



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

미토콘드리아 막전압의 저분극에
의한 단기시냅스가소성의 조절

Effects of presynaptic
mitochondrial depolarization on
short-term synaptic plasticity

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

의과학과 생리학 전공

김민지

A thesis of the Master' s degree

Effects of presynaptic
mitochondrial depolarization on
short-term synaptic plasticity

미토콘드리아 막전압의 저분극에
의한 단기시냅스가소성의 조절

February 2016

The Department of Physiology,

Seoul National University

College of Medicine

MinJi Kim

Effects of presynaptic mitochondrial depolarization on short-term synaptic plasticity

By

MinJi Kim

A thesis submitted to the Department of Physiology

in partial fulfillment of the requirements

for the Degree of Master of Science in physiology

at Seoul National University College of Medicine

January 2016

Approved by Thesis Committee:

Professor _____ Chairman

Professor _____ Vice chairman

Professor _____

초 록

미토콘드리아는 ATP 를 생산해낼 뿐만 아니라 세포 내 칼슘을 완충하는 역할을 한다. 본 연구는 이러한 기능을 가진 미토콘드리아가 시냅스전 말단에서 시냅스 전달에서 갖는 역할에 주목하고, dual patch-clamp recording 이 가능한 calyx of Held 시냅스에서 미토콘드리아의 저분극이 단기시냅스 가소성 (short-term synaptic plasticity)에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

Calyx of Held 시냅스에 저농도 (1 μM)의 *p*-trifluoromethyl-oxyphenyl-hydrazone (FCCP)를 짧게 (5 분) 처리하여 미토콘드리아의 막전압을 부분적으로 저분극 시켰다. 그 결과 FCCP 를 처리하는 시간 동안 basal EPSC 가 증가하였고 FCCP 를 씻어준 후에 short-term facilitation 가 감소하였다. 이러한 현상은 ATP synthase inhibitor 인 oligomycin 이나 mitochondrial calcium uptake inhibitor 인 Ru360 에 의해서는 나타나지 않았다.

Fura-2 를 이용한 칼슘 이미징 실험에서 FCCP 처리하는 동안 시냅스전 말단 내의 칼슘 농도가 증가하였다. 또한 FCCP 를 처리 전에 pulse train 으로 conditioning 하면 FCCP 에 의한 세포 내 칼슘 농도의 증가가 더 촉진되었다. mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 의 blocker 인 tetraphenylphosphonium (TPP^+) 존재

하에 FCCP 를 처리하면 세포 내 칼슘 농도의 증가가 관찰되지 않았다.

이러한 결과들은 시냅스전 말단에 위치한 미토콘드리아가 저분극되면 미토콘드리아에 의한 세포 내 칼슘조절의 변화에 의하여 단기시냅스가소성에 영향을 줄 수 있음을 시사한다.

주요어: 미토콘드리아, 저분극, FCCP, 칼슘, ATP, 단기가소성

학 번: 2013-23522

목 차

초록.....	i
목차.....	iii
표 및 그림 목록	iv
약어 목록.....	v
서론.....	1
실험재료 및 방법.....	3
결과.....	8
고찰.....	27
참고문헌	32
초록 (영문)	35

표 및 그림 목록

Figure 1. Monitoring of mitochondrial membrane potential & effects of FCCP on Short-term plasticity (STP).

Figure 2. Effects of partial mitochondrial depolarization on paired-pulse facilitation

Figure 3. Effects of partial mitochondrial depolarization on STP

Figure 4. Oligomycin & Ru360 have little effect on STP.

Figure 5. FCCP induces presynaptic calcium level.

Figure 6. Block of calcium release from mitochondria affects STP in short pulse intervals.

약어 목록

Artificial cerebrospinal fluid (aCSF)

D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP5)

Cyclothiazide (CTZ)

p-trifluoromethyl- oxyphenyl-hydrazone (FCCP)

Fast releasing vesicle pool (FRP)

Fluorescence level (Fm)

Medial nucleus of trapezoid body (MNTB)

Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger (mNCX)

Paired-pulse facilitation (PPF)

Paired-pulse ratio (PPR)

Post-tetanic potentiation (PTP)

Readily releasable pool (RRP)

Short-term synaptic plasticity (STP)

Slow releasing vesicle pool (SRP)

Synaptic vesicle (SV)

Tetrodotoxin (TTX)

Tetramethylrhodamineethylester (TMRE)

Tetraphenylphosphonium (TPP⁺)

Tetraethylammoniumchloride (TEA-Cl)

서론

시냅스전 말단의 미토콘드리아는 신경전달물질을 함유하는 synaptic vesicle (SV)의 fusion 과 recycling 에 필요한 에너지원인 ATP 를 공급할 뿐만 아니라 세포 내 칼슘 농도를 조절하는 역할을 한다 (Vos, Lauwers, & Verstreken, 2010). 초파리에서 미토콘드리아의 축삭 이동에 필요한 drp1 을 knock-out 시키면 근신경접합부에서 신경전달이 현저히 억제되지만 ATP 를 공급해주면 이러한 기능장애가 해소된다고 보고된 바 있다 (Verstreken et al., 2005). Calyx of Held 시냅스에서 수행된 실험에 따르면 시냅스전 말단의 칼슘 농도가 2 μM 이상 올라가도록 하는 강한 단일 자극에서 mitochondrial Ca^{2+} uptake 가 시작되며, 고빈도 자극 시에는 이보다 더 낮은 1 μM 에서 이미 mitochondrial Ca^{2+} uptake 가 시작되며 Ru360 으로 Ca^{2+} uniporter 를 막으면 고빈도 자극 동안 칼슘증가가 5 배이상 증가하는 것으로 보아 미토콘드리아에 의한 칼슘조절이 매우 중요함을 알 수 있다 (J. S. Lee, Kim, Ho, & Lee, 2013). 고빈도 자극 동안 미토콘드리아로 들어간 칼슘은 자극 후 서서히 mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (mNCX)를 통하여 세포질로 나오면서 세포 내 칼슘 농도를 올리고 이것이 SV 의 release probability 를 증가시킨다. 이러한 현상이 calyx of Held 와 CA3 의 mossy fiber synapse 에서 강축 후 강화

(post-tetanic potentiation, PTP)의 기전임이 보고된 바 있다 (D. Lee, Lee, Ho, & Lee, 2007; J. S. Lee, Kim, Ho, & Lee, 2008).

단기시냅스 가소성 (short-term plasticity, STP)이란 고빈도 자극 동안에 EPSC의 크기가 커지거나 작아지는 현상으로서 이들을 각각 short-term facilitation 과 short-term depression 이라고 한다. Short-term facilitation 은 residual calcium 에 의한 release probability 의 증가 그리고 short-term depression 은 readily releasable pool (RRP)의 감소 때문에 일어난다는 것이 두 가지 STP 현상을 설명하는 가장 강력한 가설이다. STP 현상의 기전인 release probability 와 RRP 의 회복 모두 시냅스전 말단의 칼슘에 의해 조절되는 현상이다 (Hosoi, Sakaba, & Neher, 2007; Schneggenburger & Neher, 2000). 또한 SV 의 RRP 로의 이동과 recycling 모두 ATP 가 필요한 과정들이다. 따라서 시냅스전 말단 ATP 공급에 미토콘드리아의 역할이 매우 중요하고 고빈도 자극 동안에도 칼슘을 흡수하는 역할을 한다면 PTP 이외의 단기시냅스 가소성에도 어떤 역할을 가지지 않을까 하는 의문을 가지게 되었고 이에 관한 연구를 시작하였다. 이러한 연구를 위하여 본 연구는 calyx of Held 라는 거대 presynaptic terminal 에 직접 whole-cell patch 를 하여 시냅스전 말단에 위치한 미토콘드리아의 막전압과 세포막전압의 저분극 자극에 의해 유발된 EPSC 를 동시에 측정함으로써 두 파라미터 간의 상관관계를 연구하였다.

