

에탄올 처리에 의한 흰쥐 신경아교종(Glioma)

세포에서의 유전자 발현

- DNA 칩을 이용한 분석 -

이소희¹⁾ · 오동열²⁾ · 한진희³⁾ · 최인근⁴⁾ · 전양환⁵⁾
이준노⁶⁾ · 이태경⁶⁾ · 정종현³⁾ · 정경화⁷⁾ · 채영규^{7)†}

Microarray Analysis of Gene Expression in Rat Glioma after Ethanol Treatment

So Hee Lee, M.D., Ph.D.,¹⁾ Dong-Yul Oh, M.D., Ph.D.,²⁾ Jin-Hee Han, M.D., Ph.D.,³⁾
Ihn-Geun Choi, M.D., Ph.D.,⁴⁾ Yang-Wan Jeon, M.D., Ph.D.,⁵⁾ Joon-Noh Lee, M.D., Ph.D.,⁶⁾
Tae Kyung Lee, M.D., Ph.D.,⁶⁾ Jong-Hyun Jeong, M.D., Ph.D.,³⁾
Kyung Hwa Jung, Ph.D.,⁷⁾ Young-Gyu Chai, Ph.D.^{7)†}

ABSTRACT

Objectives : Identification of target genes for ethanol in neurons is important for understanding its molecular and cellular mechanism of action and the neuropathological changes seen in alcoholics. The purpose of this study is to identify of altered gene expression after acute treatment of ethanol in rat glioma cells.

Methods : We used high density cDNA microarray chip to measure the expression patterns of multiple genes in cultured rat glioma cells. DNA microarrays allow for the simultaneous measurement of the expression of several hundreds of genes.

Results : After comparing hybridized signals between control and ethanol treated groups, we found that treatment with ethanol increased the expression of 15 genes and decreased the expression of 12 genes. Upregulated genes included Orthodenticle(Drosophila) homolog 1, procollagen type II, adenosine A2a receptor, GATA-

¹⁾국립의료원 정신과 *Department of Psychiatry, National Medical Center, Seoul, Korea*

²⁾관동대학교 의과대학 명지병원 정신과학교실

Department of Psychiatry, Myongji Hospital, College of Medicine, Kwandong University, Goyang, Korea

³⁾카톨릭대학교 의과대학 성빈센트병원 정신과학교실

Department Neuropsychiatry, St. Vincent Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Suwon, Korea

⁴⁾한림대학교 의과대학 한강성심병원 정신과학교실

Department of Psychiatry, Han-Gang Sacred Heart Hospital, College of Medicine, Hallym University, Seoul, Korea

⁵⁾카톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 정신과학교실 *Department Neuropsychiatry, Our Lady of Mercy Hospital, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Incheon, Korea*

⁶⁾국립서울병원 정신과 *Seoul National Hospital, Seoul, Korea*

⁷⁾한양대학교 분자생명과학부

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Hanyang University College of Sciences, Ansan, Korea

†교신저자 : 오동열, 412-270 경기도 고양시 덕양구 화정동 697-24

전화) (031) 810-5114, 전송) (031) 962-4902, E-mail) dongyulo@chollian.net

binding protein 2. Downregulated genes included diacylglycerol kinase beta, PRKC, Protein phosphatase 1, clathrin-associated protein 17, nucleoporin p58, proteasome.

Conclusion : The gene changes noted were those related to the regulation of transcription, signal transduction, second messenger systems, modulation of ischemic brain injury, and neurodegeneration. Although some of the genes were previously known to be ethanol responsive, we have for the most part identified novel genes involved in the brain response to ethanol.

KEY WORDS : DNA microarray · Ethanol · Brain · Gene expression · Rat glioma.

