



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](#)

이학석사학위논문

전자현미경을 이용한 *rab8* 돌연변이  
시냅스의 미세구조 분석

2014년 2월

서울대학교 대학원

협동과정 뇌과학전공

김혜란

# 전자현미경을 이용한 *rab8* 돌연변이 시냅스의 미세구조 분석

지도교수 이 승 복

이 논문을 이학석사학위논문으로 제출함

2013년 12월

서울대학교 대학원  
협동과정 뇌과학전공  
김혜란

김혜란의 석사학위논문을 인준함

2013년 12월

위원장 오석배 (인)

부위원장 이승복 (인)

위원 최세영 (인)



## 국문 초록

# 전자현미경을 이용한 *rab8* 돌연변이 시냅스의 미세구조분석

김혜란

협동과정 뇌과학전공

서울대학교 대학원

Rab 단백질은 GTP가 결합된 활성화된 상태와 GDP가 결합된 비활성화 상태를 순환하면서 세포내 막 수송을 조절한다. Rab 단백질의 일종인 Rab8은 endosomal compartments로 부터 세포막으로의 막 수송을 조절하는 것으로 알려져 있으나, 신경전달물질이 분비되는 장소인 시냅스에서의 기능은 연구되지 않았다. 본 연구실은 FM1-43 염료를 이용한 선행 연구를 통하여, Rab8 기능이 상실됨에 따라 초파리 신경근육이음부에서 시냅스 소낭의 exocytosis 과정이 저해됨을 규명하였다. 본 학위논문의 목적은 전자현미경을 이용하여 *rab8* 돌연변이 초파리 유충의 신경근육이음부 시냅스전 말단의 미세구조와 시냅스 소낭의 공간적 분포를 분석하는데 있다. 야생형과 비교하였을 때, *rab8* 돌연변이 뷰톤의 전체적인 형태는 정상적이었으나, 소낭

밀도와 시냅스전 말단의 active zone에 결합된 소낭의 수가 증가하는 현상을 관찰하였다. 또한 *rab8* 돌연변이 뷰톤에서 시냅스 소낭의 재순환과정을 활성화시켰을 때 나타나는 endosomal cisternae의 형성이 정상적으로 일어남을 규명하였다. 이러한 결과들은 *rab8* 돌연변이에서 나타나는 FM1-43 분비의 저하현상과 더불어 Rab8이 시냅스 소낭을 통한 exocytosis 과정을 조절함을 제시한다.

주요어 : Rab8, 신경근육이음부, 시냅스 소낭, exocytosis

학 번 : 2011-23289

# 목 차

국문 초록	i
목 차	iii
그림 목차	iv
약 어	v
본 문	
1. 서 론	1
2. 실험 재료 및 방법	6
3. 결 과	
3.1. <i>rab8</i> 돌연변이에 의한 시냅스의 미세구조 변화 연구	9
3.2. <i>rab8</i> 돌연변이에 의한 시냅스 소낭의 축적	13
3.3. 시냅스 활성을 유도하는 강한 자극 시, <i>rab8</i> 돌연변이에서 endosome과 유사한 구조인 cisternae 증가	19
3.4. <i>rab8</i> 돌연변이에서 시냅스 소낭의 재순환 회복 지연	23
4. 고 찰	32
5. 참고 문헌	36
Abstract	47

## 그림 목차

그림 1. *rab8* 돌연변이 시냅스의 미세구조 분석

그림 2. *rab8* 돌연변이 시냅스에서 active zone에서 docking된 시냅스 소낭의 변화

그림 3. *rab8* 돌연변이 시냅스에서 시냅스 소낭의 밀도 증가

그림 4. *rab8* 돌연변이에서 depolarization을 유도하는 고농도 포타슘 용액을 이용한 자극동안 시냅스 소낭의 변화

그림 5. 강한 자극이후 회복시간을 준 뒤, 시냅스 뷰톤의 cisternae수 변화

그림 6. *rab8* 돌연변이의 active zone 영역에서 시냅스 소낭의 재순환 회복을 비교

표 1. Type Ib 시냅스 뷰톤 구조의 양적 분석

보충그림 1. 대표적인 Type Ib 시냅스 뷰톤 그림

## 약어

FasII	Fasciclin II
GAP	GTPase activation protein
GDP	Guanosine diphosphate
GEF	Guanine nucleotide exchange factor
GTP	Guanosine triphosphate
NCAM	Neural cell adhesion molecule
NMJ	Neuromuscular junction
PBS	Phosphate-buffered saline
Rab	Ras-related proteins in brain
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor

# 1. 서 론

시냅스는 20-30 nm 간극을 사이에 두고 시냅스전 말단과 시냅스후 말단으로 구성된 세포 간 연결구조로 신경과 신경 사이의 정보교환이 이루어지는 주요 장소이다. 시냅스를 통한 정보전달은 신경의 세포체(soma)에서 발생한 활동전위에 의해 유도되는 일련의 과정을 통해 이루어진다. 축삭 말단이 depolarization되면 시냅스전 말단에 분포되어 있는 칼슘채널이 열리게 되고, 이를 통해 세포내로 칼슘이 유입되어 시냅스전 말단의 칼슘농도가 증가된다. Active zone 주변에 조밀하게 모여 있는 시냅스 소낭은 docking과 fusion과정이 유도된다. 시냅스 소낭에 포함된 신경전달물질은 시냅스 간극으로 분비되어 시냅스후 신경말단으로 신경신호가 전달된다 (Katz et al., 1969). Glutamate는 초파리 신경근육이음부에서 주요한 흥분성 신경전달물질이며, 시냅스후 말단에 존재하는 glutamate 수용체에 특이적으로 결합한다. 초파리 신경근육이음부에는 대사성 glutamate 수용체와 이온투과성 glutamate 수용체가 존재하는데, 리간드 개폐형 이온 채널인 이온투과성 glutamate 수용체는 glutamate가 결합되면 채널이 열리고 양이온이 유입되어 시냅스후 근육세포의 depolarization이 유도된다 (Jan and Jan, 1976).

분자수준에서 exocytosis 과정에 관련된 기전은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데, 시냅스 소낭이 세포막에 결합하는 docking (tethering) 과정과 이중 지질 막과 결합하는 fusion 과정이다. Exocytosis 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려진 SNAREs (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptors)는 시냅스 소낭 막에 위치한 vesicle SNARE (v-SNARE)와 표적 세포막에 위치하는 target SNARE (t-SNARE)로 나뉘

다. Fusion 과정에서 v-SNARE인 synaptobrevin과 t-SNARE인 syntaxin은 SNAP-25 (25-kD synaptosomal-associated protein) 단백질과 함께 trans-SNARE 복합체를 이루어서 시냅스 소낭 막과 세포 이중지질막의 결합이 유도 된다 (Rothman, 1994; Sutton et al., 1998; Weber et al., 1998). Trans-SNARE 복합체의 조립과정은 Munc18/Sec1 단백질이, 분리과정은 NSF (N-ethyl-maleimide-sensitive fusion protein)와  $\alpha$ -SNAP ( $\alpha$ -soluble NSF attachment protein)에 의해 조절된다고 알려져 있다 (Rothman, 1994; Sutton et al., 1998; Weber et al., 1998).

Rab 단백질은 Ras 계열의 small GTPase로서, GTP (Guanosine triphosphate)가 결합된 활성 상태와 GDP (Guanosine diphosphate)가 결합된 비활성 상태를 순환하면서 세포내 소낭의 수송을 조절한다. 이러한 과정은 GEFs (guanine nucleotide exchange factors)와 GAPs (GTPase activation proteins)에 의해 조절됨이 잘 알려져 있다 (Delprato et al., 2004; Eathiraj et al., 2005; Haas et al., 2007). Rab 단백질 중 Rab3와 Rab3 interacting molecule (RIM) 단백질은 시냅스 소낭의 이동 및 분비과정에서 중요한 기능을 수행함이 밝혀져 있다 (Richmond et al., 2002). 특히 초파리를 이용한 유전학적 연구를 통해 Rab3 단백질이 신경전달 물질의 분비가 이루어지는 active zone의 조립과정에서 매우 중요한 기능을 수행함이 밝혀졌다 (Graf et al., 2009).

인간의 경우 약 60개 이상의 Rab family가 존재하고, 세포내 소기관 사이의 물질수송에 핵심적인 기능을 수행함이 밝혀졌다 (Schwartz et al., 2007; Pereira-Leal et al., 2001; Zerial et al., 2001). Rab8은 trans-Golgi에서 세포막으로의 수송과정을 조절하는 것으로 알려졌다 (Ang et al., 2003; Huber et al., 1993; Sato et al., 2007; Hattula et al., 2006). 그리고 Rab8A는 Rab6에 의존하여 exocytosis 과정에서 소낭 수송과정의 docking과 fusion에

필요하다는 연구 보고가 있다 (Grigoriev et al., 2011).

