

## ENU 돌연변이 우성 진전 마우스의 표현형 분석

박영숙, 김남은, 박찬규

제주대학교 농업생명과학대학 동물자원학과

### Phenotypic analysis of the tremor mutant mice generated by ENU mutagenesis

Young Sook Park, Nam Eun Kim, Chankyu Park

Department of Animal Biotechnology, College of Agriculture and Life Science,  
Cheju National University.

**ABSTRACT** : The newly identified ENU-induced mutant mouse showing tremor phenotype was analyzed by histological and immunohistological analyses to evaluate possible pathological abnormalities in the brain. There were no gross morphological differences in the regions including neocortex, olfactory bulb, hippocampus, thalamus, cerebellum and midbrain between wildtype and tremor mutants from the comparison made by hematoxylin/eosin staining and light microscopic analysis. For the cerebellum, immunostaining using the calbindin-D28 antibody was performed to evaluate Purkinje cell abnormality. There was no cerebellar developmental abnormality in the tremor mutant mice. There was also no difference in the myelination pattern studied by luxol fast blue staining between controls and mutant mice, which is one of the major causes associated with tremor. There was no picnotic cells identifiable by hematoxylin/eosin staining. Therefore, we concluded that there exist no obvious developmental and morphological defects in the tremor mutant mice examined in this study. To further understand the underlying

mechanisms of this newly identified tremor mutant mouse, the genetic analysis of the mutation is necessary.

### 초 록

ENU 돌연변이에 의해 생산된 진전 떨림 표현형을 나타내는 돌연변이 마우스의 뇌 조직에 대한 형태학적 이상 및 뇌세포사멸현상 등에 대한 관찰을 위해 뇌 조직절편에 대한 염색 및 소뇌의 퍼킨지신경세포(Purkinje cell)에 대한 조직학 및 면역조직학적 조사를 수행하였다. 전반적인 뇌조직의 구조면에서는 대뇌피질(neocortex), 후구(olfactory bulb), 해마(hippocampus), 시상(thalamus), 소뇌(cerebellum) 등을 비롯하여 관찰 가능한 모든 부분에서 신경세포층 형성부전, 주요 nuclei의 형성부전, picnotic cell의 존재 등과 같은 조직의 발생학적 또는 형태학적 이상을 나타내는 현상들을 발견할 수 없었다. 또한 LFBCV 염색에 의해 식별 가능한 신경수초(myelination)의 결핍, 주요 신경교련(neuronal commissure) 및 신경로(neuronal tract) 등의 이상 등도 발견할 수 없었다. 그러므로 본 연구에서 조사된 진전(tremor) 돌연변이 마우스의 뇌 조직에 대한 형태학적 이상의 관찰에서는 대조구와 진전 마우스의 비교에서 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었다. 세포수준에서의 표현형 규명과 진전 떨림 현상의

원인 규명을 위해서는 진전 마우스에서 돌연변이 된 유전자의 규명을 위한 유전학적 연구가 동시에 진행되어야 할 것으로 사료된다.

## I. 서론

Tremor(진전)란 몸체의 rhythmic oscillatory activity를 말하며 크게 4가지의 생리적인 기전(근수축계의 물리적 이상, 반사신경계 이상, 중추신경계 조절기전 이상, 신경전달경로의 이상)에 의해 발생하는 것으로 알려져 있다(1). 파킨슨증후군을 포함한 여러 퇴행성 뇌질환에서 발생하는 몸이 떨리는 증상의 예방 및 치료법 연구를 위하여 마우스모델을 이용한 진전 유발기전에 대한 많은 연구들이 진행되고 있다. 지금까지 마우스모델을 이용한 연구를 통하여  $\alpha$ -synuclein(2), ataxin(3), attractin(4), fgf14(5), fmr1(6), mbp(7), plp(8), pmp22(9), parkin(10), sodium channel(11) 등의 유전자들과 tremor 증상의 관련성에 대한 연구들이 보고되었다. 또한 (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)와 같은 신경독소의 주사를 통한 nigrostriatal dopaminergic system의 파괴를 통하여서도 진전의 유발이 가능하다(12). 진전을 유발시키는 주요 원인으로 신경수초감소(demyelination), olivocerebellar circuit의 이상, 뇌간의 이상 등이 보고되고 있으나 그 원인 면에 있어서 다양한 원인들에 의해 진전이 유발되는 것으로 알려져 있다(13,14,15).