서 론

알코올 남용은 내성(tolerance), 의존(dependence), 강화(reinforcement), 감각화(sensitization), 갈망(craving)과 같은 다양한 부정적 결과를 초래하고¹⁾ 장기적으로 여러 장기에 독성을 일으켜 병의 이환(morbidity)과 사망(mortality)으로 이끌기도 한다. 이러한 에탄올의 작용을 세포 수준에서 이해하고 알코올 중독 환자를 치료하기 위해서는 알코올에 반응하는 유전자 혹은 반응 경로를 알아내는 것이 필요하다.²⁾

에탄올에 의한 유전자 표현에서 가장 많이 연구된 것은 글루타메이트(glutamate)나 가바(γ -aminobutyric acid, GABA)이다. 이러한 수용체는 에탄올에 노출된 급성기의 중독(intoxication) 효과 뿐 아니라³⁻⁶⁾ 만성적으로 노출되었을 때 내성과 의존의 발생에 관여하는 것으로 알려져 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 그밖에도 여러 알코올 반응 유전자가 발현차(differential display), northern blotting 그리고 경쟁적 중합효소연쇄반응(competitive polymerase chain reaction)을 이용한 연구에서 발견되어 왔으나, 알코올 의존과 같은 복잡한 현상에는 여러 가지 유전자가 관여하므로 한 개의 후보 유전자를 연구하는 고전적 연구 방법으로는 에탄올의 작용을 완전히 이해하기 어렵다. 최근에는 DNA array의 발달로 동시에 수천 수만개의 유전자의 표현을 검사하는 것이 가능하게 되었다.¹¹⁾

cDNA Microarray는 Northern blot의 역실험(Reverse Northern)이라고 할 수 있다. 즉, 특정 유전자 probe를 먼저 고정시키고 조직에서 얻은 mRNA를 가하여 발현양상을 조사하는 것과 같다. 이러한 방법은 신뢰도 문제와 절대적 수치가 아닌 상대적 비교치만 볼 수 있다는 극복해야 할 한계점을 가지고 있지만, Northern blot과 달리 수많은 유전자 probe를 동시에 사용할 수 있는 장점을 가진

획기적 유전자 발현 시스템으로서 정신질환을 비롯한 다양한 인성 질환에서 개인의 특정 질환에 대한 취약성, 병의 진단과 예후, 약물 치료의 표적, 특정 약물에 대한 개인 간 효과와 독성의 차이 등 다양한 분야에서 응용이 가능하다.¹²⁾

그 동안 oligo-DNA arrays를 이용한 알코올 관련 연구에서는 사람의 SH-SY5Y 신경모세포종(neuroblastoma) 세포에 있어서 알코올에 의해 유도된 유전자 표현의 변화가 연구된 바 있다.¹³⁾ 또, 알코올 선호 흰쥐(iP)와 비선호 흰쥐(iNP)의 해마에 있어 유전자의 차이가 연구되었고,¹⁴⁾ 알코올 의존인 사람의 뇌 부검 조직에서 기능적으로 관련된 유전자들이 microarrays를 사용하여 발견되었다.¹⁵⁾

본 연구에서는 알코올을 흰쥐의 신경아교종(glioma) 세포에 처리했을 때 급성기에 어떤 유전자의 발현을 조절하는지 DNA microarray를 이용하여 알아보고자 한다.

방 법

1. 세포 배양 및 에탄올 처리

흰쥐 신경아교종 C6 세포주는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% fetal bovine serum (10% FBS)과 100IU/I penicillin, 10 μ g/ml streptomycin을 첨가하여 습기를 보유한 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하였다. 세포는 2×10⁶ cell/10-mm plate로 되도록 polystyrene 세포 배양 접시에 분주하였으며, 24시간 동안 세포를 부착시켰다. 배지를 갈아주고 대조군은 증류수 10 μ l(8 plates), 실험군은 10% 에탄올(최종 농도 1%, 8 plates)을 처리하여 36시간 배양하였다.