초파리에서는 현재까지 33개 이상의 Rab 유전자가 존재하고, 고등동물의 Rab 단백질들과 아미노산 서열에서 매우 높은 유사성을 나타내며 기능 또한 진화적으로 잘 보존돼 있음이 밝혀져 있다 (Zhang et al., 2007). 초파리의 시냅스에서 연구된 Rab 단백질 중 Rab3는 Rab3-GAP과 시냅스 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데, 시냅스 소낭의 분비 마지막 단계에서 기능함이 밝혀졌다 (Müller et al., 2011). 또한 Rab5와 Rab11은 endosomal compartment에 위치하여 시냅스 소낭의 수송과정을 조절함으로써, 시냅스의 기능 또는 성장에 필수적인 역할을 한다고 알려졌다 (Wucherpfennig et al., 2003; Khodosh et al., 2006).

초파리의 신경근육이음부 (neuromuscular junction, NMJ)는 인간의 중추신경계에 존재하는 흥분성 시냅스인 glutamatergic 시냅스로 이루어져 있다. 시냅스의 기능 및 가소성을 조절하는 유전자와 이와 관련된 신호전달과정이 인간과 진화적으로 잘 보존되어 시냅스의 발달과 기능을 이해하는데 동물모델로서 많은 장점을 갖고 있다. 초파리의 신경근육이음부에서 시냅스 소낭의 수송과정의 이해는 유전학적인 접근을 통해 이루어졌는데, SNARE 복합체를 포함해 *dunc-13*, *comatose*, *dcaps*이 시냅스 소낭의 docking이나 fusion을 조절한다는 결과가 보고되었다 (Aravamudan et al., 1999; Littleton et al., 2001; Renden et al., 2001). 이외에도 *stoned*은 시냅스 소낭에 위치한 칼슘이온 센서인 synaptotagmin의 sorting과 recycling을 조절함이 밝혀졌다 (Fergestad et al., 1999).

본 연구실은 초파리의 Rab8 단백질이 배 발생단계에서 중추신경계와 상피세포에 발현되고, 유충의 NMJ에서는 glutamate를 신경전달물질로 이용하는 type I 시냅스에서 발현됨을 밝혔다. 또한 초파리의 NCAM (neural cell adhesion molecule) orthologue인 FasciclinII (FasII)의 양이 감소함으로 인

해 시냅스 과 성장이 유도됨을 제시하였다. 이는 Rab8이 시냅스 구조 및 기능에 중요한 역할을 하고 있음을 보여주는 결과이다 (서울대학교 대학원 학위논문, 박선영, 2010). 그리고 FM1-43 염료를 이용한 분석을 통해 Rab8 기능이 상실됨에 따라 초파리 신경근육이음부에서 시냅스 소낭의 exocytosis 과정이 저해됨을 규명하였다. 그러나 *rab8* 돌연변이 시냅스에서 exocytosis 과정 중 어느 단계에 결함이 있는지 시냅스 미세구조에 관한 연구는 이루어지지 않았다.

전자현미경을 이용하여 세포와 조직의 구조 분석은 광학현미경 상에서 관찰할 수 없는 미세구조에 대한 정보를 제공한다. 중추신경계에서 시냅스 전 말단은 일반적으로 시냅스 소낭 또는 미토콘드리아로 이루어진 미세부피이므로 현재 광학기술의 한계로 인해 전체 시냅스 수준에서 일어나는 현상만을 관찰 할 수 있다. 즉 광학 현미경 기법을 용한 연구는 시냅스 말단의 구조적 (공간적) 세부사항에 대해 쉽게 이해하기 힘들다.

본 학위논문연구의 목적은 전자현미경을 이용하여 *rab8* 돌연변이 초파리 신경근육이음부의 시냅스전 말단의 미세구조를 통해 시냅스 소낭의 공간적 분포를 분석함으로써, 시냅스 구조와 시냅스 소낭의 순환과정에서 Rab8의 기능을 보다 자세히 밝히는데 있다. 야생형은 active zone에 하나의 T-bar가 형성되는 것이 대부분인 반면, *rab8* 돌연변이에서는 T-bar가 형성되지 않거나 두 개 이상을 형성하는 active zone의 비율이 증가하였다. 그리고 시냅스전 말단에 docking된 시냅스 소낭이 증가하는 현상은 시냅스 소낭의 post-docking 과정이 저해됨을 보여주는 결과이다. 마지막으로 고농도의 KCl 용액을 이용하여 강한 자극으로 시냅스 소낭의 재순환과정을 활성화시켰을 때, *rab8* 돌연변이에서 endosome과 구조적으로 유사한 cisternae의 수가 야생형에 비해 증가하였다. 이후 회복시간이 주어졌을 경우 야생형과 달리 *rab8* 돌연변이는 평소 수준으로 회복하지 못하였다. 이는 Rab8이 시냅스

전 말단에서 endosome으로부터 형성되는 시냅스 소낭의 순환과정에서 중요한 역할을 한다는 가능성을 제시한다.

## 2. 실험 재료 및 방법

### *Drosophila* strains

야생형 초파리는  $w^{1118}$ 을 사용하였다. *rab8* 돌연변이 초파리는 *rab8* 유전자에 EP인자가 삽입된 라인을 사용하여 EP인자의 imprecise excision 유도하여 *rab8* 유전자 일부가 소실된 돌연변이인 *rab8<sup>1</sup>*과 *rab8<sup>2</sup>*의 transheterozygote 돌연변이인 *rab8<sup>1</sup>/rab8<sup>2</sup>*을 사용하였다. *rab8* 돌연변이 초파리는 본 연구실에서 제조하였고, 제조과정과 유전자 삭제영역은 논문 (서울대학교 대학원 학위논문, 박선영, 2010)에 자세히 설명하고 있다.

### 투과전자현미경

초파리의 3령 유충은  $Ca^{2+}$ -free HL3 saline (70 mM NaCl, 5 mM KCl, 20 mM  $MgCl_2$ , 10 mM  $NaHCO_3$ , 5mM Trehalose, 115 mM sucrose, 5 mM HEPES pH 7.2)에서 해부하였다. 고농도의 포타슘 이온을 이용한 시냅스 자극을 유도하는 조건은 10분간 90 mM  $K^+$  saline에서 진행한 후, 시료를 고정하였다. 시냅스 자극 후 회복실험은 90 mM KCl 용액을 제거, wash 한 후에  $Ca^{2+}$ -free HL3 saline에서 10분간 회복을 유도한 후 시료를 고정하였다. 6번과 7번 근육의 위치를 찾기 위해 초파리 뇌를 중심으로 hemisegment로 나누어 자르고, 2.5% glutaldehyde, 4% paraformaldehyde (0.1 M phosphate buffer,

pH 7.2)로 4°C에서 6 시간 동안 전 고정 후 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2)로 5분간 3회 세척하고, 1% osmium tetroxide (0.1 M phosphate buffer, pH 7.2) (Electron Microscopy Sciences)로 상온에서 1시간 30분 동안 후 고정 하였다. 모든 고정이 끝난 시료는 0.1 M phosphate buffer로 5분간 3회 세척 후, 에탄올 농도 상승 순 (50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 100%)으로 탈수과정을 거쳐 propylene oxide (Sigma)로 치환하였다. Epon-812 mixture (Electron Microscopy Sciences)의 비율을 점차적으로 높여서 resin을 조직으로 침투시킨 후, 순수한 Epon mixture로 포매하여 60°C 오븐에서 48 시간동안 열 중합 하였다. 블록은 초박절편기 (Leica)를 이용하여 1  $\mu$ m의 박 절편을 만들어 toluidine blue (Electron Microscopy Sciences)로 염색한 후 광학현미경 상에서 관찰하여 근육의 위치를 파악하였다. 초박절편을 만들기 위해 블록은 초파리 3령 유충의 A2와 A3 체절의 6번과 7번 근육을 가로로 연속 절단 하였다 (70 nm). 연속적인 초박절편은 formvar 막을 코팅한 single hole grid에 부착하고, 1% uranyl acetate와 0.3 % lead citrate (Electron Microscopy Sciences)로 이중 염색하여 투과전자현미경 (JEOL)으로 가속전압 80 kV에서 관찰하였다. Type Ib bouton은 Gatan Digital micrograph software을 이용한 ES1000W CCD camera (Gatan)로 40,000X에서 촬영하였다.

## 이미지 분석

모든 전자현미경 사진은 NIH Image J 1.38 프로그램을 이용하여 그 길이나 크기를 측정하였고, 다음 기준에 의하여 선발된 6번과 7번 근육에 형성된 신경근육이음부의 시냅스 말단을 촬영한 전자현미경 사진만을 이용하

였다. 1) 시냅스 bouton 의 최대 지름이 2  $\mu\text{m}$  이하는 type Is bouton이라 간주하고 분석에서 제외하였고 (Karunanithi et al., 2002), 2) 시냅스 bouton 내에 시냅스 소낭의 양이 충분히 양호한 양이 존재할 때, 3) 시냅스전 세포막의 active zone에서 T-bar라고 불리는 T 형태의 구조가 하나 이상이 존재하는 경우로 샘플을 선발하였다 (Graf et al., 2012).

