

이학석사학위논문

CaMKII 활성화에 따른 AMPA 수용체의
어셈블리 모델 및 시냅스 가소성

Assembly Model of AMPA Receptors Dependent
on CaMKII Activity and Synaptic Plasticity

2004년 2월

서울대학교 대학원
협동과정 뇌과학전공
정 호 진

CaMKII 활성화에 따른 AMPA 수용체의
어셈블리 모델 및 시냅스 가소성

Assembly Model of AMPA Receptors Dependent
on CaMKII Activity and Synaptic Plasticity

지도교수 장 병 탁

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2003년 12월

서울대학교 대학원

협동과정 뇌과학전공

정 호 진

정호진의 이학석사 학위논문을 인준함

2003년 12월

심사위원장 류 판 동 인

부위원장 장 병 탁 인

심사위원 강 봉 균 인

초 록

시냅스전 말단을 통해 시냅스후로 전달되는 임펄스는 칼슘이온을 통해 시냅스후 막 안으로 전달된다. 수상돌기가시 내부로 유입된 칼슘이온은 다양한 생화학적 신호전달기전 과정을 거쳐 AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) 수용체의 어셈블리를 촉진한다. AMPA 수용체의 어셈블리는 AMPA 수용체 채널의 기능을 향상시키는 결과를 유도하여 LTP를 생성한다. AMPA 수용체 어셈블리 모델은 궁극적으로 시냅스 전도 효율을 최대화시키는 방향으로 시냅스의 활성을 도모하는 시냅스 가소성을 나타낸다.

해마 CA1-CA3의 흥분성 글루타메이트 시냅스에서 AMPA 수용체의 어셈블리는 다양한 효소와 기질 반응 기작에 의해 이루어진다. 우선 시냅스전에서 전달된 자극이 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 채널을 통해 주어지면 수상돌기가시 내부로 급격한 양의 칼슘이온 유입이 일어난다. 칼슘이온의 급격한 유입은 수상돌기 내의 생화학적 신호전달 반응을 초기화하며, AMPA 수용체의 활성을 촉진하는 매개이다. 칼슘이온의 유입과 동시에 다양한 반응이 발생한다. 그 중에서 AMPA 수용체 활성화는 CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) Thr286의 자동인산화 작용에 의해 주로 이루어진다. CaMKII에 의한 AMPA 수용체의 인산화 과정은 궁극적으로 시냅스 활성을 촉진하며, LTP를 유발한다.

본 논문에서는 AMPA 수용체 어셈블리 모델을 이용하여 칼슘에 의한 생화학적 신호전달과정과 전기생리학적 자극-반응 간의 연계를 형성하고자 한다. 시냅스전을 통해 전달되는 신호는 수상돌기가시 내의 생화학적 반응 과정으로 전환된다. 이는 궁극적으로 AMPA 수용체 어셈블리 모델을 통해 LTP 현상을 재현할 수 있다. AMPA 수용체 어셈블리 모델을 제시하기 위해서 시냅스전을 통해 전달되는 전기적 신호를 NMDA 채널을 거쳐 수상돌기가시 내로 유입되는 칼슘이온 농도를 식으로 변환하였다. 칼슘이온 농도 증가는 시냅스후의 생화학적 반응을 유발하는 매개로 작용한다. 따라서 칼슘이온에 따른 각각의 신호전달 반응 과정들을 Michaelis-Menten 반응식에 의해 미분방정식으로 정리하였다. 각

반응에 관여하는 물질들은 AMPA 수용체의 활성화 정도를 조절하는 역할을 한다. 결국 시냅스전을 통해 전달된 전기적 신호는 시냅스후의 수상돌기 내 생화학적 신호전달 기작들을 거쳐 AMPA 수용체 활성을 도모한다. 이러한 일련의 과정은 AMPA 수용체의 전류량 변화로 귀결되어 시냅스 활성을 조절하게 된다.

본 모델을 이용해서 어셈블리 반응에 관여하는 기질과 효소 간의 활성 정도를 알아볼 수 있다. 칼슘-칼모듈린 결합체의 활성반응과 CaMKII의 연관성을 알아본 결과 CaMKII의 Thr286 부분 자동인산화는 칼슘-칼모듈린 결합체의 반응과는 독립적으로 발생한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 CaMKII의 비정상적인 자동인산화 기작이 AMPA 수용체 활성화에 미치는 영향을 확인함으로써 CaMKII이 AMPA 수용체 활성과 LTP 생성에 필수적으로 작용한다는 점을 살펴볼 수 있었다.