실험 재료 및 방법

Slice preparation.

The medial nucleus of trapezoid body (MNTB)를 포함하는 Transverse brainstem slices (200 μ m thick)를 7~9 일령 Sprague-Dawley rats 을 사용하여 만들었다. 해당 Protocols 은 서울대학교 실험동물위원회의 허가를 받은 것이다. 뇌는 차갑고 낮은 칼슘이 포함된 aCSF 에서 다루었으며 vibratome slicer (VT1200; Leica)를 이용해 slice 를 만들었다. 만든 slice 는 37.8 도의 normal aCSF 에서 incubation 한 후 room temperature (23-25 도)에서 실험하였다. 낮은 칼슘의 aCSF 은 다음과 같은 조성으로 구성되어 있다. (In mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 2.5 MgCl₂, 0.5 CaCl₂, 15 glucose, 0.4 Na ascorbate, 3 myoinositol, 2 Na pyruvate. [pH 7.4 when saturated with carbogen (95 % O₂, 5 %CO₂); osmolarity, ~310 mOsm]. Normal aCSF (2 CaCl₂)은 낮은 칼슘이 포함된 aCSF 와 칼슘 농도를 제외하고는 구성이 같다.

Electrophysiological recording and reagents.

Slices 는 an upright microscope (BX50WI) Olympus 에 있는 recording chamber 로 이동시켜서 실험을 했다. 본 논문에서

수행한 대부분의 실험은 presynaptic Ca^{2+} current 와 AMPA receptor-mediated EPSC 를 기록하기 위해 다음과 같은 약물을 normal aCSF 에 포함한 후 진행하였다. (Fig. 5 제외): 1 μ M tetrodotoxin (TTX), 50 μ M D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (D-AP5), 5 mM tetraethylammoniumchloride (TEA-Cl). 또한 AMPA receptors 의 desensitization 과 saturation 을 막기 위해 50 μ M cyclothiazide 와 1 mM kynurenic acid 를 사용하였다. 1 mM Kynurenic acid 는 EPSC amplitude 를 control 에 비해 50 % 정도 감소시킨다. 경우에 따라 1 μ M carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethyl-oxyphenylhydrazone (FCCP), 2.5 μ g/ml oligomycin 을 추가하였다. 시냅스전 말단과 시냅스후 MNTB neuron 은 각각 -80 과 -70 mV 으로 whole-cell clamping 했다. whole-cell recordings 은 RT 에서 Axon CNS Digidata 1440A 와 muticlamp 700B 를 사용하였다. postsynaptic pipette solution (2-3 M Ω)은 다음과 같은 조성으로 구성되어 있다. (In mM): 130 Cs-gluconate, 20 TEA-Cl, 10 NaCl, 20 HEPES, 5 Na-phosphocreatine, 2 Mg-ATP, 10 EGTA. pH 는 7.3 으로 맞추어 사용하였다. presynaptic patch pipette solution (3-4 M Ω)은 다음과 같은 조성으로 구성되어 있다. (In mM): 130 Cs-gluconate, 20 TEA-Cl, 20 HEPES, 5 Na-phosphocreatine, 5 Mg-ATP, 0.3 Na-GTP, 1.5 glutamate, 0.5 EGTA. 실험에 따라 50 nM TMRE 나 20 μ M Ru360 이 포함되어 있고 이의 pH 역시

7.3 으로 맞추어 사용하였다. Calcium imaging 을 할 때의 presynaptic patch pipette solution 의 조성은 다음과 같다 (In mM): 120 K-gluconate, 30 KCl, 20 HEPES, 4 Mg-ATP, 4 Na-phosphocreatine, 0.3 Na-GTP. 이의 pH 도 7.3 으로 맞추어 사용하였다. The presynaptic series resistance (RS; 10-25 M Ω)는 50-80 %정도로 compensation 해주었고 postsynaptic RS (4-15 M Ω)는 70 %까지 compensation 해주었다. 또한 각각 pre-와 postsynaptic pipettes 의 uncompensated RS values 를 5 M Ω 정도로 맞춰주었다.

Stimulation of afferent fibers.

Fig. 6 의 EPSCs 는 bipolar stimulating electrode 를 이용해 presynaptic axons (100 μ s duration; 15-20 V intensity) 을 자극해서 유도했다. Stimulation 은 Master-8 (A.P.I.)를 이용했다. Stimulation protocol 은 10, 20, 50, 100, 200 ms interval 로 paired-pulse stimulation 을 하였다.

Monitoring of mitochondrial membrane potential.

The excitation light 은 monochromator (Polychrome-IV; TILL Photonics)를 사용했고 60 \times water-immersion objective (NA, 0.9; LUMPlanFI; Olympus)와 slow-scan CCD camera (SensiCAM; PCO)를 이용해 imaging 하였다. binning function

(2x2 pixels)을 사용했는데 이는 frame rate 를 증가시켜준다. Monochromator 와 CCD camera 는 PC 와 Digidata 1440A (Axon instruments, Foster city, CA)으로 조정하였다. Patch electrodes 를 이용해 TMRE 를 presynaptic terminal 에 loading 했고 excitation wavelength 는 550 nm, exposure time 은 100 ms, frame interval 은 30 s 로 설정하였다. 562 nm dichroic longpass filter (DCLP, Ex: 543 nm, Em: 593 nm)를 사용하였다. Fm 값은 측정된 fluorescence value 에서 background value 를 제하여 구하였다.

Cytosolic Ca²⁺ measurements.

Calyx of held 에서 intracellular [Ca²⁺]을 측정하는 것은 선행 연구에 잘 설명되어있다.(Kim, Lee, Park, Ho, & Lee, 2003) 간략하게 설명하자면, presynaptic terminal 의 cytosolic Ca²⁺ concentration 은 fluorescence imaging 을 이용하여 측정하였는데 사용하는 장비들은 TMRE 를 이용한 imaging 을 했을 때와 동일하다. Patch electrodes 를 이용해 presynaptic terminal 에 20 μ M Fura-2 를 loading 했고 Excitation wavelength 는 360 nm, exposure time 은 30 ms, frame interval 은 500 ms 로 설정하였다. Fluorescence ratio ($R = F_{iso}/F_{380}$)를 다음과 같은 식을 이용해 [Ca²⁺]_i 로 계산하였다. $[Ca^{2+}]_i = K_{eff}(R - R_{min}) / (R_{max} - R)$. Calibration parameter 들은 in-cell calibration 을 이용해 정했다.

R_{\min} value 는 8 mM BAPTA 가 들어있는 Ca^{2+} -free internal solution 을 이용해 구하였고, R_{\max} value 는 10 mM Ca^{2+} 이 들어있는 internal solution 을, R_{int} 는 4 mM Ca^{2+} , 8 mM BAPTA 가 들어있는 internal solution 을 이용해 구하였다.

Drugs.

TTX, DL-AP5, cyclothiazide 은 ABcam 에서 구매했고 Fura-2 는 Molecular Probes 에서 구매했다. 그 외의 모든 chemical 은 sigma aldrich 에서 구매했다.

