaction domain (WW), ubiquitin-protein ligase domain (HECT)로 구성되어 있다.¹⁹⁾ 선행 연구 결과들에 의하면, *Nedd4*는 전사 조절,²⁰⁾²¹⁾ sodium channel 안정성과,²²⁾²³⁾ axon guidance²⁴⁾에 관여하는 것으로 밝혀져 있다. 또한, Anan 등²⁵⁾은 *Nedd4*가 SMS-KCN neuroblastoma 세포들에서 분화하는 동안 하향 조절되는 것으로 보고하였다. 선행 연구¹¹⁾에서 보고된 치상골(dentate gyrus) 부피의 이상, 치상 과립 세포의 사멸 등이 신경 발생 단계에서 비록 하나의 유전자 발현 변화에 의해서만 이루어지는 것은 아니지만 부적절하게 발현되는 *Nedd4*와 연관성이 있을 수 있을 것으로 사료된다.

과 발현된 *Nedd4*에 의한 영향이 차후 기억 및 학습 행동 장애와 연관이 되는지 알아보기 위하여 생후 35일에 기억과 연관된 수동 회피 행동 실험을 수행하였다. 쥐의 경우, 생후 2주간 동안 치상골(dentate gyrus)의 과립 신경세포들이 대부분 생성되나, 시냅스는 생후 30일까지 어른 정도의 수준으로 그 수가 기하급수적으로 증가함으로써 본 연구에서도 생후 35일에 수동 회피 행동 실험을

수행하였다. 실험 결과, MSS 쥐들에서 잠재 시간이 짧게 나타났으며 이는 일반적으로 학습 장애를 의미한다. 해마에서 mossy fiber의 시냅스전 기능²⁷⁾이나 신경 가소성의 이상²⁸⁾은 해마 의존적인 기억 악화를 수반하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 모성 및 사회성 분리가 시냅스 형성 관련 유전자 발현 변화에 영향을 미쳐 이로 인한 학습 능력의 이상을 야기시킬 것으로 사료된다.

연구의 특성상 본 연구는 다음과 같은 제한점을 지니고 있다. 첫째, 본 연구에서 사용한 유전자 칩은 rat 5.0k cDNA 칩으로 인지할 수 있는 유전자의 종류들이 한정되어 있다. 둘째, 시간에 따른 유전자들의 변화 양상을 살펴보는 것이 매우 중요하나 본 연구에서는 한 시점에서만 관찰하였다. 셋째, 하나의 유전자의 변화로 신경 가소성 이상에 의한 인지기능의 악화를 일반화 하기에는 한계가 있다. 넷째, 생후 17일째 및 생후 35일째의 뇌에서의 관련된 분자적, 구조적 변화를 비교 관찰하지 못하였다.

결론

유아기의 비정상적인 경험들이 우울증과 같은 기분장애에 대한 위험성을 증가시킬 수 있으므로, 모성 및 사회성 분리가 해마에 미치는 영향을 분자 수준에서 살펴보기 위하여, 본 연구에서는 유전자 칩을 이용하여 조절되는 유전자를 탐색하였다. 이들 중 모성 및 사회성 분리 새끼들의 해마에서 *Nedd4a* 유전자가 과 발현하는 것이 확인되었다. 또한, 모성 및 사회성 분리 모델에서의 경우 학습 및 기억에 관한 행동 시험결과에서 대조 군 간의 유의한 차이가 확인되었다. 그럼으로, 모성 및 사회성 분리 쥐들에서 인지기능이 감퇴된 것은 신경생화학적 이상에 의해 신경 혹은 교 세포의 분화 및 시냅스 형성이 원활하지 못하기 때문일 수도 있다.

중심 단어 : 모성 및 사회성 분리 · 유전자 칩 · *Nedd4a* · 기억.

참고문헌

1. Hofer MA. On the nature and consequences of early loss. *Psychosom MED* 1996;58:571-581.
2. Gilmer WS, McKinney WT. Early experience and depressive disorders: human and non-human primate studies. *J Affect Disord* 2003;75:97-113.