유전자기능의 대량분석 방법들 중의 하나로 ENU (N-ethyl-N-nitrosourea)를 주사하여 대량의 인공 돌연변이 생쥐들을 생산하여 이들의 표현형분석을 통하여 모델 동물을 개발하는 연구들이 활발히 진행되고 있다 (16,17). 이를 연구들은 무작위 돌연변이에 의해 발생하는 광범위한 유전성 비정상 표현형들을 가지는 마우스들의 생산, 돌연변이 유전자의 유전자지도제작, 돌연변이유전자 발굴, 돌연변이 마우스들로부터 채취된 시료들에 대한 조직병리학적 분석을 통한 유전자돌연변이와 관련된 구체적인 조직병리학적 특징의 발견 및 분자생물학적 기전의 분석 등으로 이루어진다. ENU mutagenesis는 돌연변이 마우스의 표현형과 돌연변이 된 유전자의 비교를 통하여 짧은 기간 내에 다수의 유전자들의 생물체내에서의 실질적인 기능을 밝히는 데 중요한 실험방법으로 이용되고 있다.

최근 국내에서 생산되어진 ENU 돌연변이 마우스들 중에 진전증상을 나타내는 마우스가 보고되었다(18). ENU mutagenesis에 의해 생산된 진전표현형을 가지는 진전 돌연변이 마우스의 세포생물학적 표현형의 특성을 분석하기 위하여 본 연구에서는 진전 마우스의 뇌 조직에 대하여 진전 증상에 관련될 것으로 예상되는 뇌세포 사멸증상, 신경세포돌기의 신경수초형성 이상, 뇌구조의 발생학적 이상 등의 존재여부를 고찰하였다.

## II. 재료 및 방법

### 공시동물

한국화학연구원(대전)에서 근교계 BALB/c를 이용한 ENU 돌연변이에 의해 생산된 마우스를 공급받아 제주대학교 동물자원과학과 실험동물실에서 진전 돌연변이를 가지는 이형접합자 암 수 마우스의 교배에 의해 생산되었다. 돌연변이와 정상동물은 2명의 독립적인 관찰자에 의한 진전 증상의 판정유무에 의해 구분되었다. 3-4주령의 동물들이 실험에 사용되었으며 사육환경은 non-SPF 환경이었다.

### 조직화

3-4주령의 진전 마우스(진전/?)와 정상 마우스(+/)를 깊게 마취시킨 후 심장을 통하여 PBS 버퍼를 주입하여 혈액을 제거한 다음 Bouin's 고정액 또는 methanol/acetic acid(3:1) 고정액으로 마우스조직을 고정시켰다. 뇌 조직은 완전고정을 위하여 적출 후 동일한 고정액속에서 12시간동안 고정되었고 파라핀 블록에 포매 후 횡단면(coronal), 시상단면(sagittal) 또는 수평단면(horizontal)으로 절단되었다. 뇌 조직은 7  $\mu$ m 두께로 절단하여 난백/glycerol (1:1)을 이용하여 슬라이드 위에 고정되었다. 건조된 슬라이드는 xylene을 이용하여 파라핀을 제거 후 100, 90, 75, 50%의 ethanol을 거쳐 수화 후 매 10회(70 $\mu$ m) 간격으로 조직절편을 hematoxylin/eosin(H&E), luxol fast blue-cresyl violet(LFBCV), 또는 cresyl violet 단독염색을 이용하여 염색되었다. 염색된 슬라이드는 파라핀 제거 후 탈수화(dehydration)를 위하여 역순으로 ethanol 처리 후 Permount(Fisher scientific)용액을 이용하여 커버슬립으로 고정되었다.