2. 총 RNA 분리

총 RNA 분리는 Chomczynski와 Sacchi(1987)에 의해 개발된 single-step RNA 분리 방법(isolation met-

hod)를 개선한 TRIZOL(Invitrogen, Carlsbad, CA) 방법으로 수행하였다. 에탄올을 처리하고 36시간이 지난 후에 배지를 제거하고, 차가운 인산염 식염수(phosphate buffered saline) (PBS, pH 7.4)로 2회 세척한 후 1ml의 TRIZOL을 넣어 세포를 파쇄한다. 세포를 파쇄한 시료를 새로운 튜브에 옮긴 후 1ml의 클로로포름(Sigma, USA)를 첨가하여 단백질을 변성 시키고 15,000rpm 15분, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 회수하여 새로운 튜브에 옮겼다. 동량의 isopropyl alcohol(Sigma, USA)을 넣어 얼음에서 1시간 동안 방치하였다. 방치 후 15,000rpm, 15분, 4°C에서 원심분리하고 상층액을 제거한 후 75% 에탄올 1ml를 넣어서 잘 섞어 14,000rpm, 15분, 4°C에서 원심분리하였다. 상층액을 첨가하여 다시 원심분리하여 상층액을 모두 제거하였다. 튜브 아래의 응집체를 15분 동안 상온에서 건조시키고 DEPC(Amresco, Inc, USA) 처리된 3차 증류수 30 μ l를 첨가하여 녹였다. 분광편광계(Spectrophotometer VU 1601, Shimazu, Japan)를 이용하여 파장 260nm와 280nm로 흡광도를 측정하여 A260/A280의 값이 1.7 이상인지를 확인하였다.

3. cDNA microarray

유전자 발현 양상을 조사하기 위해 TwinChipTM Rat-5K(Digital Genomics Inc, Korea)를 이용하여 cDNA microarray를 수행하였다. PCR 튜브에 대조군 총 RNA와 실험군 총 RNA로 각각 annealing 반응 혼합물을 준비한 후, 70°C, 5분간 방치하고 튜브를 얼음으로 옮겼다. 새 튜브에 실험군과 대조군 각각의 반응액 [5 \times AMV RT buffer, low dT dNTP, 1mM Cy3(대조군), Cy5(실험군)-dUTP, Rnase inhibitor, AMV reverse transcriptase]를 준비하여, annealing 반응 혼합물에 각각 첨가하고 42°C에서 1시간동안 방치하였다. 0.5M EDTA 5 μ l를 넣어 반응을 중단시켰다. 각 튜브에 1N NaOH 10 μ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 방치한 후 1M Tris HCl 완충액을 25 μ l를 첨가하였다. 완충용액이 제거된 chromaspin column에 준비된 반응액을 넣고, 1,300rpm, 3분 동안 원심분리였다. 각각의 시료에 100% 알코올 300 μ l와 3M sodium acetate 10 μ l를 첨가하고 -70°C에서 30분간 방치한 후 12,000rpm, 15분, 4°C에서 원심분리하여 상층액을 완전히 제거하였다.

침전물을 건조한 후 20 μ l hybridization 완충액(25% formaldehyde, 5 \times SSC, 0.1% SDS)에 녹여 95°C에서 시

료를 5분간 끓인 후, pre-hybridization된 cDNA microarray의 표면에 부하한 후 커버 글라스를 덮고, hybridization chamber에 옮겨 58°C에서 16시간 동안 방치하였다. 58°C 제 1 세척완충액(2 \times SSC, 0.1% SDS)에 슬라이드를 넣어 커버글라스를 제거하고, microarray를 세척완충액에 넣고 42°C에서 5분간 방치하였다. 제 2 세척완충액(0.1 \times SSC, 0.1% SDS)에 microarray를 넣고 실온에서 1분간 방치하고, 이 과정을 4회 반복한다. 그 후 650 rpm, 5분간 원심분리하여 건조시켰다. Microarray scanning은 Packard 사의 Scanarrayseries Quantarray를 이용한 confocal laser scanning을 통하여 이미지를 얻은 후 GenePix 프로그램을 이용하여 각 유전자의 형광강도 정량 및 유전자 발현 양상을 분석하고 표준화(normalization)을 수행하였다.

이 연구에서는 Digital Genomics에서 제공한 TwinChipTM Rat-5K을 이용하여 실험하였고, 2회의 반복 실험으로 4회와 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 각 유전자 발현 자료는 에탄올을 처리한 군은 Cy5 염색약에 의한 붉은 색 신호로, 대조군은 Cy3 염색약에 의한 녹색 신호로 표시하여 두 이미지를 겹쳐서 표시하였다.

MA plot은 신호강도(signal intensity)와 Cy5/Cy3의 분포를 보여주는 산점도이다(그림 1). 가로축은 A, 세로축은 M 값을 나타내며, 일반적으로 A 값(신호강도)이 큰 경우에 그 자료가 더 정확한 값으로 생각할 수 있다. 신호강도가 클 경우 기술적 변이에 의한 자료의 변화가 상대적으로 적게 반영되기 때문이다. A와 M 값은 다음과 같은 식으로 계산된다.