시냅스 말단의 미세구조를 관찰하여 대표적인 시냅스 전세포의 변수들로 뷰톤 크기, active zone의 수와 길이, 미토콘드리아의 수, T-bar의 수를 측정하였다. 일반적으로 전자현미경상에서 신경근육이음부의 시냅스전 말단 세포막과 근육 세포막이 시냅스 간극을 사이에 두고 매우 근접하게 마주하고 있어 전자밀도가 높게 관찰되어지는데, 이를 신경전달물질이 분비되는 장소인 active zone 이라고 한다 (보충그림 1). active zone에는 T-bar와 그 주위에 시냅스 소낭이 조밀하게 모여 있다. Clustered vesicles은 T-bar를 중심으로 시냅스 말단 세포막의 250 nm 반경이내의 30-40 nm 크기의 시냅스 소낭만을 분석하였다 (Long et al., 2008). Docked vesicles은 active zone의 시냅스전 말단 세포막과 접촉하고 있거나 20 nm 이내의 거리에 있는 시냅스 소낭만을 포함하여 측정하였다 (보충그림 1). 전체 vesicle density는 시냅스 bouton 내에 30-40 nm 크기의 시냅스 소낭을 세어 면적으로 나누어 표준화하였다. Cisternae의 수는 10장 연속절편에서 나타나는 직경이 70 nm이상의 크기의 시냅스 소낭을 합산하여 분석하였다.

### 3. 결 과

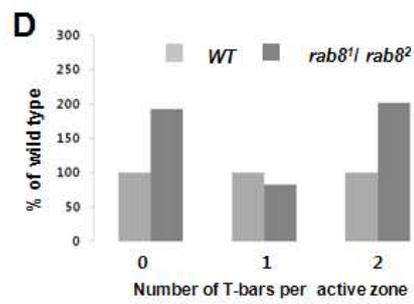
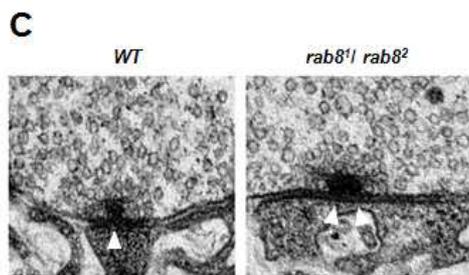
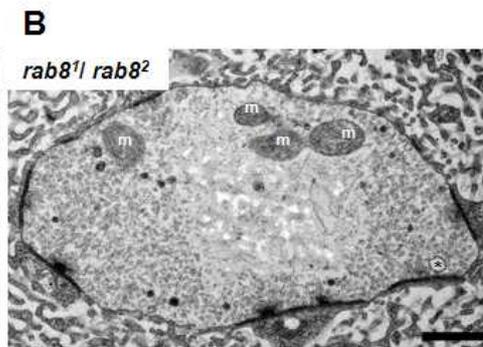
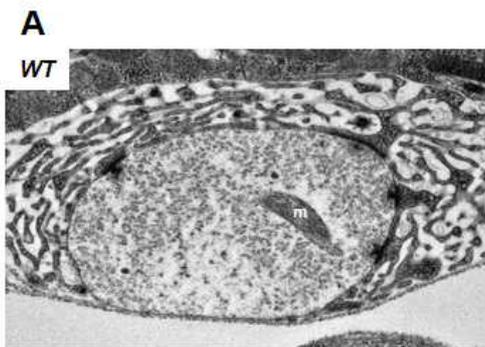
#### 1. *rab8* 돌연변이에 의한 시냅스의 미세구조 변화 연구

시냅스전 말단에는 시냅스 소낭의 exocytosis를 조절하기 위해 칼슘 이온채널을 포함한 여러 단백질들이 active zone에 위치하여 시냅스의 효율성을 조절한다. 초파리의 신경근육이음부는 시냅스 소낭의 분포나 active zone의 구조를 조절하는 기전을 밝히는데 좋은 시스템이다. 전자현미경 사진 상에서 초파리 신경근육이음부의 active zone은 시냅스전 세포막과 시냅스후 세포막이 나란히 마주하는 곳에서 전자밀도가 높게 관찰된다. 또한 시냅스전 세포막에 투사되는 T 형태의 구조 (electron dense body)는 T-bar라고 부르며, 신경전달물질 분비에 연관이 있음이 밝혀져 있다 (Atwood et al., 1993). 초파리 신경근육이음부 시냅스전 말단에서 active zone의 3분의 2가량은 하나의 T-bar가 형성되며, 또한 T-bar가 형성되지 않거나 두 개 또는 세 개가 형성되는 경우도 있다 (Atwood et al., 1993). 시냅스전 말단에 존재하는 칼슘이온채널과 같은 필수적인 기관들은 신경신호 전달과 매우 밀접한 연관이 있음이 다양한 연구들을 통해 규명 되었다 (Reiff et al., 2002; Stewart et al., 1996). 초파리의 CAST orthologue인 Brp (Bruchpilot)는 presynaptic release machinery를 구성하는데 필수적인 역할을 수행한다 (Kittel et al., 2006; Wagh et al., 2006). Brp는 active zone의 형성에 필수적이지 않지만 T-bar의 구성요소로 알려졌다 (Fouquet et al., 2009). 본 학위논문에서는 전자현미경을 이용하여 시냅스 말단의 미세구조를 관찰하여 대표적인 시냅스 전세포의 변수들을 양적 분석하였다 (표 1). 그 결과, 시냅스

뷰톤의 크기, active zone의 수와 길이, 미토콘드리아의 수는 야생형과 *rab8* 돌연변이에서 차이가 없었다. 그러나 특이하게도 *rab8* 돌연변이에서 active zone에 형성되는 T-bar 수가 야생형과 비교하여 증가하였다 (그림 1B). 야생형에서는 대체적으로 active zone에 하나의 T-bar가 형성되는 것이 대부분인 반면, *rab8* 돌연변이에서 active zone에 두 개 이상의 T-bar가 형성되는 비율이 증가하였다. 그 수치를 야생형 대비 백분율로 나타낸 결과, *rab8* 돌연변이는 야생형과 비교하여 active zone에 두 개 이상의 T-bar가 형성되는 비율이 약 100% 증가하였고, T-bar가 형성되지 않은 active zone의 비율은 약 90% 증가하였다 (그림 1C).

### 그림 1. *rab8* 돌연변이 시냅스의 미세구조 분석

(A, B) 야생형 (A)과 *rab8* 돌연변이 (B) 초파리의 3령 유충 6/7번 신경근육 이음부에서 type Ib 시냅스 뷰톤의 형태. 별표는 확장된 시냅스 소낭을 나타냄. m, 미토콘드리아. Scale bar, 200 nm. (C) 야생형과 *rab8* 돌연변이 시냅스 뷰톤에서 확대된 active zone 영역. arrowheads, T-bar. (D) Active zone에 형성되는 T-bar의 수. *rab8* 돌연변이에서 두 개 이상의 T-bar가 형성되는 active zone의 비율은 야생형과 비교하여 증가함 (n=10).



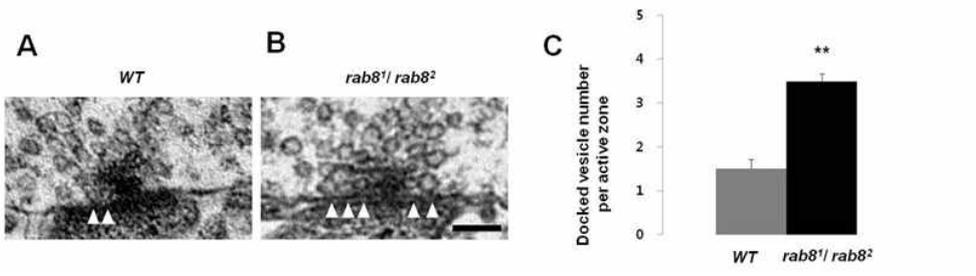
## 2. *rab8* 돌연변이에 의한 시냅스 소낭의 축적

본 연구실의 선행연구결과, *rab8* 돌연변이 신경근육이음부에서 고농도의 포타슘이온을 이용한 자극과 함께 처리한 FM1-43 형광염료의 흡수는 정상적이였다. 그러나 연이은 자극에 의한 형광염료의 재 분비는 비정상적이였다. 이런 결과는 *rab8* 유전자의 기능이 상실됨에 따라 시냅스 소낭의 exocytosis에 결함이 있음을 제시한다. *rab8* 돌연변이에 의해 시냅스 소낭의 분포가 변하는지 확인하기 위하여 전자현미경을 통해 시냅스 소낭의 수를 조사 하였다. 시냅스 뷰톤 전체에 존재하는 시냅스 소낭의 수를 측정하여 면적으로 나눈 결과, *rab8* 돌연변이는 시냅스 소낭의 밀도가 야생형에 비해 통계적으로 증가하였다 (그림 3C). 그리고 시냅스 소낭의 exocytosis에 직접적으로 연관이 있는 active zone 주위영역의 시냅스 소낭을 분석하였다. Active zone 주위에는 시냅스 소낭이 조밀하게 모여 있고, active zone에 근접하거나 맞닿아 있는 시냅스 소낭을 (docked vesicles) 관찰할 수 있다. Docking된 시냅스 소낭은 T-bar가 형성된 active zone 영역에서 세포막과 접촉하고 있거나 세포막으로부터 20 nm 이내에 존재하는 시냅스 소낭만을 포함하여 측정하였다 (Long et al., 2008). 야생형의 active zone에는 docking된 시냅스 소낭이 하나 또는 두 개있지만 (그림 2A, C), *rab8* 돌연변이는 야생형에 비해 더 많은 수의 시냅스 소낭이 docking 돼있는 것이 관찰되었다 (야생형,  $1.5 \pm 0.21$ ; *rab8* 돌연변이,  $3.4 \pm 0.18$ ) (그림 2B, C). 이런 결과는 *rab8* 돌연변이에서 시냅스 소낭의 post-docking 과정이 저해되었음을 보여주는 결과이다. 초과리의 시냅스에서 유전학적 연구를 통해 알려진 것으로 *dunc-13*, *syntaxin*, *rolling black*, *fuseless* 들은 docking된 시냅스 소낭이 증가하는 유사한 표현형질을 보였다 (Aravamudan et al., 1999; Broadie et al., 1995; Huang et