**면역조직화학**

3-4주령 마우스를 methanol/acetic acid(3:1)를 이용하여 위에서 설명된 방법으로 심장관류(cardiac perfusion)를 통하여 조직고정 작업을 실시하였다. 뇌 조직은 파라핀 블록에 포매 후 시상면상으로 절단되었다. 파라핀 절편은 7 μm의 두께로 자르고 절단된 조직은 poly-L-lysine(Sigma)으로 처리된 슬라이드 위에 올린 후 37°C에서 12시간 동안 건조하였다. 파라핀 슬라이드는 xylene을 이용한 파라핀제거작업을 거친 후 수분첨가 및 수분제거 과정을 거쳤다. 조직 슬라이드는 PBS를 이용하여 세척한 다음 1차 항체로 mouse calbindin D-28 monoclonal antibody (1:1500, Sigma)를 이용하여 4°C에서 12 시간 동안 배양되었다. Biotin이 결합된 anti-mouse IgG 2차 항체 및 HRP-conjugated Extravidin 3차 항체 (Sigma) 처리 후 DAB(Sigma)을 이용하여 발색반응을 실시하였다. 발색반응 후 hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

**슬라이드 사진촬영**

염색된 슬라이드는 광학현미경(Olympus BX51)을 이용하여 관찰하였으며 관찰된 이미지의 사진은 DP12 digital camera(Olympus)와 OLYSIA(Olympus) digital imaging software를 이용하여 촬영되었다.

**Ⅲ. 결과 및 고찰**

진전 돌연변이마우스의 표현형유발에 관련된 분자생물학적 기전의 규명을 위해서는 유전체학 기법을 이용한 유전자발굴뿐만 아니라 발생학적 실험기법들을 이용한 특이증상에 관련된 조직 또는 세포들의 발생학적 이상 유무에 대한 분석이 필요하다. 본 연구에서는 진전 돌연변이 마우스의 전반적인 뇌 구조의 형성 및 발달상태를 조사하기 위하여 진전 마우스와 대조구로 사용된 동복 정상마우스의 뇌를 적출 및 고정하여 시상면상으로 미세절단 후 H&E, cresyl violet, 및 LFBCV 염색을 실시하여 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 소뇌의 경우에는 calbindin D-28 항체를 이용한 면역조직학을 이용하여 진전 마우스 소뇌의 조직형성 및 Purkinje cell 에 대한 세밀한 고찰을 실시하였다.

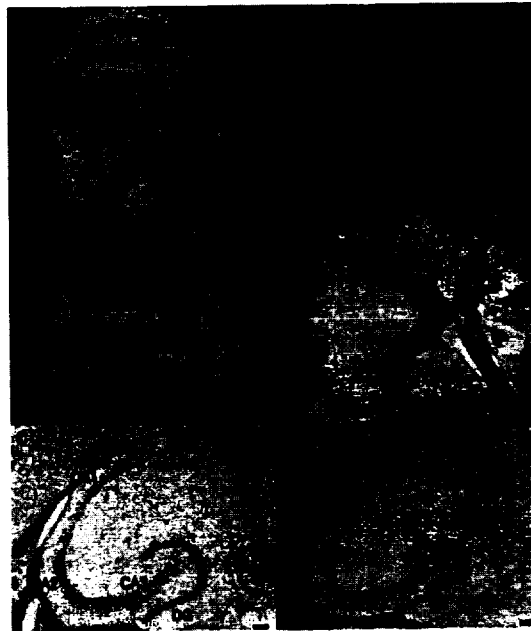


Fig 1. Comparison of anatomical structures and myelination pattern in the brain between tremor and wildtype mice. The horizontal sections of normal(A,B,C) and tremor mutant(D,E,F) are stained by LFBCV. The degree and pattern of myelination visualized by luxol fast blue staining shows that there is no difference between normal and tremor mutant mice in all region of the brain observed. Abbreviations: WT, wildtype; MUT, mutant; CA1, CA1 field of the hippocampus; CA2, CA2 field of the hippocampus; CA3, CA3 field of the hippocampus; CB, cerebellum; cg, cingulum; CPu, caudate putamen; D3v, dorsal 3rd ventricle; DG, dentate gyrus; gcc, genu of the corpus callosum; IC, internal capsule; MB, midbrain; LV, lateral ventricle; MHb, medial habenular nucleus; SFo, subfornical organ; ST, stria terminalis; vhc, ventral hippocampal commissure. Scale bar: 200μm.