Data analysis.

모든 data 는 IgorPro(ver 6.1; waveMetrics, Lake Oswego, OR)을 이용해 분석하였다. n 은 세포 수를 말하며 cell identity 는 cell#날짜, 번호순으로 나타내었다. 통계분석은 SEM 으로 나타내었다.

결 과

1. Monitoring of mitochondrial membrane potential and effects of FCCP on short-term plasticity (STP) at the calyx of Held synapse

시냅스전 말단에 위치한 미토콘드리아의 막전압을 관찰하기 위하여 tetramethylrhodamineethyl ester (TMRE)라는 fluorescent dye 를 이용하였다. 시냅스 전 말단의 whole-cell patch 용 internal solution 에 50 nM TMRE 를 넣어 사용하면 Figure 1 A 와 같이 시간에 따른 시냅스전 말단의 미토콘드리아의 막전압을 non-quenching mode 로 관찰할 수 있게 된다. 시냅스 전 말단에 존재하는 미토콘드리아의 역할을 알아보기 위해 mitochondrial uncoupler 인 1 μ M 의 carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazine (FCCP)을 5 분동안 처리하였다. FCCP 처리하는 동안 TMRE fluorescence level (Fm 값)이 절반 정도 줄어드는 것으로 보아 1 μ M FCCP 는 partial mitochondrial depolarization 을 유도하는 것으로 보인다. 1 μ M FCCP 처리 5 분 후 aCSF 로 FCCP 를 씻어주어도 TMRE signal 이 떨어진 채로 유지되므로 미토콘드리아 막전압의 저분극으로부터 회복되지 못함을 시사한다 (Fig. 1A).

Paired-pulse stimulation (0.9 ms pulse of -80 to 0 mV at 100 Hz)을 이용해 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의 저분극이 short-term plasticity 에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다. FCCP 를 처리하는 시간 동안 basal EPSC amplitude 가 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, FCCP 처리를 중단하게 되면 증가하기 전의 amplitude 로 회복되었다 (Fig. 1A). TMRE signal 의 값에 따라 basal EPSC amplitude 와 paired-pulse ratio (PPR) 을 분석해봤을 때 mitochondrial depolarization 의 정도와 일정한 상관관계는 관찰되지 않았다 (Fig. 1B, C).

Figure 2A 에 각 조건에서의 대표적 EPSC trace 를 도시하였다. FCCP 처리 전 control condition 에서 paired-pulse facilitation (PPF)이 관찰되었지만 FCCP 를 처리해 부분적인 미토콘드리아 막전압의 저분극이 일어나기 시작하면 basal EPSC amplitude 가 증가하여 PPF 의 감소 또는 paired-pulse depression 이 관찰되었다 ($n = 6$; $p = 0.0502$). 그리고 FCCP 처리 중단 이후에는 다시 basal EPSC 의 크기가 처리 전으로 돌아왔다 (Fig 2C). 그러나 FCCP 처리 중단 후 PPR 은 완전히 회복되지 않고 PPF 가 control 에 비하여 유의하게 낮게 관찰되었다 (Fig. 2D). 이는 FCCP 처리가 release probability 를 증가시키며 미토콘드리아가 PPF 에 기여함을 시사한다. Pulse train stimulation (100 Hz, 30 pulses)을 주면 control 에서는 short-term facilitation 이 관찰되었지만 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의

저분극이 일어난 후에는 short-term depression 이 관찰되었다 (Fig. 3A). 이러한 변화가 AMPA receptor 의 desensitization 이 일어나 나타나는 것인지 확인하기 위해서 이를 방지하는 약물인 cyclothiazide (CTZ) 를 처리한 조건에서 같은 실험을 반복해보았다. 이 경우에도 facilitation 이 감소하였다. (Fig. 3B)

2. Impaired ATP synthesis is not responsible for the FCCP effects on STP

Figure 1-3 의 결과는 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의 저분극이 short-term facilitation 을 억제함을 시사한다. 그렇다면 부분적인 미토콘드리아 막전압의 저분극이 미토콘드리아의 기능들 중 어느 부분에 영향을 끼쳐서 STP 를 변화시키는지 알아보려고 하였다. 먼저 미토콘드리아 막전압의 부분적인 저분극이 미토콘드리아의 ATP 합성을 억제한 결과 발생한 국소적인 ATP 농도의 저하가 STP 의 변화를 유도하는지 알아보기 위해 oligomycin (2.5 μ g/ml)을 처리하였을 때의 paired-pulse facilitation 의 변화를 관찰해보았다 (Fig. 4).

먼저 oligomycin 처리 전후로 TMRE signal 을 관찰하였을 때 큰 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 4A). 또한 oligomycin 처리 전 후로 basal EPSC amplitude 의 변화는 관찰되지 않았으며, paired-pulse ratio 도 oligomycin 의 영향을 받지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 4B). 이러한 결과를 통해 FCCP 에 의한 short-term

facilitation 억제가 미토콘드리아 ATP 합성저해에 의한 것이 아님을 알 수 있었다.

3. Impaired mitochondrial Ca^{2+} uptake is not responsible for the FCCP effects

미토콘드리아 막전압의 저분극이 Ca^{2+} 에 대한 electrical gradient 를 저하시켜 cytosolic $[\text{Ca}^{2+}]$ 에 영향을 주었는지 테스트하기 위하여 미토콘드리아 Ca^{2+} uniporter blocker 인 Ru360 (20 μM)을 presynaptic internal solution 에 포함시켜 whole-cell patch 를 하였을 때, baseline EPSC amplitude 와 paired-pulse facilitation 을 관찰해보았다. 그 결과 Ru360 은 baseline EPSC 와 paired-pulse stimulation (100 Hz, 20 ms) 둘 다에 유의한 영향을 미치지 않았다 (Fig. 4C). 그리고 train stimulation (100 Hz, 30 pulses) 시 나타나는 facilitation 에도 변화가 나타나지 않았다. (Fig. 4D)

4. FCCP induces the increase in cytosolic calcium level of presynaptic terminals.

시냅스전 말단에 있는 미토콘드리아는 ATP 를 공급하고 시냅스 전 말단 내의 칼슘을 조절하는 역할을 하는데 Figure 4 을 통해 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의 저분극에 의해 발생할 수도

있는 ATP 합성의 저하가 적어도 본 연구의 실험조건에서는 STP 에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있었다. 그렇다면 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의 저분극이 시냅스전 말단 내의 칼슘 조절 기전에 변화를 일으켜서 short-term facilitation 에 영향을 미치는 것인지 알아보기 위해 FCCP 처리시 시냅스전 말단 내의 칼슘 농도 변화를 관찰하는 실험을 수행하였다. 먼저, 이전 실험들을 수행할 때 사용하던 internal solution 에 포함되어 있던 calcium buffer 의 양만큼 계산하여 0.45 mM EGTA 와 50 μ M Fura-2 가 들어있는 internal solution 을 사용하여 시냅스전 말단의 칼슘 농도를 측정하였다. 이러한 조건하에서 FCCP 를 5 분간 처리하여도 칼슘 농도에는 큰 변화가 나타나지 않았다 (Fig. 5Aa). 그러나 presynaptic internal solution 에 EGTA 가 없는 환경에서 같은 50 μ M Fura-2 를 이용하여 칼슘 농도를 측정하였을 때 FCCP 를 처리하는 동안 $[Ca^{2+}]$ 이 100 nM 정도 증가하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5Ab).