al., 2006; Long et al., 2008). 또한 active zone 주위의 제한영역 (250 nm)에 조밀하게 모여 있는 시냅스 소낭의 밀도를 분석한 결과, *rab8* 돌연변이는 야생형에 비해 통계적으로 증가하였다 (그림 3A, B).이외에도 *rab8* 돌연변이에서는 일반적인 시냅스 소낭 이외에 야생형에서 거의 관찰되지 않는 확장된 크기의 시냅스 소낭 (지름 70 nm 이상)이 관찰되었다 (그림 1B).

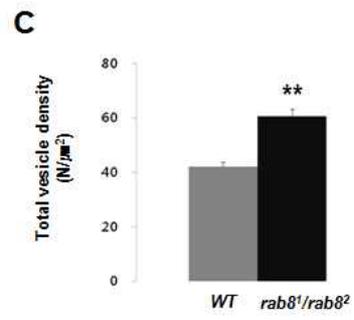
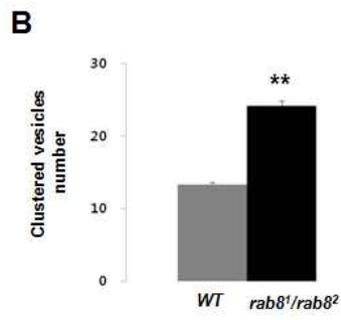
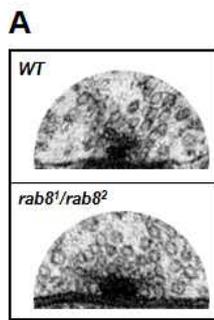
그림 2. *rab8* 돌연변이 시냅스의 active zone에 docking된 시냅스 소낭의 변화

(A, B) 야생형 (A)과 *rab8* 돌연변이 (B)에서 T-bar가 존재하는 active zone에 docking된 시냅스 소낭을 관찰. 화살표, docked synaptic vesicles. Scale bar, 100nm. (C) active zone에 docking된 시냅스 소낭의 수. *rab8* 돌연변이에서 야생형과 비교하여 증가함. 통계적 유의성은 막대그래프의 상단에 표시하였다 (\*\* $p < 0.01$ ).



### 그림 3. *rab8* 돌연변이 시냅스에서 시냅스 소낭의 밀도 증가

Active zone 주위 영역과 시냅스 뷰톤 내에 존재하는 선명한 형태의 일반 시냅스 소낭 (diameter, < 40nm)의 수를 분석. (A) T-bar를 중심으로 시냅스 전 세포막으로부터 반경 250 nm 내 영역. (B) 반경 내에 존재하는 일반 시냅스 소낭의 수. (C) 시냅스 뷰톤 안에 존재하는 전체 일반 시냅스 소낭의 밀도 (면적으로 나누어 밀도를 계산). 야생형에 비해 *rab8* 돌연변이에서 시냅스 소낭의 밀도가 증가함. 통계적 유의성은 막대그래프의 상단에 표시하였다 (\*\* $p < 0.01$ ).



### 3. 시냅스 활성을 유도하는 강한 자극 시, *rab8* 돌연변이에서 endosome과 유사한 구조인 cisternae 수의 증가

시냅스 소낭은 빠르게 반복된 패턴의 순환과정을 거치는데 시냅스 소낭의 exocytosis에 의해 신경전달물질이 분비된 후, 다시 세포내로 endocytosis 된다. 이 과정에서 시냅스 소낭은 endosomal compartment를 거치지 않고 바로 재순환되거나 (Koenig and Lkeda, 1996; Murthy and Stevens, 1998), endosome을 경유하는 중간단계 형태의 cisternae로부터 형성된다 (Heuse and Reese, 1973; Takei et al., 1996; Leenders et al., 2002; de Lange et al., 2003).

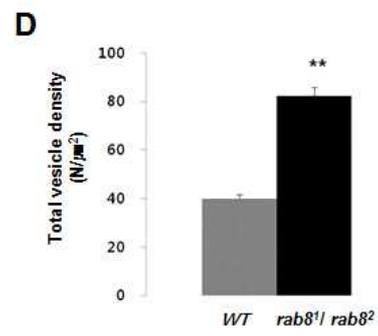
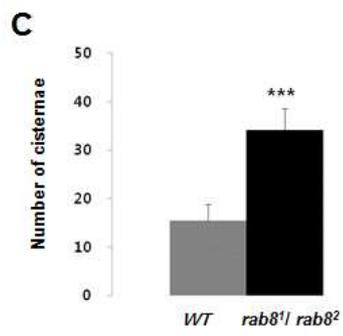
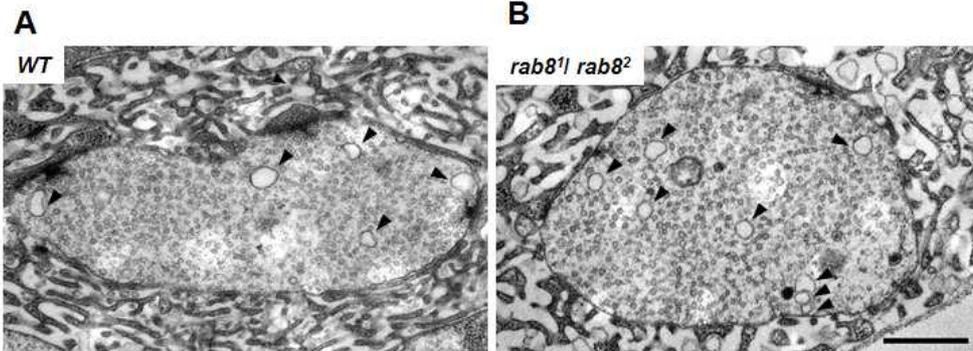
강한 자극동안 시냅스에서는 신경전달물질의 분비를 원활히 유지하기 위해서 시냅스 소낭의 효율적인 재활용이 이루어져야 한다. 시냅스는 고농도의 KCl 용액을 처리하거나 (Marxen et al., 1999; Holt et al., 2003 de Lange et al., 2003; Coggins et al., 2007) 지속적인 전기 자극을 주었을 때 시냅스 소낭의 재순환 과정이 활성화된다고 알려졌다 (Heuser and Reese, 1973; Teng and Wilkinson, 2000). 강한 자극에 의해 활성화된 시냅스는 시냅스 소낭이 벌크 또는 clathrin을 매개로 하는 endocytosis 과정에 의해서 세포막으로부터 재순환 된다 (De and Takei, 1996). 초파리의 신경근육이음부에서 90 mM KCl을 10 분간 처리한 후 전자현미경을 이용해 시냅스 뷰톤의 미세구조를 분석한 결과, endosome과 유사한 구조의 cisternae가 눈에 띄게 증가됨이 보고되었다 (Yulia et al., 2009). Cisternae가 시냅스전 말단의 세포막과 자발적으로 fusion 되면 miniature amplitude 증가되는 반응이 관찰된다고 밝혀진 바 있다 (Koh et al., 2004; Zhang et al., 1998).