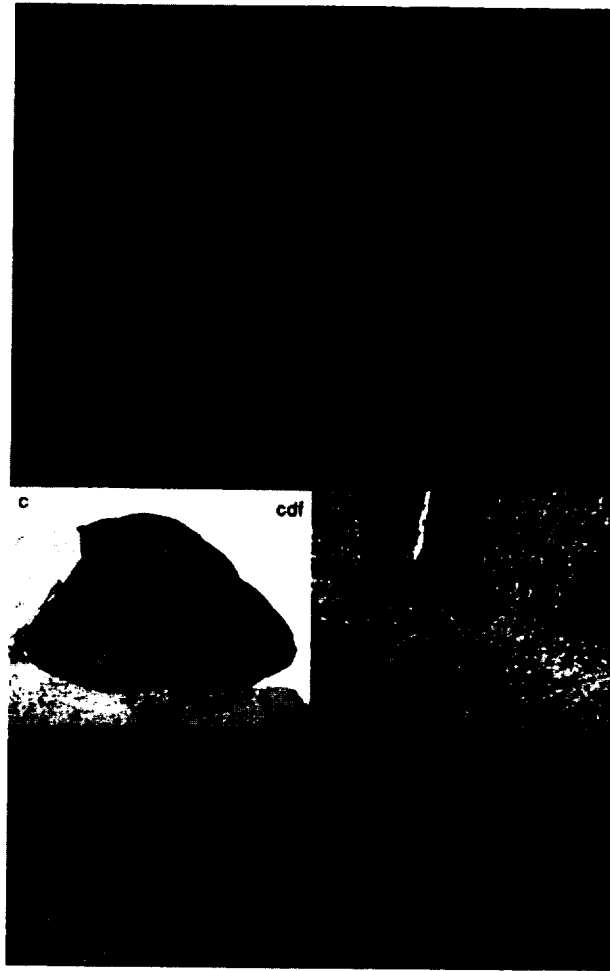


Fig 2. Comparison of cerebellar structures between tremor and other mutant mice. The cerebellar structure of wildtype(A,E), tremor(B,F), cdf(C,G), pcd(D,H) mice were compared by calbindin-D28 immunohistochemistry. The images in the right column(E,F,G,H) are the enlarged views of the regions indicated by squares in the left column(A,B,C,D), respectively. The lobule numbers of the normal cerebellum are indicated in "A". There is no difference in the pattern of lobulation and the lamina structure of the cerebella between wildtype (A,E) and tremor mutant mice(B,F). Purkinje cell ectopia(C,G) and degeneration(D,H) observed from cdf and pcd mice(Purkinje cells are indicated by arrow heads), respectively, are not observed from tremor mutant mice. Abbreviations: WT, wildtype; MUT, mutant; WM, white matter; PCL, Purkinje cell layer; GCL, granule cell layer. Scale bar: 200 $\mu$ m.

대뇌피질, 후구, 해마, 시상, 소뇌 등을 포함한 전반적인 뇌구조 형성을 관찰하기 위하여 시상면상 및 수평면상으로 절단된 뇌 조직 절편을 H&E, cresyl violet, LFBCV 용액으로 염색하여 관찰하였다. 피질부의 층판형성(Cortex lamination pattern), 주요 핵의 정상적인 형성, 신경세포의 밀도 등을 포함하여 진전 마우스의 뇌 조직 절편들은 형태학적인 측면에서 정상마우스와의 차이를 나타내지 않았다(Figure 1, 2). Apototic 신경세포에 대한 정확한 관찰을 위해서는 TUNEL 분

석 방법이 주로 이용되나 일반적으로 H&E 염색을 실시하였을 경우에도 apoptosis 과정에 있는 세포들은 eosin에 의해 진하게 염색되는 picnotic cell 들이 관찰된다. 그러나 진전 마우스의 H&E 염색에서는 picnotic cell들로 분류될 수 있는 세포들은 관찰되지 않았다. 그러므로 진전마우스의 경우 최소한 신경세포의 대규모의 programmed cell death는 없을 것으로 사료된다.

신경세포 축삭의 수초화 이상의 경우 나타나는 대표적인 표현형은 진전 이다(21). 진전 돌연변이 마우스

에서 수초화 이상 유무를 관찰하기 위하여 LFBCV 염색을 실시하였다. Figure 1에서 보는 것처럼 진전 돌연변이 마우스와 대조구가 비슷한 염색패턴을 나타내고 있으며 그림에 나타나지 않은 뇌의 다른 부분에서도 비슷한 염색정도를 나타내었다. 그러므로 진전돌연변이 마우스의 경우 신경수초감소, 주요 신경교련 또는 신경로의 발달이상 등은 없는 것으로 사료된다.