반복 실험 과정 중에서 세포 내 칼슘 농도가 증가하는 경우와 그렇지 않은 경우가 관찰되었다. 이는 미토콘드리아마다 저장하고 있는 칼슘의 양에 따라서 상반된 결과가 나올 수도 있다고 생각하여 이번에는 FCCP 처리 전에 pulse train stimulation (100 Hz, 30 pulses)을 주어서 미토콘드리아에 칼슘을 loading 한 후 FCCP 의 효과를 관찰하였다. 그 결과 train stimulation 을 주지

않았을 때 (Fig. 5Ab)보다 칼슘 농도가 50–100 nM 정도 더 증가하였다 (Fig. 5B).

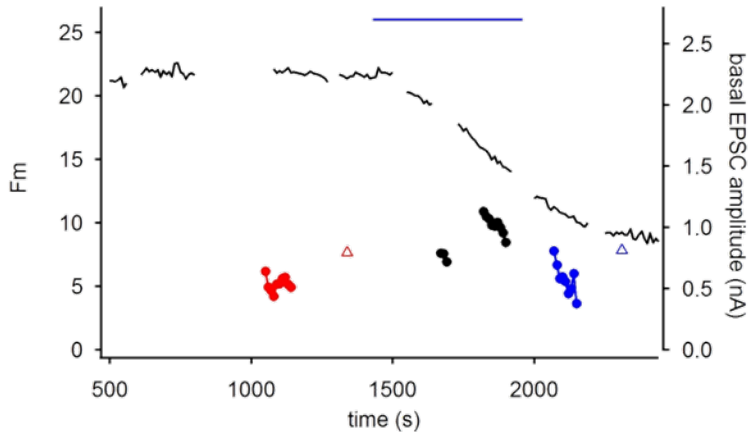
미토콘드리아 막전압의 저분극이 일어날 때 mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (mNCX)를 통해 칼슘이 방출되는 것인지를 확인하기 위해서, 실험을 진행하는 동안 mNCX blocker 인 tetraphenylphosphonium (TPP^+) ($2 \mu\text{M}$)을 처리한 조건에서 같은 실험을 진행하였다. TPP^+ 존재 하에서는 FCCP 에 의한 세포 내 칼슘 농도 증가가 관찰되지 않았다 (Fig. 5C).

따라서 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의 저분극이 일어나면 mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 를 통해 방출된 칼슘으로 인해 일시적으로 세포 내 칼슘 농도가 증가한다는 것을 알 수 있었다. 이는 figure 1 에서 관찰했던 바와 같이 FCCP 처리시 basal EPSC amplitude 가 증가하는 현상의 원인이 될 수 있음을 시사한다. 그러나 figure 1 에서 관찰한 EPSC 의 변화는 시냅스전 말단에 0.45 mM EGTA 가 있는 조건에서 관찰된 것이며 같은 조건에서 global calcium level 의 변화가 관찰되지 않고 EGTA 가 없는 조건에서만 FCCP 에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]$ 변화가 관찰되었다. 따라서 만약 FCCP 에 의한 STP 의 변화가 미토콘드리아 막전압의 저분극에 의한 $[\text{Ca}^{2+}]$ 증가에 의한 것이라면 active zone 근처의 local calcium level 변화에 의한 현상으로 생각된다.

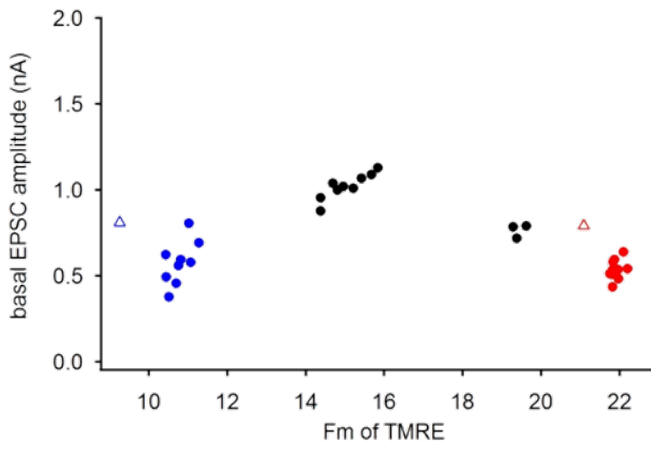
5. Effects of mitochondrial calcium regulation on short-term plasticity.

미토콘드리아가 active zone 의 microdomain calcium 을 조절하는 기능이 있다면 정상적으로 미토콘드리아에서 칼슘이 유리되는 통로인 mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (mNCX)를 막았을 때 STP 에 어떤 영향을 주는지 실험해보았다. 이 실험은 calyx of Held 의 미토콘드리아와 active zone 이 더 공간적으로 밀접해지는 나이인 P13-17 rat 에서 수행하였다. mNCX blocker 인 $2 \mu\text{M}$ TPP^+ 처리 전후로 paired-pulse facilitation 을 관찰하기 위하여 10, 20, 50, 100, 200ms 총 5 가지의 interval 의 paired-pulse stimulation 을 주었다. 그 결과 10~50 ms interval 에서 TPP^+ 를 처리하였을 때 paired-pulse facilitation 이 감소하고 100 ms 이상의 interval 에서는 유의한 변화가 없었다 (Fig. 6). 이러한 결과는 미토콘드리아에서 mNCX 를 통해 세포 내로 방출되는 칼슘이 정상적으로도 vesicle release 에 영향을 주어 PPF 를 증가시키는 역할이 있음을 시사한다.

A.



B.



C.

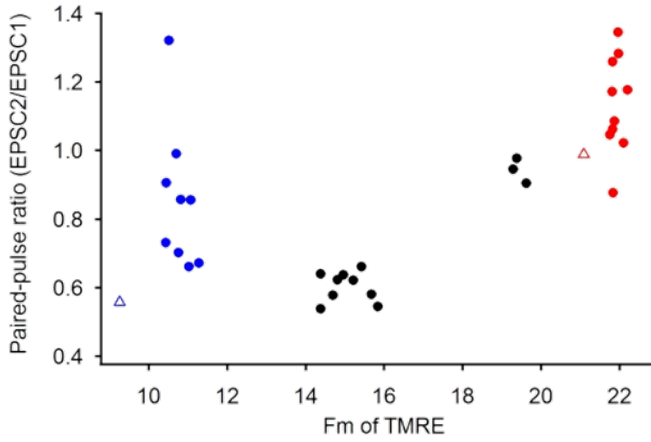
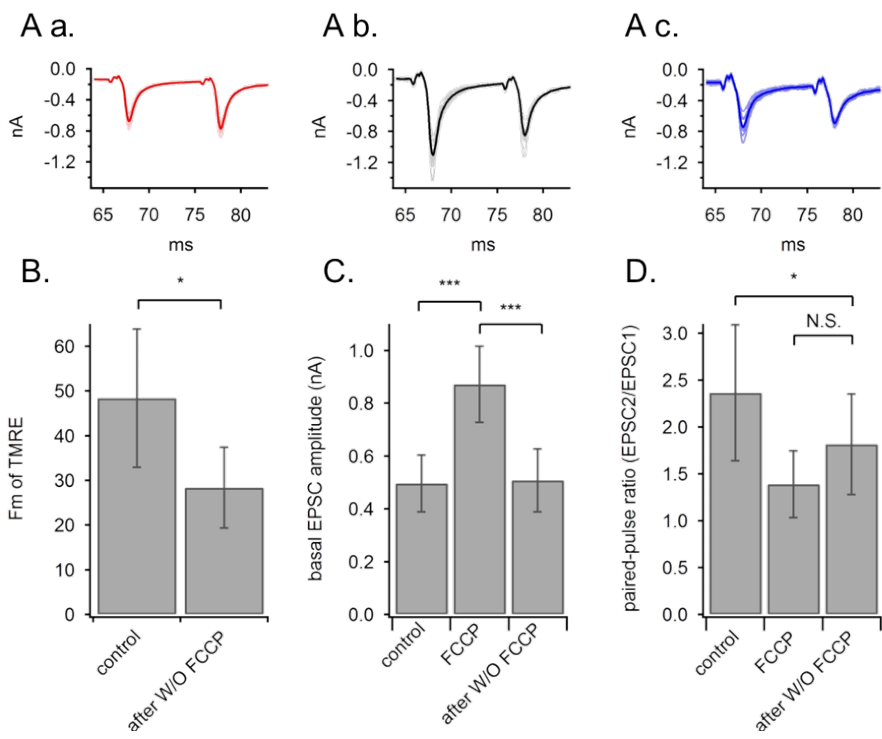