*rab8* 돌연변이에서 나타나는 시냅스 소낭의 순환과정 결함과 확장된 크기의 시냅스 소낭 증가된 현상에 관련하여 자세히 조사하기 위하여 90 mM

KCl (10분)을 이용하여 강한 자극으로 시냅스를 활성화시켜 시냅스 소낭의 재순환과정을 관찰하였다. 시냅스 뷰톤의 미세구조의 변화를 분석한 결과, 야생형 (15.4±3.41)에 비해 *rab8* 돌연변이 (34.1±4.46)에서 cisternae의 수가 약 2배 증가하였다 (그림 4C). 그러나 *rab8* 돌연변이에서 bulk endocytosis 과정에서 나타나는 오메가 형태의 세포막 구조는 거의 보이지 않았다. 또한 전체 시냅스 뷰톤 내에 존재하는 작은 시냅스 소낭의 밀도는 야생형(42.4±3.71)에 비해 *rab8* 돌연변이 (81.6±6.54)에서 약 2.5배 증가하였는데, endocytosis의 결함이 있을 때 대표적인 현상인 시냅스 소낭의 감소를 관찰할 수 없었기 때문에 *rab8* 돌연변이는 endocytosis에 의한 문제가 없는 것으로 보인다. 본 연구실의 선행 연구결과, Rab8은 배양세포와 시냅스에서 recycling endosome과 같은 위치에 있음을 Rab4와 Rab11 항체를 이용한 형광 이미지 분석을 통해 확인하였다. 또한 early endosome이나 TGN (trans-Golgi network)과는 다른 위치에 있음을 관찰하였다. 이 결과를 종합해 보면 *rab8* 유전자의 기능이 상실됨에 따라 endosome을 거친 시냅스 소낭 재형성에 결함이 있을 가능성을 예상할 수 있다.

그림 4. *rab8* 돌연변이에서 depolarization을 유도하는 고농도 포타슘 용액을 이용한 자극동안 시냅스 소낭의 변화

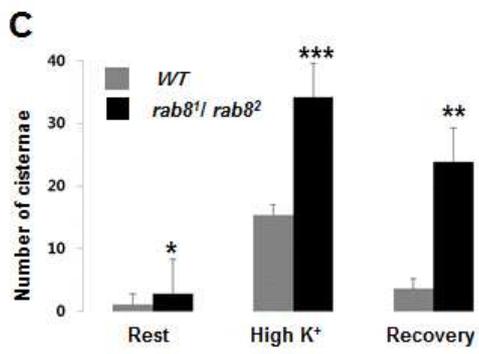
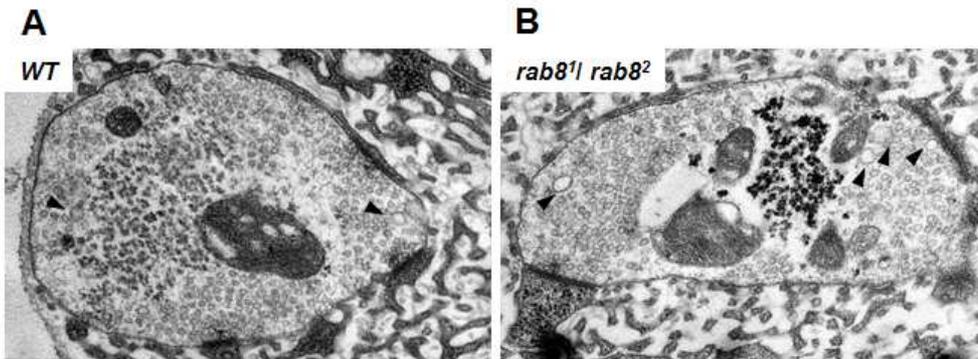
신경에 강한 자극을 주기 위해 고농도 KCl 용액 (90 mM)을 10 분 동안 처리하여 야생형 (A)과 *rab8* 돌연변이 (B)에서 시냅스 뷰톤의 시냅스 소낭의 변화를 관찰. 화살표는 cisternae를 나타냄. Scale bar, 500 nm. (C) endosome과 비슷한 구조의 cisternae (diameter, > 70 nm)의 수 (정상시와 자극시). 야생형에 비해 *rab8* 돌연변이에서 cisternae의 수가 증가 (n=10). (D) 시냅스 뷰톤 안에 존재하는 전체 일반 시냅스 소낭 (diameter, < 40 nm)의 밀도 (정상시와 자극시). 야생형에 비해 *rab8* 돌연변이에서 시냅스 소낭의 밀도가 증가함. 통계적 유의성은 막대그래프의 상단에 표시하였다 (\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.05$ ).



#### 4. *rab8* 돌연변이에서 시냅스 소낭의 재순환 회복 지연

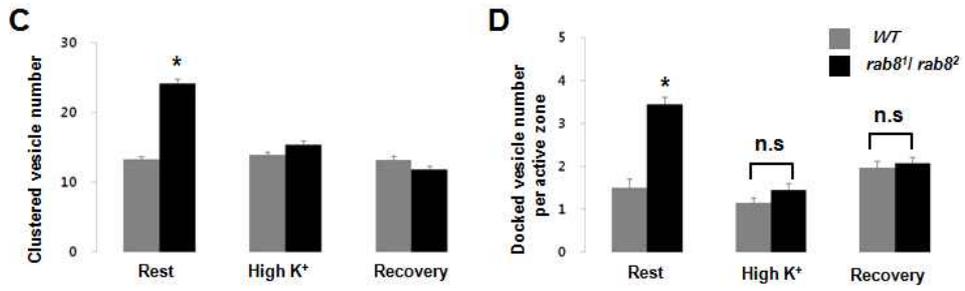
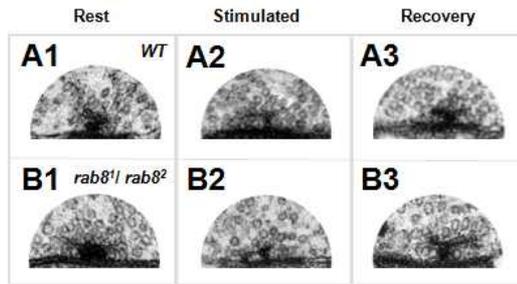
초파리 신경근육이음부에서 고농도의 KCl 용액 처리를 통해 시냅스를 활성화 시킨 후 다시 10 분간 회복시간을 준 뒤 시냅스 뷰톤을 관찰하면 cisternae의 수가 평소 수준으로 감소하게 된다. 이는 강한 자극에 의해 시냅스 말단에서의 endosomal endocytic pathway가 가역적으로 활성화된다고 예상할 수 있다 (Yulia et al., 2009). *rab8* 돌연변이 시냅스에서 endosome을 거친 시냅스 소낭의 재순환과정이 가역적으로 일어나는지를 회복실험을 통해 확인하였다. 고농도 포타슘 이온 자극 후, 정상시와 같은 농도의 saline (5 mM KCl)으로 10 분 동안 회복시간을 준 뒤 *rab8* 돌연변이의 시냅스 뷰톤에서 시냅스 소낭의 재순환이 정상적인지 분석하였다. 그 결과, 야생형에서 cisternae의 수는 정상시의 약 47% 수준으로 회복된 반면, *rab8* 돌연변이는 약 14% 수준 밖에 회복하지 못했다 (그림 5C). 자극조건과 회복조건에서 active zone에 clustering된 시냅스 소낭과 docking된 시냅스 소낭의 수는 야생형과 *rab8* 돌연변이에서 차이가 없었다 (그림 6). 이는 Rab8이 시냅스 소낭의 exocytosis에 필수적인 역할을 하지는 않은 것으로 예상할 수 있다.

**그림 5. 강한 자극이후 회복시간을 준 뒤, 시냅스 뷰튼의 cisternae수 변화**  
강한 자극이후 평소수준의 KCl 용액 농도 (5 mM)을 10분간 유지한 후, 야생형 (A)과 *rab8* 돌연변이 (B)에서 cisternae수를 분석. 화살표는 cisternae를 나타냄 (diameter, > 70nm). (C) endosome과 비슷한 구조의 cisternae (diameter, > 70 nm)의 수 (평상시, 자극시, 회복시). 야생형에서 cisternae 수는 평상시와 유사한 수준으로 감소되었지만, *rab8* 돌연변이에서 그 수가 평소수준으로 현저하게 떨어지지 않음 (n=5). 통계적 유의성은 막대그래프의 상단에 표시하였다 (\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.05$ ).



**그림 6. *rab8* 돌연변이 시냅스의 active zone 영역에서 시냅스 소낭의 재순환 회복을 비교**

시냅스 뷰톤의 active zone 영역에 존재하는 시냅스 소낭을 분석. Active zone 주위영역에 존재하는 (A) 야생형과 (B) *rab8* 돌연변이의 시냅스 소낭을 관찰 (1, 평상시; 2, 자극시; 3, 회복시) (C) Active zone 세포막에 docking된 시냅스 소낭을 분석. (D) T-bar를 중심으로 세포막으로부터 250nm 반경이내의 시냅스 소낭을 분석. 두 변수 모두 평상시 조건에서 *rab8* 돌연변이에서 시냅스 소낭의 수가 증가함. 통계적 유의성은 막대그래프의 상단에 표시하였다 (\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.05$ , n.s는 통계적 유의성 없음 ).