3. Mirescu C, Peters JD, Gould E. Early life experience alters response of adult Neurogenesis to stress. *Nature Neurosci* 2004;7:841-846.
4. Pryce CR, Ruedi-Bettschen D, Dettling AC, Weston A, Russig H, Ferger B, et al. Long-term effects of early-life environmental manipulations in rodents and primates: potential animal models in depression research. *Neurosci Biobehav Rev* 2005;29:649-674.
5. Matthews K, Wilkinson LS, Robbins TW. Repeated maternal separation of pre-weanling rats attenuates the behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood. *Physiol Behav* 1996;59:99-107.
6. Hall FS, Wilkinson LS, Humby T, Robbins TW. Maternal deprivation of neonatal rats produces enduring changes in dopamine function. *Synapse* 1999;32:37-43.
7. Matthews K, Robbins TW, Everitt BJ, Caine SB. Repeated neonatal maternal separation alters intravenous cocaine self-administration in adult rats. *Psychopharmacology* 1999;141:123-134.
8. Matthews K, Robbins TW. Early experience as a determinant of adult behavioral responses to reward: the effects of repeated maternal separation in the rat. *Neurosci Biobehav Rev* 2003;27:45-55.
9. Hofer MA. Early relationships as regulators of infant physiology and behavior. *Acta Paediatr* 1994;397:9-18.
10. Ruedi-Bettschen D, Pedersen EM, Feldon J, Pryce CR. Early deprivation under specific conditions leads to reduced interest in reward in adulthood in Wistar rats. *Behav Brain Res* 2005;156:297-310.
11. Lee HJ, Kim JW, Yim SV, Kim MJ, Kim SA, Kim YJ, et al. Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Mol Psychiatry* 2001;6:725-728.
12. Cho GJ, Kim SA, Lee HJ, Chung JH, Kim JW. Effects of maternal separation and fluoxetine treatment on expressions of nitric oxide synthase in hypothalamus of rat brain. *Korean J Psychopharmacol* 2002;13:262-268.
13. Lim S, Ryu YH, Kim ST, Hong MS, Park HJ. Acupuncture increases neuropeptide Y expression in hippocampus of maternally-separated rats. *Neurosci Lett* 2003;343:49-52.
14. Kim MJ, Kim HK, Kim BS, Yim SV. Melatonin increases cell proliferation in the dentate gyrus of maternally separated rats. *J Pineal Res* 2004;37:193-197.
15. Anderson SL, Lyss PJ, Dumont NI, Teicher MH. Early maternal separation produces enduring neurochemical and behavioral changes in rat: implication of child abuse. *Int Behav Neurosci Soc*;1998, Richmond, VA.
16. Katz LM, Nathan L, Kuhn CM, Schanberg SM. Inhibition of GH in maternal separation may be mediated through altered serotonergic activity at 5-HT2A and 5-HT2C receptors. *Psychoneuroendocrinology* 1996;21:219-235.
17. Francis DD, Meaney MJ. Maternal care and the development of stress responses. *Curr Opin Neurobiol* 1999;

- 9:128-134.
18. **Kumar S, Tomooka Y, Noda M.** Identification of a set of genes with developmentally down-regulated expression in the mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;185:1155-1561.
 19. **Ingham RJ, Gish G, Pawson T.** The Nedd4 family of E3 ubiquitin ligases: functional diversity with in a common modular architecture. *Oncogene* 2004;23:1972-1984.
 20. **Imhof MO, McDonnell DP.** Yeast RSP5 and its human homolog hRPF1 potentiate hormone-dependent activation of transcription by human progesterone and glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol* 1996;16:2594-2605.
 21. **Gava NR, Gava R, Ernekova K, Sudol M, Shen CJ.** Interaction of WW domains with haematopoietic transcription factor p45/NF-E2 and RNAPolymerase II. *J Biol Chem* 1997;272:24105-24108.
 22. **Staub O, Yeşer H, Plant PJ, Kim H, Ernst SA, Rotin D.** Immunolocalization of the ubiquitin-protein ligase Nedd4 in tissues expressing the epithelial Na⁺ channel (ENaC). *Am J Physiol* 1997;272:C1871-C1880.
 23. **Fotia AB, Ekberg J, Adams DJ, Cook DI, Poronnik P, Kumar S.** Regulation of neuronal voltage-gated sodium channels by the ubiquitin-protein ligases Nedd4 and Nedd4-2. *J Biol Chem* 2004;279:28930-28935.
 24. **Keleman K, Riberio C, Dickson BJ.** Comm function in commissural axon guidance: cell-autonomous sorting of Robo in vivo. *Nat Neurosci* 2005;8:156-163.
 25. **Anan T, Nagata Y, Koga H, Honda Y, Yabuki N, Miyamoto C, et al.** Human ubiquitin-protein ligase Nedd4: expression, subcellular localization and selective interaction with ubiquitin-conjugating enzymes. *Genes Cells* 1998;3:751-763.
 26. **Zimmer J.** Development of the hippocampus and fascia dentate: Morphological and histochemical aspects. In: Corner MA, editor. *Maturation of the Nervous System. Progress in Brain Research, Vol 48.* Amsterdam: Elsevier/North Holland Press;1978.
 27. **Dumas TC, Powers EC, Tarapore PE, Sapolsky RM.** Overexpression of calbindin D28k in dentate gyrus granule cells alters mossy fiber presynaptic function and impairs hippocampal-dependent memory. *Hippocampus* 2004;14:701-709.
 28. **Ferguson GD, Wang H, Herschman HR, Storm DR.** Altered hippocampal short-term plasticity and associative memory in synaptotagmin IV (-/-) mice. *Hippocampus* 2004;14:964-974.