대부분의 소뇌 이상 돌연변이 마우스에서 공통적으로 나타나는 증상은 운동실조증과 진전이다. 진전 마우스 소뇌에 대한 형태학적 고찰을 위하여 정상시료 이외에도 Purkinje cell 변위 현상(ectopia)을 보이는 cdf(cerebellar deficient folia)(19) 돌연변이 마우스와 Purkinje cell 사멸 표현형을 가지고 있는 pcd(Purkinje cell degeneration)(20) 마우스의 뇌 조직 미세절편을 비교시료로 사용하였다.

Figure 2 에 나타난 것처럼 진전 돌연변이 마우스의 소뇌구조는 foliation 정도, 소뇌의 크기, 소뇌세포들의 위치 등에서 정상마우스와 동일한 형태를 나타내

었다. 또한 과립세포층(granule cell layer) 형성과 세포밀도도 정상마우스와 차이가 없었다. Calbindin 면역조직학을 이용하여 Purkinje cell들을 염색한 후 관찰하였을 때 모든 Purkinje cell 들은 Purkinje cell 층에 존재하였으며 위치가 변화된 Purkinje cell 들은 관찰되지 않았다. Purkinje cell들의 숫자 또한 정중절단 시상면 절편들을 이용하여 돌연변이 마우스와 정상마우스를 비교 하였을 때 정상마우스의 경우 평균 852개(n=3), 돌연변이마우스의 경우 평균 843개(n=3)로써 서로 비슷하였다. 이는 소뇌 Purkinje cell의 전체 숫자를 비교한 것은 아니나 본 연구에 사용된 진전 마우스에서는 apoptosis에 의한 Purkinje cell의 대규모 감소는 없음을 보여준다. Calbindin 으로 염색된 Purkinje cell 수상돌기의 구조 또한 정상마우스와 진전마우스의 비교에서 차이가 없었으며 Purkinje cell 축색돌기의 팽윤현상(swelling)이나 사멸현상 또한 발견되지 않았다(Figure 3).

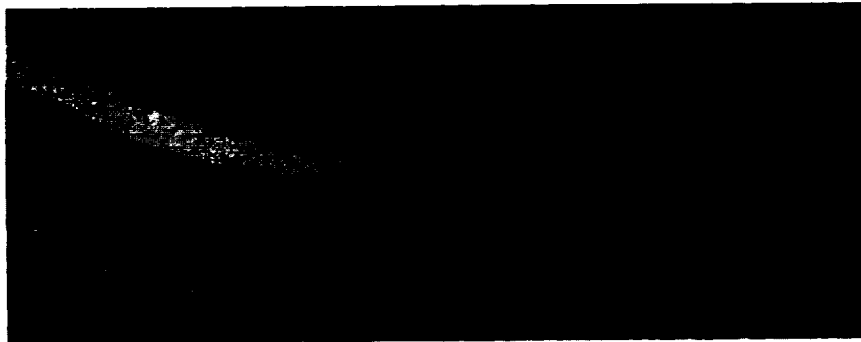


Fig 3. Comparison of the morphology of Purkinje cell dendrites between wildtype and tremor mutant mice. Purkinje cells are stained with the calbindin-D28 antibody and counterstained with hematoxylin. There is no difference in the shape of Purkinje cell dendrites between wildtype(A) and tremor mutant mice(B). There is no difference in the density of granule cell in the granule cell layer. Abbreviation: WT, wildtype; MUT, mutant; GCL, granule cell layer; PCL, Purkinje cell layer. Scale bar: 200µm.