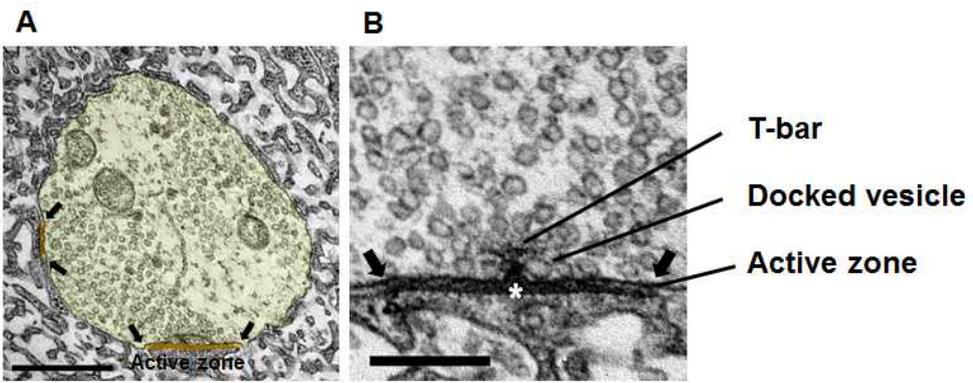
**표 1. Type Ib 시냅스 뷰튼 구조의 양적 분석**

야생형과 *rab8* 돌연변이의 type Ib 시냅스 뷰튼에서 다음과 같은 시냅스전 말단의 대표적인 변수를 측정. 수치는 mean  $\pm$  SEM을 나타냄.

Parameter	<i>WT</i> (n=10)	<i>rab8<sup>1</sup>/rab8<sup>2</sup></i> (n=10)
Bouton area	2.41±0.27	2.68±0.22
No. of active zones / cross section	2.6±0.4	2.7±0.21
Total length (μm) of active zones / cross section	0.73±0.1	0.9±0.12
No. of active zones/ bouton area (μm <sup>2</sup> )	1.18±0.24	1.03±0.06
Total length (μm) of active zones per bouton perimeter (μm)	0.12±0.02	0.14±0.02
Total length (μm) of active zones per bouton area(μm <sup>2</sup> )	0.33±0.06	0.35±0.05
Number of T bars per bouton area (μm <sup>2</sup> )	0.33±0.12	0.53±0.11
Number of mitochondria per bouton area (μm <sup>2</sup> )	1.31±0.18	1.63±0.32
Number of vesicles per bouton area (μm <sup>2</sup> )	42.15±1.52	60.54±2.64

**보충그림 1. 대표적인 Type Ib 시냅스 뷰톤 그림**

(A) 시냅스 뷰톤의 크기는 노란색으로 색칠한 영역이고, 화살표 사이의 길이는 active zone의 길이(주황색)를 나타낸다. Scale bar, 500 nm. (B) T-bar는 별표 위에 위치해 있다. Docked vesicles은 active zone에 접촉한 T-bar 근처의 시냅스 소낭이다. Scale bar, 200 nm.



## 4. 고 찰

세포내 수송과정에서 Rab GTPase가 중요한 역할을 한다는 연구가 잘 정립되어져 있으며 (Zerial and McBride, 2001), Rab3, Rab5와 Rab27은 시냅스 소낭의 순환에 관여한다는 것이 알려져 있다 (Mahoney et al., 2006; Schluter et al., 2006; Wucherpfenning et al., 2003). Rab 단백질은 다른 GTPase와 마찬가지로 GDP가 결합된 비활성 형태와 GTP가 결합된 비활성 형태의 순환과정에서 Rab의 종류에 따라 특이적으로 작용하는 GEF와 GAP에 의해 활성이 조절된다. 각각의 수송과정에서 활성화된 Rab 단백질은 효과기 (effector)로 작용하는 단백질들과 결합하여 소낭의 수송과정에서 GTPase의 하위신호를 전달한다. Rab3 interacting molecule (RIM)은 Rab3의 효과기 단백질로 알려져 있으며, 초파리 유충에서 신경근육이음부 말단의 active zone에 위치하여 칼슘채널의 clustering을 조절하는 것으로 밝혀졌다. yeast에서 exocyst 복합체는 6개의 sec 단백질과 (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15) 2개의 exocytic 단백질 (Exo70, Exo84) 소단위체로 구성된 것으로 알려졌고, exocytosis에 관여한다는 보고가 있다 (Hsu et al., 1996, Kee et al., 1997, Lloyd et al., 2000, Matern et al., 2001, TerBush et al., 1996 and Ting et al., 1995). 본 연구실의 선행연구결과 Sec15는 Rab8과 배양세포에서 같은 위치에 존재하고, Sec15이 신경세포 특이적으로 knock-down되었을 때 Rab8의 표현형질과 마찬가지로 유충 신경근육이음부에서 FasII의 레벨 감소와 시냅스의 과성장을 보였다.

시냅스의 활성이 시냅스 말단의 구조와 기능에 연관이 있다는 연구결과가 있는데, 예를 들어 과 흥분성 돌연변이인 *eag*, *sh* 에서 시냅스 뷰톤의

극적인 미세구조 변화가 나타났다. 이는 신경흥분전달의 증가가 시냅스 말단의 구조에 영향을 미친다는 결과이다 (Jia et al., 1993). *rab8* 돌연변이에서 구조적으로 시냅스전 세포 말단에 docking된 시냅스 소낭의 수가 야생형에 비해 증가하였다 (그림 2). 그러므로 시냅스 소포의 fusion이 감소함에 따라 신경전달물질의 분비가 줄어들 것이라고 예상된다. 이를 확인하기 위해 생리학적으로 근육세포에서 전기적 신호의 변화를 측정하였다. 본 연구실에서 *rab8* 돌연변이 유충의 6번 근육에서 세포내 two electrode voltage clamp (TEVC)를 수행한 결과, 자극 없이 자발적으로 일어나는 miniature excitatory junctional currents (mEJCs)의 진폭과 빈도는 야생형과 *rab8* 돌연변이에서 통계적 차이가 없었다. 그러나 전기적 자극을 (0.2 Hz) 주었을 때 발생하는 evoked EJC 진폭은 야생형에 비하여 *rab8* 돌연변이에서 약 33%가 감소하였으며, quantal content도 역시 27% 감소하였다. 또한 paired pulse ratio (PPR)가 *rab8* 돌연변이에서 야생형과 비교하여 증가하였다 (10 ms, 33%; 25 ms, 32%; 50 ms, 30%; 100 ms, 25%). 이는 *rab8* 돌연변이에서 release probability가 감소했음을 뜻한다. 이는 동일한 전기적 자극에 의해 분비되는 시냅스 소포의 수가 감소됨을 의미하는데, 구조적으로 *rab8* 돌연변이의 시냅스 말단에서 시냅스 소낭의 fusion이 제대로 이루어지지 않아서 기능적으로 신경전달물질의 분비가 정상적이지 않다는 것을 제안할 수 있다.

신경전달 물질이 분비가 일어나는 active zone을 표지하는 항체인 NC82의 밀도와 분포는 야생형과 비교하여 *rab8* 돌연변이에서 변화가 없었지만, 미세구조상에서는 두 개 이상의 T-bar가 존재하는 active zone의 비율이 야생형에 비해 증가하였다 (그림 1). 그리고 선행연구에 의하면 *rab8* 돌연변이 시냅스 말단에서 신경세포부착단백질(NCAM)인 FasII 양은 야생형에 비해 감소하였다. 이들 결과는 Rab8 단백질이 active zone을 구성하는 단백질들

과 active zone 주변의 세포부착단백질의 수송과정에 기능을 하며, 이를 통해 시냅스의 구조유지에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

화학적 시냅스는 중추신경계의 세포내 정보신호전달이 일어나는 곳으로서 뇌 기능의 중심적인 역할을 한다. 시냅스 소포의 순환은 정교하게 시스템화 되어져 있는데 시냅스전 말단에서는 칼슘 이온의 유입으로 신경전달 물질을 포함한 시냅스 소낭이 이동하여 active zone에서 분비 되어진 후에 시냅스 소낭의 재순환과정을 거쳐 시냅스 소포가 다시 형성되어진다. 신경 자극에 따른 시냅스 소포의 재사용 순환과정은 여러 경로가 있다고 알려져 있는데 강한 신경 자극 시 endosome을 경유하는 (fusion과 budding) 시냅스 소낭의 재사용 메커니즘이 활성화된다는 보고가 있다 (Akbergenova et al., 2009). 고농도 KCl 용액과 FM 1-43 형광염료를 함께 처리한 후 photoconversion을 이용한 미세구조 분석을 통해 endosome을 경유하는 시냅스 소낭의 재사용 기전이 보다 자세히 밝혀졌다. 그 결과 형광염료를 받아들인 cisternae는 시냅스전 말단 세포막 근처에 위치하면서 완전하고 고르게 염색된 경우도 존재하지만, 부분 염색된 cisternae도 존재하였다. 또한 고르게 염색된 시냅스 소낭과 염색되지 않거나 부분 염색된 cisternae의 fusion도 관찰 할 수 있었다. 이에 따라 강한 자극 시에 급격히 증가하는 cisternae는 bulk endocytosis에 의한 순환과정과 endosome을 거친 시냅스 소낭의 재순환과정에 의해 발생했다고 주장하고 있다 (Yulia et al., 2009). Cisternae가 증가되거나 시냅스 소포의 크기가 커지는 표현형질은 endocytosis에 결함이 있는 돌연변이에서 주로 나타나는데, *AP180/lap*, *dap160*, *eps15*, *tweek*, 과 *flower* 돌연변이에서 관찰되었다. (Koh et al., 2004, 2007; Verstreken et al, 2009; Zhang et al., 2008). 본 학위논문의 연구결과들은 전자현미경을 이용한 시냅스 미세 구조 분석 연구를 통해 Rab8 단백질이 시냅스 말단에서 endosome을 경유하는 시냅스 소낭의 재순환과정

에서 중요한 역할을 함을 제시할 수 있다.