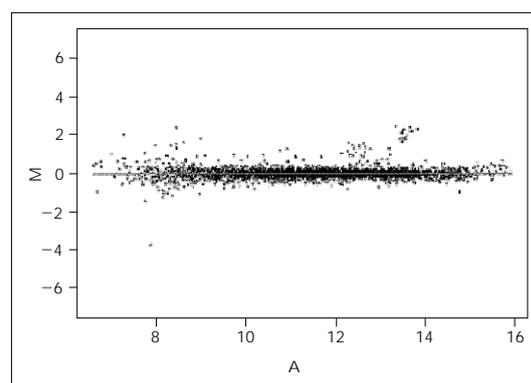


Fig. 1. The MA plot of cDNA microarray of C6 cells following treated with ethanol, $M = \log_2(CY5/CY3)$, $A = [\log_2(Cy5 \times Cy3)] / 2$ (Signal intensity).

$$M = \log_2(CY5/CY3)$$

$$A = [\log_2(Cy5XCy3)]/2(\text{Signal intensity})$$

이 연구에서 발현의 차이를 보이는 유전자 선정은 ± 1.6 배($M = \pm 0.8$)로 정하였다.

결 과

흰쥐의 신경아교종 C6 세포주에 에탄올을 처리한 군과 대조군간의 유전자 발현의 차이를 cDNA microarray를 사용하여 실험 후 비교 분석한 결과 에탄올이 처리된 군

에서 대조군에 비해 15개의 유전자가 발현이 증가하였고, 12개의 유전자가 발현이 감소하였다.

1. 발현이 증가한 유전자

발현이 증가한 유전자에는 1) GATA-binding protein 2, 2) adenosine A2a receptor(전사의 조절, DNA-dependent ; A2A 아데노신 수용체 활성화도, G-protein coupled), 3) procollagen, type II, alpha 1(세포접합 ; 세포 외기질 구조 구성성분), 4) Orthodenticle(Drosophila) homolog 1(전사의 조절, DNA-dependent, 발달 ; 전사 인자 활동)가 포함되어 있었다(표 1).

Table 1. The list of up-regulated genes of rat glioma C6 cell treated with ethanol

GenBank accession No.	Fold change	Gene name	Function
AI072009	0.8	Orthodenticle(Drosophila) homolog 1	Regulation of transcription ; brain development
AA924841	0.9	ESTs	Unknown
AA858847	0.9	ESTs	Unknown
AA899463	0.9	Procollagen, type II, alpha 1	Cell adhesion
AA924253	0.9	ESTs	Unknown
AA900572	0.9	ESTs	Unknown
AA963299	0.9	Adenosine A2a receptor	Regulation of transcription
AA818877	1.0	ESTs	Unknown
AA924831	1.0	ESTs	Unknown
AI111910	1.0	ESTs	Unknown
AA924713	1.0	ESTs	Unknown
AA899775	1.1	GATA-binding protein 2	Transcription factor, hematopoiesis
AA925524	1.1	ESTs	Unknown
AA924450	1.1	ESTs	Unknown
AA818770	1.8	ESTs	Unknown

Fold change : $\log_2(CY5/CY3)$

Table 2. The list of down-regulated genes of rat glioma C6 cell treated with ethanol

GenBank accession No.	Fold change	Gene name	Function
AA818983	-1.2	Diacylglycerol kinase beta, 90kDa	Protein kinase C activation
AA956914	-1.1	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	Neurodegeneration
AA925378	-1.1	EST	Unknown
AA818834	-1.0	Protein phosphatase 1	Unknown
AA924509	-1.0	ESTs	Unknown
AA956749	-0.9	Clathrin-associated protein 17	Unknown
AI071478	-0.8	Nucleoporin p58	Unknown
AA819260	-0.8	ESTs	Unknown
AA997517	-0.8	Proteasome(prosome, macropain)	Ubiquitin-dependent protein catabolism
AA899606	-0.8	ESTs	Unknown
AA818154	-0.8	ESTs	Unknown
AA924266	-0.8	ESTs	Unknown
AA859360	-0.8	ESTs	Unknown

Fold change : $\log_2(CY5/CY3)$

2. 발현이 감소한 유전자

발현이 감소한 유전자에는 1) diacylglycerol kinase beta, 90kDa(protein kinase C 활성화, 세포안에서의 신호전달 cascade : diacylglycerol kinase 활동), 2) PRKC, apoptosis, WT1, regulator, 3) Protein phosphatase 1, catalytic subunit, gamma isoform 1, 4) clathrin-associated protein 17, 5) nucleoporin p58, 6) proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 4(ubiquitin-의존 단백질 이화작용 ; proteasome endopeptidase 활동)가 포함되어 있었다(표 2).