Figure 1. Simultaneous monitoring of presynaptic mitochondrial membrane potential and EPSCs.

(A) Time course of TMRE fluorescence value (F_m , solid lines) and EPSC amplitudes (symbols) as a function of whole-cell recording time (black line). Circles and triangles represent baseline EPSC amplitudes measured from EPSCs evoked by paired-pulses and pulse trains, respectively. Blue bar, period of FCCP treatment; red symbols, control; black symbols, during 1 μ M FCCP treatment; blue symbols, after wash out of FCCP. (cell#F722_1)

(B) Baseline EPSC amplitudes as a function of TMRE fluorescence value.

(C) Paired-pulse ratio ($EPSC_2/EPSC_1$) as a function of TMRE fluorescence value.



**Figure 2. Effects of partial mitochondrial depolarization
on paired-pulse facilitation**

- (A) Averaged EPSC evoked by paired-pulse. Aa, control. Ab, during 1 μ M FCCP treatment. Ac, 2 min after wash out. EPSCs were recorded from the same cell as in Fig. 1 (100 Hz, 2 pulses) (cell#F722_1)
- (B) Mean fluorescence value of TMRE before and after FCCP treatment (Fm). Fm values at 15 points under control conditions and last 15 points after FCCP treatment were averaged. (n=6; cell#F722_1, cell#F812_2, cell#F821_2, cell#F904_1, cell#Fa06_1, cell#Fc19_1)
- (C) Baseline EPSC amplitudes measured from the 1st EPSC of EPSC traces evoked by paired-pulses. (n=6; cell#F722_1, cell#F812_2, cell#F821_2, cell#F904_1, cell#Fa06_1, cell#Fc19_1)
- (D) Mean of paired-pulse ratio (n=6; cell#F722_1, cell#F812_2, cell#F821_2, cell#F904_1, cell#Fa06_1, cell#Fc19_1) Error bars indicate SEM. * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$. N.S., Not Significant.

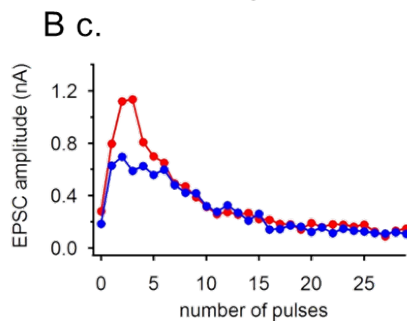
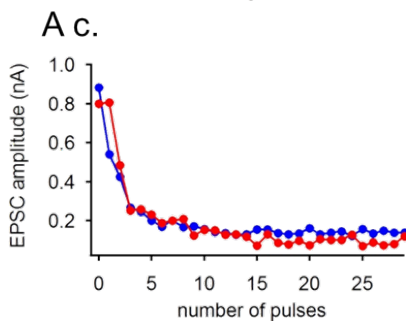
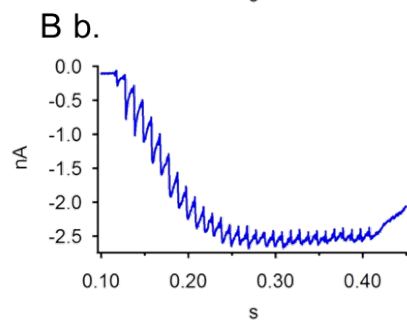
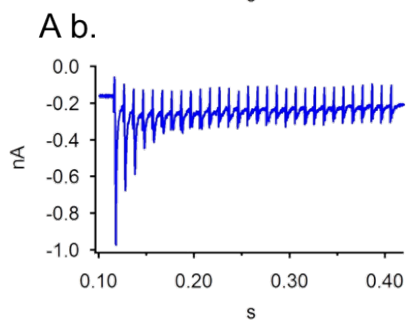
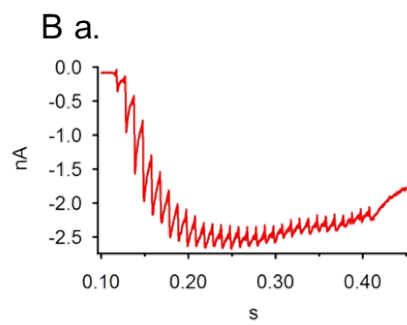
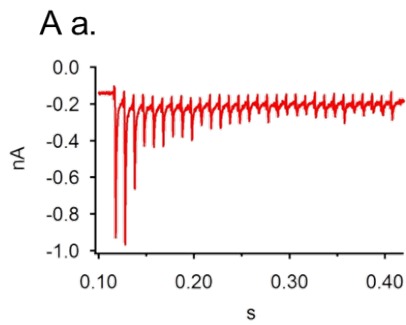


Figure 3. Effects of partial mitochondrial depolarization on STP

(A) EPSCs evoked by a pulse train (100 Hz, 30 pulses). Aa, control. Ab, 6 min after wash out FCCP. Ac, peak amplitude of EPSCs as a function of pulse number. EPSCs were recorded from the same cell as in Fig. 1 and 2 (cell#F722_1).

(B) EPSCs recorded from another cell under the same conditions as in A except for 50 μ M CTZ included in aCSF. Ba, control. Bb, 4 min 30 s after wash out of FCCP. (cell#F904_1)