## 5. 참고 문헌

Akbergenova Y, Bykhovskaia M. (2009) Enhancement of the endosomal endocytic pathway increases quantal size. *Mol Cell Neurosci.*;40(2):199-206

Akbergenova Y, Bykhovskaia M. (2009) Stimulation-induced formation of the reserve pool of vesicles in *Drosophila* motor boutons. *J Neurophysiol.* 101(5):2423-33

Akbergenova Y, Bykhovskaia M. (2010) Synapsin regulates vesicle organization and activity-dependent recycling at *Drosophila* motor boutons. *Neuroscience.* 13;170(2):441-52

Alabi AA, Tsien RW. (2012) Synaptic vesicle pools and dynamics. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1;4(8):a013680.

Aravamudan B, Fergestad T, Davis WS, Rodesch CK, Broadie K. (1999) *Drosophila* UNC-13 is essential for synaptic transmission. *Nat Neurosci.* ;2(11):965-71.

B. Katz, *The Release of Neural Transmitter Substances*, Liverpool University Press, (1969)

Broadie K, Prokop A, Bellen HJ, O'Kane CJ, Schulze KL, Sweeney ST (1995) Syntaxin and Synaptobrevin Function Downstream of Vesicle Docking in *Drosophila*. *Neuron.*15(3):663-73

Broadie KS, Richmond JE. (2002) Establishing and sculpting the synapse in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol.* (5):491-8.

Bruckner JJ, Gratz SJ, Slind JK, Geske RR, Cummings AM, Galindo SE, Donohue LK, O'Connor-Giles KM. (2012) Fife, a *Drosophila* Piccolo-RIM homolog, promotes active zone organization and neurotransmitter release. *J Neurosci.* 28;32(48):17048-58.

Budnik V, Koh YH, Guan B, Hartmann B, Hough C, Woods D, Gorczyca M. (1996) Regulation of synapse structure and function by the *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg*. *Neuron.* 17(4):627-40.

Chan CC, Scoggin S, Wang D, Cherry S, Dembo T, Greenberg B, Jin EJ, Kuey C, Lopez A, Mehta SQ, Perkins TJ, Brankatschk M, Rothenfluh A, Buszczak M, Hiesinger PR. (2011) Systematic discovery of Rab GTPases with synaptic functions in *Drosophila*. *Curr Biol.* 25;21(20):1704-15

Chen YA, Scheller RH. (2001) SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.*;2(2):98-106.

Denker A, Kröhnert K, Rizzoli SO. (2009) Revisiting synaptic vesicle pool localization in the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Physiol.* 15;587 (Pt 12):2919-26

Featherstone DE, Broadie K. (2000) Surprises from *Drosophila*: genetic mechanisms of synaptic development and plasticity. *Brain Res Bull.* 15;53(5):501-11.

Fergestad T, Davis WS, Broadie K. (1999) The stoned proteins regulate synaptic vesicle recycling in the presynaptic terminal. *J Neurosci.* 15;19(14):5847-60.

Graf ER, Daniels RW, Burgess RW, Schwarz TL, DiAntonio A. (2009) Rab3 dynamically controls protein composition at active zones. *Neuron*.10;64(5):663-77

Graf ER, Valakh V, Wright CM, Wu C, Liu Z, Zhang YQ, DiAntonio A. (2012) RIM promotes calcium channel accumulation at active zones of the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurosci*. 21;32(47):16586-96

Grigoriev I, Yu KL, Martinez-Sanchez E, Serra-Marques A, Smal I, Meijering E, Demmers J, Peränen J, Pasterkamp RJ, van der Sluijs P, Hoogenraad CC, Akhmanova A. (2011) Rab6, Rab8, and MICAL3 cooperate in controlling docking and fusion of exocytotic carriers. *Curr Biol*. 2011 Jun 7;21(11):967-74

Guan B, Hartmann B, Kho YH, Gorczyca M, Budnik V. (1996) The *Drosophila* tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse. *Curr Biol*. 1;6(6):695-706.

Gundelfinger ED, Kessels MM, Qualmann B. (2003) Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*. ;4(2):127-39.

Hammarlund M, Palfreyman MT, Watanabe S, Olsen S, Jorgensen EM. (2007)

Harris KP, Littleton JT. (2011) Vesicle trafficking: a Rab family profile. *Curr Biol*. 25;21(20):R841-3

Hoopmann P, Rizzoli SO, Betz WJ. (2012) FM dye photoconversion for visualizing synaptic vesicles by electron microscopy. *Cold Spring Harb*

Protoc. 1;2012(1):84-6

Hoopmann P, Rizzoli SO, Betz WJ. (2012) Imaging synaptic vesicle recycling by staining and destaining vesicles with FM dyes. Cold Spring Harb Protoc. 1;2012(1):77-83

Huang FD, Woodruff E, Mohrmann R, Broadie K. (2006) Rolling blackout is required for synaptic vesicle exocytosis. J Neurosci. 1;26(9):2369-79.

Jahn R, Südhof TC. (1999) Membrane fusion and exocytosis. Annu Rev Biochem. 68:863-911.

Jan LY, Jan YN. L-glutamate as an excitatory transmitter at the Drosophila larval neuromuscular junction. J Physiol. Oct;262(1):215-36.

Jia XX, Gorczyca M, Budnik V. (1993) Ultrastructure of neuromuscular junctions in Drosophila: comparison of wild type and mutants with increased excitability. J Neurobiol. ;24(8):1025-44.

Jordens I, Marsman M, Kuijl C, Neefjes J. (2005) Rab proteins, connecting transport and vesicle fusion. Traffic.;6(12):1070-7. Review

Kawasaki F, Mattiuz AM, Ordway RW.(1998) Synaptic physiology and ultrastructure in comatose mutants define an in vivo role for NSF in neurotransmitter release. J Neurosci. 15;18(24):10241-9.

Keshishian H, Broadie K, Chiba A, Bate M. (1996) The drosophila neuromuscular junction: a model system for studying synaptic development and function. Annu Rev Neurosci. 19:545-75.

Khodosh R, Augsburger A, Schwarz TL, Garrity PA. (2006) Bchs, a BEACH domain protein, antagonizes Rab11 in synapse morphogenesis and other developmental events. *Development*. 133(23):4655-65. Epub 2006 Nov 1.

Koh YH, Gramates LS, Budnik V. (2000) *Drosophila* larval neuromuscular junction: molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microsc Res Tech*. 1;49(1):14-25.

Koh TW, Verstreken P, Bellen HJ (2004) Dap160/intersectin acts as a stabilizing scaffold required for synaptic development and vesicle endocytosis. *Neuron* 43: 193 - 205.

Koh TW, Korolchuk VI, Wairkar YP, Jiao W, Evergren E, et al. (2007) Eps15 and Dap160 control synaptic vesicle membrane retrieval and synapse development. *J Cell Biol* 178: 309 - 322.

Kuromi H, Kidokoro Y. (2005) Exocytosis and endocytosis of synaptic vesicles and functional roles of vesicle pools: lessons from the *Drosophila* neuromuscular junction. *Neuroscientist*. ;11(2):138-47.

Kuromi H, Kidokoro Y. (2002) Selective replenishment of two vesicle pools depends on the source of Ca<sup>2+</sup> at the *Drosophila* synapse. *Neuron*. ;35(2):333-43.

Kuromi H, Kidokoro Y. (2003) Two synaptic vesicle pools, vesicle recruitment and replenishment of pools at the *Drosophila* neuromuscular junction. *J Neurocytol*. ;32(5-8):551-65.

Lahey T, Gorczyca M, Jia XX, Budnik V. (1994) The *Drosophila* tumor suppressor gene *dlg* is required for normal synaptic bouton structure. *Neuron*. 13(4):823-35.

Lee J, Guan Z, Akbergenova Y, Littleton JT. (2013) Genetic analysis of synaptotagmin C2 domain specificity in regulating spontaneous and evoked neurotransmitter release. *J Neurosci.* 2;33(1):187-200

Leenders AG, Scholten G, de Lange RP, Lopes da Silva FH, Ghijsen WE. (2002) Sequential changes in synaptic vesicle pools and endosome-like organelles during depolarization near the active zone of central nerve terminals. *Neuroscience.* 109(1):195-206

Lin RC, Scheller RH. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* ;16:19-49.