고 찰

이 연구에서는 DNA 칩을 이용하여 에탄올을 흰쥐의 신경아교종 세포주에 처리했을 때 단기간에 일어난 유전자 발현의 변화를 알아보았다. 그 결과 17개의 유전자가 발현이 증가하였고, 15개의 유전자가 발현이 감소하였다.

Adenosine A2a receptor 유전자의 발현이 증가하였는데, 이 유전자는 전사(transcription)의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다. Nagy 등¹⁶⁾에 의하면 에탄올에 노출된 급성기에 뇌세포는, adenosine 유입을 억제함으로써, 세포외 adenosine을 증가시켜 adenosine A2 수용체를 활성화시키고 세포내 cAMP 수준을 증가시킨다고 한다. 그리고 이 반응은 adenosine 수용체의 길항제에 의해 억제 되는 것이 증명되었다.¹⁷⁾ 이후 Asher 등¹⁸⁾은 에탄올은 CREB(cAMP response element-binding protein)과 PKA(protein kinase A)에 의해 조절되는 cAMP-dependent gene expression을 유도하고, 이러한 신호경로가 알코올리즘에서 보이는 중독(addictive) 행동을 매개할 것이라고 제시하였다. 특히, Yao 등¹⁹⁾은, nucleus accumbens(NAc) 부위는 한 세포에 A2와 D2 수용체가 다 발현되므로 에탄올에 노출되면 상승 효과를 낸다고 하였다. 그리하여 비록 역치하의 에탄올에 노출되어도 cAMP/PKA 신호전달경로를 활성화하므로, NAc는 에탄올에 과민한 특성을 갖게 되며, 이 신호경로가 알코올리즘과 알코올 남용을 예방하고 치료하는 약물의 분자 수준의 표적(target)이 되어야 한다고 주장한 바 있다.

Proteasome(prosome, macropain) subunit, alpha type 4 유전자의 발현이 감소하였는데, 이 유전자는 ubiquitin-dependent protein catabolism과정에 관여하며, proteasome endopeptidase activity의 기능을 하는 것

으로 알려져 있다. 이는 Gutala 등²⁰⁾이 쥐의 뇌 피질에 에탄올을 장기적으로 투여한 결과 ubiquitin-proteasome 경로에 관여하는 유전자의 발현이 감소하였다고 보고한 것과 일치한다. proteasome은 polyubiquitinated protein을 분해하는데 관여하는 multicatalytic complex이다. 그 뿐 아니라 ubiquitin-proteasome 의존 체계는 시냅스의 성장과 여러 가지 후시냅스 단백질을 조절하여 뇌 기능의 변화에 직접적으로 관련되는 것으로 알려져 있다. proteasome이 억제되면 산화된 단백질이 뭉쳐져 단백질 조절에 장애가 유발되면 신경세포의 퇴행을 일으키고 결국 세포를 사망으로 이끈다고 한다. 이 결과는 Sokolov 등²¹⁾이 발표한 알코올 중독자의 사후 뇌 실험 결과와도 일치한다.

PRKC, apoptosis, WT1, regulator 유전자의 발현이 감소하였는데, Par-4(prostate apoptosis response-4)는 leucine zipper protein 으로서 pro-apoptotic 기능을 가지고 있으며, 알츠하이머성 치매에 있어서 신경세포의 퇴행과 연관되어 있다.²¹⁾

또, Orthodenticle(Drosophila) homolog 1 유전자의 발현이 증가되었는데, homeobox-containing gene의 기능이 상실되면 뇌의 발달에 영향을 주고 간질 발작이 유발되는 것을 그려져 있다.²³⁾ 그리고 이 유전자는 혈액 세포의 생성에도 관여한다고 한다.²³⁾

종합하여 보면 흰쥐의 신경아교종 세포주에 알코올을 처리하였을 때 급성기에 알코올에 반응하여 발현이 증가하거나 감소한 유전자는 전반적으로 전사의 조절, 신호전달체계, 허혈성 뇌손상의 중재, 신경세포의 퇴행에 관여하는 것들이었다. 이 연구에서는 유전자 발현 시스템을 이용하여 에탄올에 반응하는 가능성 있는 새로운 유전자들을 관찰할 수 있었다.