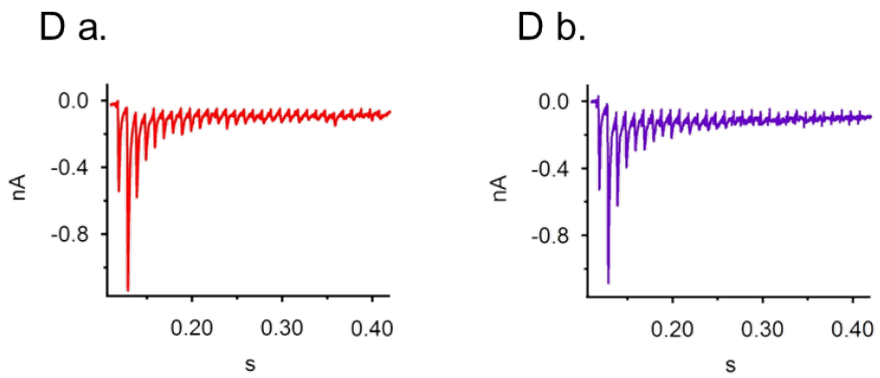
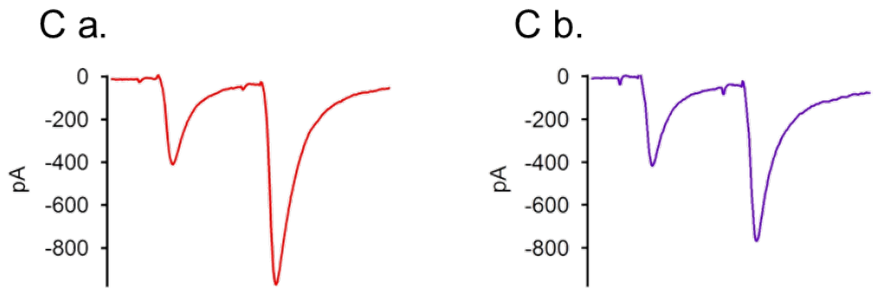
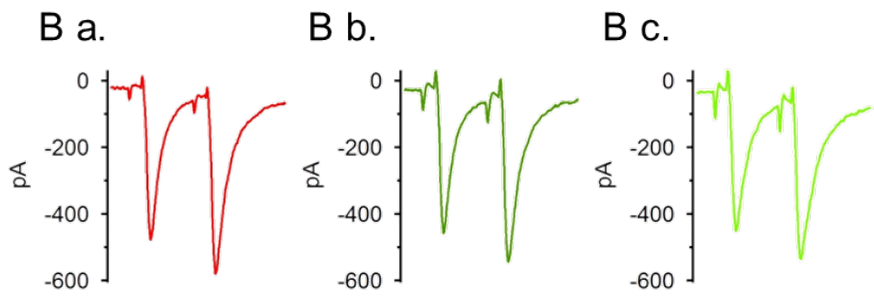
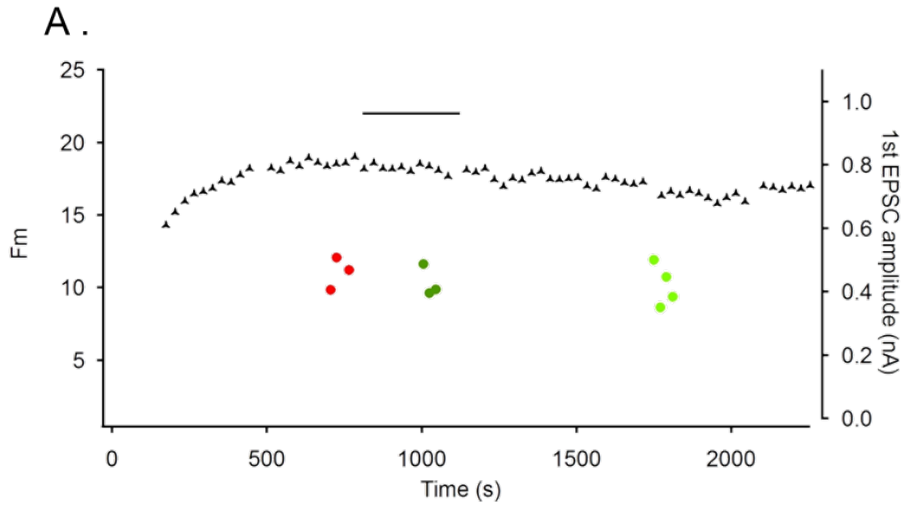


Figure 4. Oligomycin & Ru360 have little effect on STP

- (A) Oligomycin did not alter the time course of TMRE fluorescence (Fm) introduced by a whole-cell patch pipette (black triangles). Black bar indicates the period of oligomycin treatment (2.5 $\mu\text{g/ml}$). Filled circles, first amplitudes of EPSCs evoked by paired-pulses (Red symbols, control; olive, during oligomycin treatment; yellow-green, after wash out of oligomycin) (Cell#F929_1)
- (B) Little effect of oligomycin on PPR. Averaged paired-pulse traces are shown under control conditions (a), during and after superfusion of oligomycin (b=oligomycin, c= 10m after wash out oligomycin) (cell#F929_1).
- (C) Little effect of Ru360 on PPR. Averaged paired-pulse trace. (a, control; b, 20 μM Ru360 treatment in presynaptic internal solution) (a=cell#F925_1, b=cell#Fa01_1)
- (D) EPSCs evoked by a pulse train (100 Hz, 30 pulses) under control conditions (a) and in the presence of Ru360 in presynaptic internal solution (b) (a=cell#F925_1, b=cell#Fa01_1).

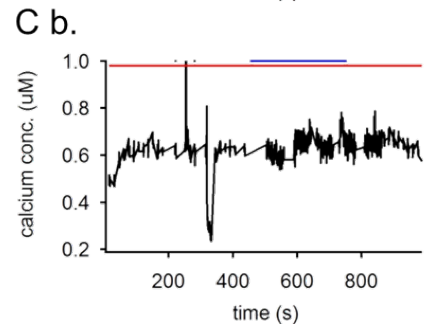
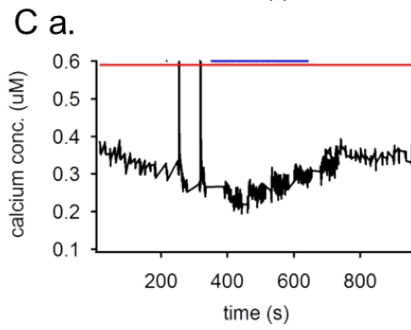
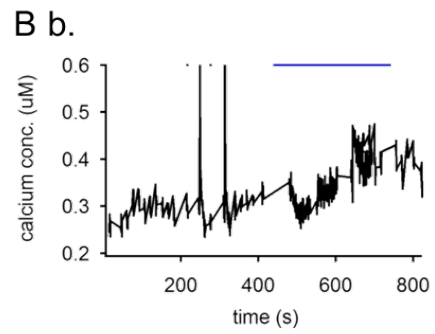
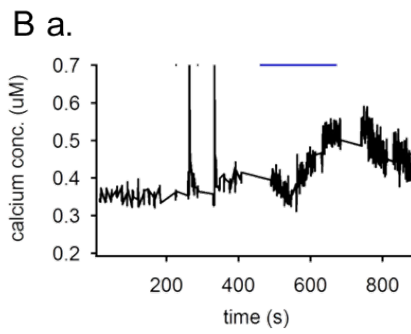
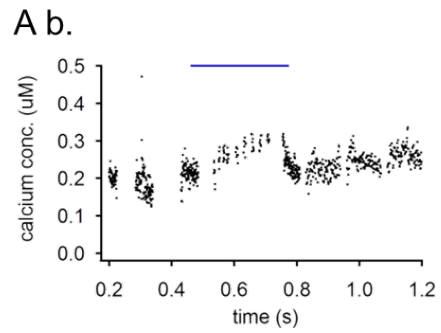
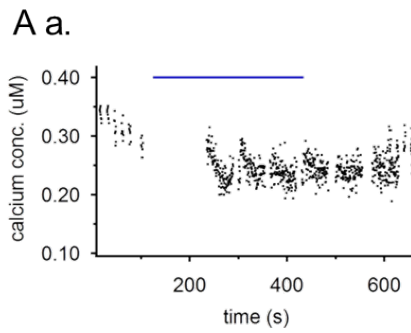


Figure 5. FCCP induces elevation of presynaptic calcium level

- (A) Monitoring cytosolic calcium concentration of presynaptic terminal using Fura-2. Aa, 0.45 mM EGTA, 50 μ M Fura-2 in internal solution. Ab, 0 EGTA, 50 μ M Fura-2 in internal solution. Blue bar indicates the period of FCCP treatment (a, cell#F930_3; b, cell#Fa08_2)
- (B) Effects of FCCP on presynaptic calcium concentration after conditioning it by pulse train stimulation (30 pulses at 100 Hz). $[Ca^{2+}]$ was monitored using fura-2 as in A. Black points indicate the timing of the train stimulation (a; cell#Fb18_1; b; cell#Fb18_2).
- (C) The effects of FCCP on the presynaptic $[Ca^{2+}]$ in the presence of 2 μ M TPP⁺. Red bars indicate the period of TPP⁺ treatment (a; cell#Fb19_1, b; cell#Fb20_1).