Attractin, mahogany, zitter등의 myelination이상 돌연변이나 Rora 유전자돌연변이에 의한 staggerer 마우스는 진전과 ataxia 증상이 마우스의 나이가 많아짐에 따라 그 정도가 심해지는 나이에 따른 진행성을 나타낸다(21,22). 그러나 본 연구에서 사용된 진전 돌연변이 마우스의 경우에는 처음으로 떨림 표현형이 관찰되기 시작하는 것은 약 2~3주령부터였으며 12개월이 지난 후에도 진전의 정도가 더 심해지는 것은 관찰할

수 없었으며 다른 행동학적인 이상도 관찰할 수 없었다. 또한 12개월령 이상 된 진전 마우스의 뇌 조직 절편을 관찰하였을 때도 새로운 표현형은 나타나지 않았다. 그러므로 진전 마우스의 경우는 진행성 진전과는 그 특성을 달리하는 것으로 사료된다.

지금까지 밝혀진 유전성 진전증상의 유전양식은 대부분의 경우 우성유전을 나타내는 것으로 보고되고 있다(16). 이점은 본 연구에서 사용된 진전 마우스의 유전

양식이 우성유전임을 고려할 때 표현형적 공통점으로 사료된다.

운동실조증, 경련성장에 및 진전 증상을 나타내는 경우 발생학적 이상에 의한 뇌조직학 또는 병리학에 있어서 이상을 나타내는 경우도 있으나 명확한 이상을 관찰할 수 없는 경우도 많이 보고가 되고 있다(23). 본 연구에서 사용된 진전 마우스의 조직학적 분석 결과에서 나타나는 점들을 종합할 때 진전 마우스의 광학현미경학적 관찰을 통해서도 명확한 조직학적 및 발생학적 이상을 발견할 수 없었다. 따라서 진전돌연변이 마우스의 표현형은 명확한 뇌조직구조의 이상이 아닌 신경세포 자체의 미세한 이상에 의해 진전증상이 발생하는 것이거나 중추신경계가 아닌 말초신경계의 이상 또는 골격근조직의 이상 일 수도 있을 것으로 사료된다.

그러므로 형태학적 분석을 이용한 진전 돌연변이 마우스에 대한 고찰만으로는 이 마우스의 진전 유발에 대한 분자기전의 연구가 쉽지 않을 것으로 생각되며 향후의 진전유전자 지도작성을 통한 후보유전자의 선정과 이들 후보유전자들을 대상으로 한 돌연변이의 확인 등의 분자유전학적인 정보가 매우 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서 사용된 진전 마우스의 이상유전자의 위치가 지금까지 밝혀진 진전 관련 유전자의 위치와 다른 곳에 위치할 경우에는 진전연구에 대한 새로운 마우스 모델로서 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

1. Deuschl G, Raethjen J, Lindemann M, and Krack P. (2001): The Pathophysiology of tremor. *Muscle & Nerve* 24: 716-735.
2. Farrer M, Gwinn-hardy K, Hutton M, and Hardy J. (1999): The genetics of disorder with synuclein pathology and parkinsonism. *Hum Mol Genet* 8: 1901-1905.
3. Koeppen AH. (1998): The hereditary ataxias. *Neuropathol Exp Neurol* 57: 531-543.
4. Kuramoto T, Nomoto T, Fujiwara A, Mizutani M, Sugimura T, and Ushijima T. (2002): Insertional mutation of the Attractin gene in the black tremor hamster. *Mamm Genome* 13: 36-40.
5. Wang Q, Bardgett ME, Wong M, Wozniak DF, Lou J, McNeil BD, Chen C, Nardi A, Reid DC, Yamada K, and Ornitz DM. (2002): Ataxia and paroxysmal dyskinesia in mice lacking axonally transported FGF4. *Neuron* 35: 25-38
6. Hagerman RJ, and Hagerman PJ. (2002): The fragile X permutation: into the phenotypic fold. *Curr Opin Genet Dev* 12: 278-283.
7. Delassalle A, Zalc B, Lachapelle F, Raoul M, Collier P, and Jacque C. (1981): Regional distribution of myelin basic protein in the central nervous system of quaking, jimpy, and normal mice during development and aging. *Neurosci Res* 6: 303-313.
8. Griffiths I, Klugmann M, Anderson T, Yool D, Thomson C, Schwab MH, Schneider A, Zimmermann F, McCulloch M, Nadon N, and Nave KA. (1998): Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. *Science* 280: 1610-1613.
9. Suter U, Welcher AA, Ozcelik T, Snipes GJ, Kosaras B, Francke U, Billingsgagliardi S, Sidman RL, and Shooter EM. (1992): Trembler mouse carries a point mutation in a myelin gene. *Nature* 356: 241-244.
10. Shimura H, Hattori N, Kubo, S, Mizuno Y, Asakawa H, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, and Suzuki T. (2000): Familial parkinson disease gene product, Parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet* 25: 302-305.
11. Meisler MH, Kearney J, Escayg A, MacDonald BT, and Sprunger LK. (2001): Sodium channels and neurological disease: insights from Scn8a mutation in the mouse. *Neuroscientist* 7: 136-45.
12. Hirsch EC, Hoglinger G, Rousset E,