Long AA, Mahapatra CT, Woodruff EA 3rd, Rohrbough J, Leung HT, Shino S, An L, Doerge RW, Metzstein MM, Pak WL, Brodie K. (2010) The nonsense-mediated decay pathway maintains synapse architecture and synaptic vesicle cycle efficacy. *J Cell Sci.* 1;123(Pt 19):3303-15

Long AA, Kim E, Leung HT, Woodruff E 3rd, An L, Doerge RW, Pak WL, Brodie K. (2008) Presynaptic calcium channel localization and calcium-dependent synaptic vesicle exocytosis regulated by the Fuseless protein. *J Neurosci.* 28(14):3668-82.

Mahoney TR, Liu Q, Itoh T, Luo S, Hadwiger G, Vincent R, Wang ZW, Fukuda M, Nonet ML. (2006) Regulation of synaptic transmission by RAB-3 and RAB-27 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell.* 17(6):2617-25. Epub 2006 Mar 29.

Marino Zerial and Heidi McBride (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol.*Feb;2(2):107-17

Müller M, Pym EC, Tong A, Davis GW. (2011) Rab3-GAP controls the progression of synaptic homeostasis at a late stage of vesicle release. *Neuron.* ;69(4):749-62.

Novick P, Zerial M (1997) The diversity of Rab proteins in vesicle transport. *Curr Opin Cell Biol.* 1997 Aug;9(4):496-504

Pavlos NJ, Jahn R. (2011) Distinct yet overlapping roles of Rab GTPases on synaptic vesicles. *Small GTPases.*;2(2):77-81.

Peränen J.(2011) Rab8 GTPase as a regulator of cell shape. *Cytoskeleton (Hoboken).*;68(10):527-39

Pelissier A, Chauvin JP, Lecuit T. (2003) Trafficking through Rab11 endosomes is required for cellularization during *Drosophila* embryogenesis. *Curr Biol.* ;13(21):1848-57.

Pevsner J, Hsu SC, Scheller RH (1994) n-Sec1: a neural-specific syntaxin-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;91(4):1445-9.

Poskanzer KE, Fetter RD, Davis GW. (2006) Discrete residues in the c(2)b domain of synaptotagmin I independently specify endocytic rate and synaptic vesicle size. *Neuron.* 6;50(1):49-62.

Prokop A. (2006) Organization of the efferent system and structure of neuromuscular junctions in *Drosophila*. *Int Rev Neurobiol.* ;75:71-90.

Ramaswami M, Krishnan KS, Kelly RB. (1994) Intermediates in synaptic vesicle recycling revealed by optical imaging of *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron.* ;13(2):363-75.

Renden R, Berwin B, Davis W, Ann K, Chin CT, Kreber R, Ganetzky B, Martin TF, Broadie K.(2001) *Drosophila* CAPS is an essential gene that regulates dense-core vesicle release and synaptic vesicle fusion. *Neuron.*

31:421-437.

Reiff DF, Thiel PR, Schuster CM.(2002) Differential regulation of active zone density during long-term strengthening of *Drosophila* neuromuscular junctions. *J Neurosci.* 22(21):9399-409.

Reist NE, Buchanan J, Li J, DiAntonio A, Buxton EM, Schwarz TL. (1998) Morphologically docked synaptic vesicles are reduced in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *J Neurosci.*1;18(19):7662-73.

Richmond JE, Brodie KS. (2002) The synaptic vesicle cycle: exocytosis and endocytosis in *Drosophila* and *C. elegans*. *Curr Opin Neurobiol.* 12(5):499-507.

Rizzoli SO, Betz WJ. (2005) Synaptic vesicle pools. *Nat Rev Neurosci.* 6(1):57-69.

Roche JP, Packard MC, Moeckel-Cole S, Budnik V. (2002) Regulation of synaptic plasticity and synaptic vesicle dynamics by the PDZ protein Scribble. *J Neurosci.*22(15):6471-9.

Rothman, J.E. 1994. Intracellular membrane fusion. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 29:81 - .96.

Söllner T, Bennett MK, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE.(1993) A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell.* 5;75(3):409-18.

Stenmark H. (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat*

Rev Mol Cell Biol.10(8):513-25

Stevens RJ, Akbergenova Y, Jorquera RA, Littleton JT. (2012) Abnormal synaptic vesicle biogenesis in *Drosophila* synaptogyrin mutants. *J Neurosci.* 32(50):18054-67

Stewart BA, Schuster CM, Goodman CS, Atwood HL.(1996) Homeostasis of synaptic transmission in *Drosophila* with genetically altered nerve terminal morphology. *J Neurosci.* 16(12):3877-86.

Sudhof TC. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci.* 09-47.

Sutton, R.B., D. Fasshauer, R. Jahn, and A.T. Brunger. 1998. Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature.* 395:347 - 353.

Tao-Cheng JH. (2006) Activity-related redistribution of presynaptic proteins at the active zone. *Neuroscience.*141(3):1217-24

Tsurudome K, Tsang K, Liao EH, Ball R, Penney J, Yang JS, Elazzouzi F, He T, Chishti A, Lnenicka G, Lai EC, Haghghi AP. (2010) The *Drosophila* miR-310 cluster negatively regulates synaptic strength at the neuromuscular junction. *Neuron.* 68(5):879-93.

Uytterhoeven V, Kuenen S, Kasprowicz J, Miskiewicz K, Verstreken P. (2011) Loss of skywalker reveals synaptic endosomes as sorting stations for synaptic vesicle proteins. *Cell.* 145(1):117-32

Vijayakrishnan N, Woodruff EA 3rd, Brodie K. (2009) Rolling blackout is required for bulk endocytosis in non-neuronal cells and neuronal

synapses. *J Cell Sci.* ;122(Pt 1):114-25

Verstreken P, Ohyama T, Haueter C, Habets RL, Lin YQ, et al. (2009) Tweek, an evolutionarily conserved protein, is required for synaptic vesicle recycling. *Neuron* 63: 203 - 215.

Weimer RM, Richmond JE. (2005) Synaptic vesicle docking: a putative role for the Munc18/Sec1 protein family. *Curr Top Dev Biol.* ;65:83-113.

Weber, T., B.V. Zemelman, J.A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell.* 92:759 - 772.

Wu MN, Littleton JT, Bhat MA, Prokop A, Bellen HJ. (1998) ROP, the *Drosophila* Sec1 homolog, interacts with syntaxin and regulates neurotransmitter release in a dosage-dependent manner. *EMBO J.* ;17(1):127-39.

Wu S, Mehta SQ, Pichaud F, Bellen HJ, Quioco FA. (2005) Sec15 interacts with Rab11 via a novel domain and affects Rab11 localization in vivo. *Nat Struct Mol Biol.* 12(10):879-85.

Wucherpennig T, Wilsch-Bräuninger M, González-Gaitán M. (2003) Role of *Drosophila* Rab5 during endosomal trafficking at the synapse and evoked neurotransmitter release. *J Cell Biol.*;161(3):609-24.

Yao CK, Lin YQ, Ly CV, Ohyama T, Haueter CM, et al. (2009) A synaptic vesicle-associated Ca<sup>2+</sup> channel promotes endocytosis and couples exocytosis to endocytosis. *Cell* 138: 947 - 960.

Zhai RG, Bellen HJ. (2004) The architecture of the active zone in the

presynaptic nerve terminal. *Physiology (Bethesda)*, 19:262–70.

Zhang, J., Schulze, K.L., Hiesinger, P.R., Suyama, K., Wang, S., Fish, M., Acar, M., Hoskins, R.A., Bellen, H.J., and Scott, M.P. (2007) Thirty-one flavors of *Drosophila* rab proteins. *Genetics* 176, 1307–1322.

Zhang B, Koh YH, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, et al. (1998) Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* 21: 1465 - 1475

Zito K, Parnas D, Fetter RD, Isacoff EY, Goodman CS. (1999) Watching a synapse grow: noninvasive confocal imaging of synaptic growth in *Drosophila*. *Neuron*. ;22(4):719–29.

## Abstract

# Ultrastructural analysis of *rab8* mutant synapses

Kim, Haeran

Interdisciplinary Program in Neuroscience

Graduate School

Seoul National University

Rab proteins are key regulators of intracellular membrane trafficking that cycle between an active, GTP-bound state and an inactive, GDP-bound state. Rab8 is known to play a pivotal role in membrane trafficking from endosomal compartments to the plasma membrane, but their function in synapses, where neurotransmitters are released by synaptic vesicle docking and fusion, has not yet been studied. Through FM1-43 release experiments, our laboratory has previously shown that loss of Rab8 function results in defects in synaptic vesicle exocytosis at the

*Drosophila* larval neuromuscular junction (NMJ). The main purpose of this research is to examine the ultrastructure of *rab8* mutant synapses. Electron microscopy of larval *rab8* mutant boutons reveals an increase in the density of synaptic vesicles and the number of docked vesicles per active zone. In contrast, the entire morphology of boutons and the formation of endosomal cisternae following treatment of 90 mM KCl are normal in *rab8* mutant boutons. These results, combined with the FM1-43 release defect shown in *rab8*, suggest that Rab8 is required for synaptic vesicle exocytosis at the larval NMJ.

**Keywords:** Rab8, Neuromuscular junction, Synaptic vesicles, Exocytosis

**Student Number:** 2011-23289