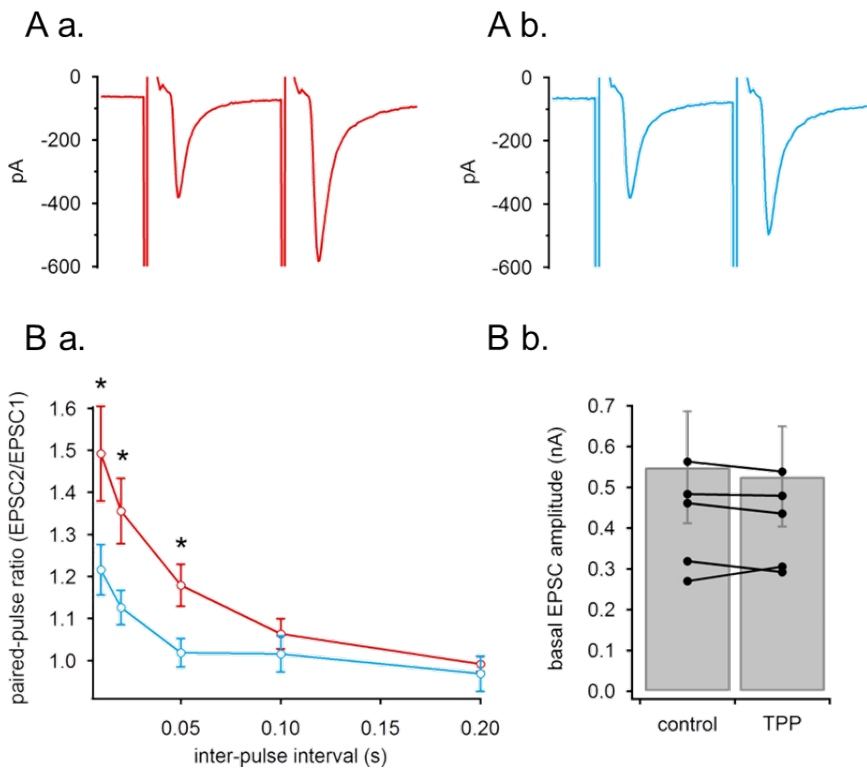


Figure 6. Block of calcium release from mitochondria affects

STP in short pulse intervals

(A) Averaged EPSCs induced paired-pulse stimulation (interval=10 ms) (a, control; b, 2 μ M TPP⁺)

(B) Ba, Plot of mean paired-pulse ratio as a function of inter-pulse interval. Bb, Mean values for baseline amplitudes under control and in the presence of 2 μ M TPP⁺ (n=6; cell#D308_1, cell#D318_1, cell#D326_1, cell#D403_1, cell#D410_1, cell#D423_1). Error bars indicate SEM. * $P < 0.05$

고찰

시냅스전 말단의 미토콘드리아는 시냅스 소낭의 유리와 재활용에 필요한 ATP 를 생산하고 시냅스전 말단 내의 칼슘 농도 조절에 관여한다고 알려져 있다. Mitochondrial uncoupler 를 이용해 미토콘드리아 막전압의 저분극을 유도하여 시냅스전 말단의 미토콘드리아의 기능을 저해하면 short-term plasticity (STP)가 감소하는 것을 알 수 있었다. 이 때 미토콘드리아의 두 가지 역할 중 어느 요소가 STP 에 영향을 주는지 알고자 했고, oligomycin 을 처리하여 ATP synthase 를 막았을 때와 시냅스전 말단에 공급해주는 ATP 의 농도를 다르게 해도 미토콘드리아 막전압의 저분극에 의해 나타난 변화와 같은 현상을 관찰할 수가 없었다. 하지만 FCCP 를 처리하면 시냅스전 말단 내의 칼슘 농도가 올라가는 것을 관찰하였고 mNCX blocker 를 사용하여 미토콘드리아로부터 방출되는 칼슘을 막았을 때 paired pulse ratio 가 감소하는 것을 알 수 있었다. 이를 통해 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의 저분극에 의해서 일어나는 STP 의 변화는 미토콘드리아의 두 가지 역할 중 칼슘 농도 조절에 영향을 받는다는 결론을 내릴 수 있었다.

FCCP 를 처리하는 5 분동안 STP 의 변화를 관찰했을 때 basal EPSC amplitude 가 증가하고 FCCP 처리를 중단하면 FCCP 처리

전의 수준으로 회복되는 것을 알 수 있었다. 이는 FCCP 처리가 release probability 를 증가시켰음을 의미한다. 시냅스 소낭의 release probability 를 결정하는데 중요한 요소인 시냅스전 말단의 칼슘 농도에도 변화가 일어나는지 관찰해 보았다. FCCP 가 0.45 mM EGTA 가 존재하는 환경에서는 시냅스전 말단의 칼슘 농도를 변화시키지 않았지만, EGTA 가 없는 환경에서는 증가시켰다. 그리고 train stimulation 후의 세포 내 칼슘 농도가 더 많이 증가하였고 mNCX blocker 를 처리하였을 때는 미토콘드리아 막전압의 저분극이 일어나도 칼슘 농도가 변하지 않았다. 이러한 결과를 보아 FCCP 에 의해 미토콘드리아에서 칼슘이 방출된다는 것을 알 수 있었다. 하지만 실제 STP 변화를 관찰했던 실험의 환경은 0.5 EGTA 가 존재하는 상황이므로 release probability 가 증가하지만 global calcium level 은 변화 없다는 것을 의미한다. 하지만 global calcium level 은 변하지 않았음에도 불구하고 EPSC 는 일시적으로 커졌으므로, 이는 수행했던 실험으로는 관찰할 수 없던 local calcium level 의 변화에 의한 것이라고 생각해볼 수 있다. 미토콘드리아와 active zone 은 공간적으로 매우 가까이 coupling 되어 있다고 알려져 있다 (Wimmer, Horstmann, Groh, & Kuner, 2006). 그러므로 미토콘드리아와 active zone 사이의 상호작용으로 인해 국소적으로 일어나는 칼슘 농도의 변화가 vesicle 의 release 를 조절할 수 있을 것으로 예상된다. 이러한

가설로 global calcium level 에는 변화가 없지만 EPSC 는 증가하는 현상을 설명할 수 있을 것이다.