그러나, 이 연구의 제한점으로, cDNA chip은 선별 도구(screening tool)로서 상당히 많은 false-positive를 가지고 있으므로, Northern blot이나 realtime RT-PCR 등으로 확인하여야 함에도 불구하고 그 과정이 없다는 것들을 수 있다. 이에 대해서는 추가 실험이 필요할 것이다.

향후, 알코올에 대한 감수성의 차이, 알코올 처리 기간의 차이, 다른 부위의 조직, 알코올의 여러 농도에 따른 반복적 실험과 기능 분석을 하는 연구가 필요할 것으로 사료된다. 그럼으로써, 알코올의존에 내재된 분자생물학적 기전을 이해하고, 알코올리즘의 치료 약물의 새로운 표적을 알아내는 것이 필요할 것이다.

요 약

연구목적 :

알코올의존에 내재된 분자생물학적 기전을 이해하고 알코올리즘 치료 약물의 새로운 표적을 알아내기 위해서는, 알코올에 반응하는 유전자 혹은 반응 경로를 알아내는 것이 필요하다. DNA microarray 기법의 발달로 고전적 연구 방법과 달리 동시에 수천 수만개의 유전자의 표현을 검사하는 것이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 알코올을 흰쥐의 신경아교종 세포에 처리했을 때 어떤 유전자의 발현을 조절하는지 DNA microarray를 이용하여 알아보고자 하였다.

방 법 :

흰쥐 신경아교종 C6 세포주를 배양하여 에탄올 처리하고 총 RNA를 분리한 후 유전자 발현 양상을 조사하기 위해 cDNA microarray를 수행하였다.

결 과 :

에탄올 처리군과 대조군간의 유전자 발현의 차이를 비교 분석한 결과 에탄올이 처리된 군에서 대조군에 비해 15개의 유전자가 발현이 증가하였고 12개의 유전자가 발현이 감소하였다. 발현이 증가한 유전자는 Orthodenticle(Drosophila) homolog 1, procollagen type II, adenosine A2a receptor, GATA-binding protein2를 포함하고 있었고, 발현이 감소한 유전자는 diacylglycerol kinase beta, PRKC, Protein phosphatase 1, clathrin-associated protein 17, nucleoporin p58, proteasome를 포함하였다.

결 론 :

흰쥐의 신경아교종 세포주에 알코올을 처리하였을 때 급성기에 알코올에 반응하여 발현이 증가하거나 감소한 유전자는 전반적으로 전사의 조절, 신호전달체계, 허혈성 뇌손상의 중재, 신경세포의 퇴행에 관여하는 것들이었다. 본 연구는 유전자 발현 시스템을 이용하여 에탄올에 반응하는 새로운 후보 유전자들을 관찰하였다는데 의의가 있다.

중심 단어 : DNA microarray · 에탄올 · 뇌 · 유전자 발현 · 흰쥐 신경아교종.