- Breidert T, Parain k, Feger J, Ruberg M, Prigent A, Cohen-Salmon C, and Launay JM. (2003): Animal models of parkinson's disease in rodents induced by toxins: an update. *Neural Transm Suppl* 65:89-100.
13. Gwinn-Hardy K. (2002): Genetics of parkinsonism. *Movement Disorder* 17: 645-656.
  14. Illarioshkin SN, Rakhmonov RA, Ivanova-smolenskaia IA, Brice A, Markova ED, Miklina NI, Kliushnikov SA, and Limborskaia SA.(2002): Molecular genetic analysis of essential tremor. *Genetika* 38: 1704-1709.
  15. Jankovic J.(2002): Essential tremor: A Heterogenous Disorder. *Movement Disorder* 17: 638-644.
  16. Munroe RJ, Bergstrom RA, Zheng QY, Libby B, Smith R, John SW, Schimenti LJ, Browning VL, and Schimenti JC. (2000): Mouse mutants from chemically mutagenized embryonic stemcells. *Nat Genet* 24: 318-321.
  17. Hrabe de angelis MH, Flawinkel H, Fuchs H, Rathkolb B, Soewarto D, Marschall S, Heffner S, Pargent W, Wuensch K, Jung M, Reis A, Richter T, Alessandrini F, Jakob T, Fuchs E, Kolb H, Kremmer E, Schaeble K, Rollinski B, Roscher A, peters C, Meitinger T, Strom T, Steckler T, Holsboer F, Klopstock T, Gekeler F, Schindewolf C, Jung T, Avraham K, Behrendt H, Ring J, Zimmer A, Schughart K, Pfeffer K, Wolf E, and Balling R. (2000): Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet* 25: 444-447.
  18. 조규혁, 조재우, 박찬규, 한상섭, 송창우 (2002): ENU 투여 마우스에서 유래된 유전성 우성 진전 마우스의 기초연구. *한국실험동물학회지* 18: 152-157.
  19. Park C, Falls W, Finger J H, Longo-Guess C M, and Ackerman S L.(2002): Deletion in *catana2*, encoding  $\alpha$ N-catenin, causes cerebellar and hippocampal lamination defects and impaired startle modulation. *Nat Genet* 31: 279-284.
  20. Fernandez-Gonzalez A, La Spada AR, Treadaway J, Higdon JC, Harris BS, Sidman RL, Morgan JI, and Zuo J. (2002): Purkinje cell degeneration (*pcd*) phenotypes caused by mutation in the axotomy- induced gene, *Nnal*. *Science* 259: 1904-1906.
  21. Kuramoto T, Kitada K, Inui T, Sasaki Y, Ito K, Hase T, Kawaguchi S, Ogawa Y, Nakao K, Barsh GS, Nagao M, Ushijima T, and Serikawa T. (2001): *Attractin/mahogany/Zitter* plays a critical role in myelination of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 559-564.
  22. Hadj-sahraoui N, Frederic F, Zanjani H, Delhayebouchaud N, Herrup K, and Mariani J. (2001): Progressive atrophy of cerebellar purkinje cell dendrites during aging of the heterozygous staggerer mouse(*Rora(+/sg)*). *Brain Res Dev Brain Res* 126: 201-209.
  23. Letts VA, Felix R, Biddlecome GH, Arikath J, Mahaffey CL, Valenzuela A, Bartlett FS 2nd, Mori Y, Campbell KP, and Frankel WN. (1998): The mouse stargazer gene encodes a neuronal  $Ca^{2+}$ -channel  $\gamma$  subunit. *Nat Genet* 19: 340-347.