Calyx of Held 는 cell body 를 둘러싸고 있는 두껍고 단순한 모양에서 maturation 됨에 따라 손가락과 같은 모양으로 가지가 생겨나고 가지 끝에 bouton 과 같은 모양으로 분화된다. 그에 따라 넓은 면적에 분포하던 미토콘드리아가 세분화된 bouton 마다 자리를 잡게 되고 active zone 과 좀 더 인접한 위치에 분포하게 된다. 이러한 변화는 synaptic vesicle 이 release 되는 과정에 미치는 미토콘드리아의 영향이 더 커질 것으로 해석할 수 있다. Active zone 근처에서 국소적으로 발생하는 미토콘드리아의 ATP 공급과 칼슘 조절 작용으로 인해 release probability 가 조절될 가능성이 커지는 것이다. 본 논문에서 관찰했던 세포 내 칼슘 농도는 immature presynaptic terminal 에서 측정한 global calcium concentration 이지만, 좀 더 maturation 이 된 시냅스전 말단에서의 local calcium level 을 측정할 수 있다면 형태학적 변화에 따른 칼슘 조절 작용을 관찰할 수 있을 것이다.

세포 내 EGTA 가 없는 환경에서 FCCP 에 의한 미토콘드리아 막전압의 저분극이 일어나면 세포 내 칼슘 농도가 증가하고 이는 mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger(mNCX)를 통해서 방출된다는 것을 관찰할 수 있었다. 그렇다면 mNCX 를 block 했을 때 paired pulse ratio (PPR)에 어떤 영향을 주는지 관찰해보았다. 그 결과 PPR 이 감소하는 것을 관찰할 수 있었고 FCCP 에 의한

미토콘드리아 막전압의 저분극이 일어날 때 PPR 이 감소하는 정도와 비슷하였다. 그러므로 미토콘드리아 막전압의 저분극이 발생할 때 증가하는 세포 내 칼슘은 mNCX 를 통해 방출된 칼슘이라는 것을 다시 한번 확인할 수 있었다.

FCCP 에 의한 부분적인 미토콘드리아 막전압의 저분극으로 인해 train stimulation 을 했을 때 관찰되었던 facilitation 이 감소하는 것을 알 수 있었다. 이는 미토콘드리아 막전압의 저분극이 synaptic vesicle pool 의 크기에 영향을 주어서 나타날 가능성을 생각해볼 수 있다. 미토콘드리아 막전압의 저분극으로 인해 미토콘드리아에서 유래된 칼슘이 자발적이고 비동기적인 synaptic vesicle fusion 을 증가시켜 slow releasing vesicle pool (SRP)의 크기를 줄일 수도 있다. 다른 가능성으로서 FCCP 처리시 미토콘드리아에서 칼슘이 방출되기 때문에 미토콘드리아가 저장하고 있는 칼슘의 양이 줄어들어, 결과적으로 SRP recovery 에 영향을 미치는 미토콘드리아에서 방출되는 칼슘이 부족하게 되어 SRP 가 감소하는 현상이 나타날 수도 있다고 생각한다. 이를 확인하기 위해서 미토콘드리아의 칼슘 방출을 막은 상황에서 SRP 를 확인해보는 실험을 추가적으로 수행할 필요가 있다.

SRP 는 asynchronous release 에 관여하고, SRP 에 속하는 vesicle 들은 actin dependent manner 로 FRP 로 이동하여 고빈도 자극 시 EPSC facilitation 에 기여한다. 미토콘드리아의 저분극으로 SRP 의 크기가 줄어들게 되면 SRP 가 FRP 를 빠르게 채워주지

못하므로 facilitation 이 감소하고 대신 short-term depression 으로 바뀌는 것으로 생각된다. (J. S. Lee, Ho, Neher, & Lee, 2013).

참 고 문 헌

- Hosoi, N., Sakaba, T., & Neher, E. (2007). Quantitative analysis of calcium-dependent vesicle recruitment and its functional role at the calyx of Held synapse. *J Neurosci*, *27*(52), 14286–14298. doi:10.1523/JNEUROSCI.4122-07.2007
- Kim, M. H., Lee, S. H., Park, K. H., Ho, W. K., & Lee, S. H. (2003). Distribution of K^+ -dependent Na^+/Ca^{2+} exchangers in the rat supraoptic magnocellular neuron is polarized to axon terminals. *J Neurosci*, *23*(37), 11673–11680.
- Lee, D., Lee, K. H., Ho, W. K., & Lee, S. H. (2007). Target cell-specific involvement of presynaptic mitochondria in post-tetanic potentiation at hippocampal mossy fiber synapses. *J Neurosci*, *27*(50), 13603–13613. doi:10.1523/JNEUROSCI.3985-07.2007
- Lee, J. S., Ho, W. K., Neher, E., & Lee, S. H. (2013). Superpriming of synaptic vesicles after their recruitment to the readily releasable pool. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(37), 15079–15084. doi:10.1073/pnas.1314427110

- Lee, J. S., Kim, M. H., Ho, W. K., & Lee, S. H. (2008). Presynaptic release probability and readily releasable pool size are regulated by two independent mechanisms during posttetanic potentiation at the calyx of held synapse. *Journal of Neuroscience*, *28*(32), 7945–7953. doi:10.1523/Jneurosci.2165–08.2008
- Lee, J. S., Kim, M. H., Ho, W. K., & Lee, S. H. (2013). Developmental upregulation of presynaptic NCKX underlies the decrease of mitochondria-dependent posttetanic potentiation at the rat calyx of Held synapse. *J Neurophysiol*, *109*(7), 1724–1734. doi:10.1152/jn.00728.2012
- Schneggenburger, R., & Neher, E. (2000). Intracellular calcium dependence of transmitter release rates at a fast central synapse. *Nature*, *406*(6798), 889–893. doi:10.1038/35022702
- Verstreken, P., Ly, C. V., Venken, K. J., Koh, T. W., Zhou, Y., & Bellen, H. J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron*, *47*(3), 365–378. doi:10.1016/j.neuron.2005.06.018

- Vos, M., Lauwers, E., & Verstreken, P. (2010). Synaptic mitochondria in synaptic transmission and organization of vesicle pools in health and disease. *Front Synaptic Neurosci*, *2*, 139. doi:10.3389/fnsyn.2010.00139
- Wimmer, V. C., Horstmann, H., Groh, A., & Kuner, T. (2006). Donut-like topology of synaptic vesicles with a central cluster of mitochondria wrapped into membrane protrusions: a novel structure-function module of the adult calyx of Held. *J Neurosci*, *26*(1), 109–116. doi:10.1523/JNEUROSCI.3268-05.2006

Abstract

Mitochondria not only produce ATP but also buffer cytosolic calcium increase. In this thesis, I studied the role of presynaptic mitochondria in synaptic transmission. To this end, I examined the effect of presynaptic mitochondrial depolarization on short-term plasticity in the calyx of Held synapses, where dual patch-clamp recordings are feasible.

When partial mitochondria depolarization was induced using 1 μM carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), a drug that causes mitochondrial membrane depolarization, basal EPSC amplitudes of paired-pulse increased during the periods of FCCP treatment and recovered after wash out of FCCP. After FCCP treatment, short-term facilitation was decreased. Such changes in STP were not induced by oligomycin, an inhibitor of ATP synthase, and Ru360, an inhibitor of mitochondrial uniporter.

Furthermore, FCCP increased the presynaptic calcium levels in the absence of EGTA in the patch pipette. After the presynaptic terminal was conditioned with pulse train stimulation, FCCP

increased the presynaptic calcium levels raised to a larger extent, but did not under tetraphenylphosphonium (TPP⁺).

From these results, I conclude that mitochondrial depolarization alters short-term synaptic plasticity via presynaptic Ca²⁺ dysregulation.

Keywords: mitochondria, membrane depolarization, FCCP, calcium, ATP, short-term plasticity

Student number: 2013 - 23522