참고문헌

1. Mayfield RD, Lewohl JM, Dodd PR, Herlihy A, Liu J, Harris RA. Patterns of gene expression are altered in the frontal and motor cortices of human alcoholics. *J Neurochem* 2002;81:802-813.
2. Nestler EJ, Aghajanian GK. Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 1997;278:58-63.
3. Lovinger DM, White G, Weight FF. Ethanol inhibition of neuronal glutamate receptor function. *Ann Med* 1990; 22:247-252.
4. Mihic SJ, Ye Q, Wick MJ, Koltchine VV, Krasowski MD, Finn SE, et al. Sites of alcohol and volatile anaesthetic action on GABAA and glycine receptors. *Nature* 1997;389:385-389.
5. Ticku MK. Alcohol and GABA-benzodiazepine receptor function. *Ann Med* 1990;22:241-246.
6. Wafford KA, Burnett DM, Dunwiddie TV, Harris RA. Genetic differences in the ethanol sensitivity of GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1990; 249:291-293.
7. Buck KJ, Hahner L, Sikela J, Harris RA. Chronic ethanol treatment alters brain levels of g-aminobutyric acidA receptor subunit mRNAs: relationship to genetic differences in ethanol withdrawal seizure severity. *J Neurochem* 1991;57:1452-1455.
8. Fitzgerald LW, Ortiz J, Hamedani AG, Nestle EJ. Drugs of abuse and stress increase the expression of GluR1 and NMDAR1 glutamate receptor subunits in the rat ventral tegmental area: common adaptations among cross-sensitizing agents. *J Neurosci* 1996;16:274-282.
9. Mhatre M, Ticku MK. Chronic ethanol administration alters GABAA receptor gene expression. *Mol Pharmacol* 1992;42:415-422.
10. Montpied P, Morrow AL, Karanian JW, Ginns EI, Martin BM, Paul SM. Prolonged ethanol inhalation decreases g-aminobutyric acidA receptor a subunit mRNAs in the rat cerebral cortex. *Mol Pharmacol* 1990;39:157-163.
11. Schena M, Shalon D, Heller R, Chai A, Brown PO, Davis RW. Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10614-10619.
12. Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E, Davis RW. Microarrays: biotechnology's discovery platform for junctional genomics. *Trends Biotechnol* 1998;16:301-306.
13. Thibault C, Lai C, Wilke N, Duong B, Olive MF, Rahman S, et al. Expression profiling of neural cells reveals specific patterns of ethanol-responsive gene expression. *Mol Pharmacol* 2000;58:1593-1600.
14. Edenberg HJ, Strother WN, McClintick JN, Tian H, Stephens M, Jerome RE, et al. Gene expression in the hippocampus of inbred alcohol-preferring and -nonpreferring rats. *Genes Brain Behav* 2005;4:20-30.
15. Lewohl JM, Wang L, Miles MF, Zhang L, Dodd PR, Harris RA. Gene expression in human alcoholism: microarray analysis of frontal cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 2000;24:1873-1882.
16. Nagy LE, Diamond I, Gordon AS. cAMP-dependent pro-

- tein kinase regulates inhibition of adenosine transport by ethanol. *Mol Pharmacol* 1991;40:812-817.
17. Saprú MK, Diamond I, Gordon AS. Adenosine receptors mediate cellular adaptation to ethanol in NG108-15 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1994;271:542-548.
 18. Asher O, Cunningham TD, Yao L, Gordon AS, Diamond I. Ethanol stimulates cAMP-responsive element (CRE)-mediated transcription via CRE-binding protein and cAMP-dependent protein kinase. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:66-70.
 19. Yao L, Arolfo MP, Dohrman DP, Jiang Z, Fan P, Fuchs S, et al. Betagamma dimers mediate synergy of dopamine D2 and adenosine A2 receptor-stimulated PKA signaling and regulate ethanol consumption. *Cell* 2002; 109:733-743.
 20. Gutala R, Wang J, Kadapakkam S, Hwang Y, Ticku M, Li MD. Microarray analysis of ethanol-treated cortical neurons reveals disruption of genes related to the ubiquitin-proteasome pathway and protein synthesis. *Alcohol Clin Exp Res* 2004;28:1779-1788.
 21. Sokolov BP, Jiang L, Trivedi NS, Aston C. Transcription profiling reveals mitochondrial, ubiquitin and signaling systems abnormalities in postmortem brains from subjects with a history of alcohol abuse or dependence. *J Neurosci Res* 2003;72:756-767.
 22. Xie J, Guo Q. PAR-4 is involved in regulation of beta-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 2005 280:13824-13832.
 23. Acampora D, Mazan S, Avantaggiato V, Barone P, Tuorto F, Lallemand Y, et al. Epilepsy and brain abnormalities in mice lacking the Otx1 gene. *Nature Genet* 1996;14:218-222.
 24. Levantini E, Giorgetti A, Cerisoli F, Traggiai E, Guidi A, Martin R, et al. Unsuspected role of the brain morphogenetic gene Otx1 in hematopoiesis. *Proc Nat Acad Sci* 2003;100:10299-10303.