주제어: AMPA 수용체 어셈블리 모델, AMPA 수용체, 시냅스 가소성, LTP, CaMKII

학번: 2002-20623

목 차

I. 서론	1
1.1 연구 배경	1
1.2 연구 내용	2
II. 시냅스 가소성	6
2.1 시냅스 가소성의 개념	6
2.2 NMDA 수용체에 의한 LTP 유도	7
1) LTP 유도와 시냅스 수용체	7
2) LTP와 칼슘의 신호전달기작	9
3) LTP와 AMPA 수용체	12
III. AMPA 수용체 어셈블리 모델	14
3.1 칼슘 신호전달 반응 과정 및 반응식	14
3.2 흥분성 시냅스후 전류	19
1) 수용체 전류 및 칼슘 농도	19
2) 이온채널과 시냅스전 신호	21
3.3 AMPA 수용체 활성화	23
IV. 실험 및 결과	26
4.1 LTP 생성 조건	26
1) LTP 유도	27
2) 시냅스전 자극	27
4.2 Ca ²⁺ /CaMKII의 역할 확인	28
1) 칼슘-칼모듈린과 CaMKII의 활성화	28
2) AMPA 수용체의 활성화	29
3) CaMKII 및 AMPA 수용체의 기능장애	31
(1) CaMKII Thr286 돌연변이	31
(2) CaMKII의 기능장애로 인한 AMPA 수용체의 활성억제	32

4.3 LTP와 CaMKII 및 AMPA 수용체의 역할	33
V. 결론	37
참고문헌	40

그림 · 표 목차

그림 2.1: NMDA 수용체에 의한 LTP 유도 모델	8
그림 2.2: CaMKII의 활성화 과정	10
그림 2.3: 칼슘의 신호전달 모델	11
그림 2.4: NMDA 수용체에 의한 LTP 유도동안 발생하는 시냅스후에서의 AMPA 수용체의 변화	13
그림 3.1: 칼슘 신호전달 반응 경로 및 AMPA 수용체 활성화 경로 모델 ...	16
그림 4.1: 시냅스전의 신경전달물질의 방출 확산 모식도	28
그림 4.2: 시간에 따른 자극입력 신호	28
그림 4.3: 칼슘이온과 CaMKII의 활성화정도	29
그림 4.4: AMPA 수용체의 활성화정도 과정	30
그림 4.5: 자동인산화 단계의 CaMKII와 AMPA 수용체의 활성화정도 비교 ...	30
그림 4.6: CaMKII의 Thr286부분 이상으로 인한 비정상적인 자동인산화 과정	32
그림 4.7: CaMKII의 Thr286부분의 돌연변이로 인한 AMPA 수용체 활성화의 변화	33
그림 4.8: LTP 생성과 I_{AMPA}	34
그림 4.9: LTP 생성과 CaMKII의 역할	35
표 4.1: 상수 값	36

I. 서론

1.1 연구배경

학습과 기억은 인간의 고도의 지적 과정 중 하나로서 오랜 세월동안 그 원리를 밝히려는 노력이 진행되어 왔다. 인지 심리학이나 철학적인 측면에서는 주로 개체의 행동 관찰 및 분석을 통해 학습과 기억의 메커니즘을 알아내고자 하였으며 신경생물학적 관점에서는 뇌를 비롯하여 뇌를 구성하고 있는 신경세포에 대한 생리학적이고 생화학적인 접근으로서 이를 설명하고 있다. 최근 들어 분자생물학의 발달과 미시적 관찰기구의 개발을 통해 세포 내에 있는 분자단위의 생체 물질(biomolecule)의 이동 및 반응 과정을 관찰할 수 있게 되었다. 이러한 다양한 분석을 통해 분자 혹은 세포 단위의 학습 과정과 기억 형성 기작을 시냅스 가소성(synaptic plasticity)으로 설명하려는 시도를 하게 되었다[Goelet *et al.* 1986].

한 신경원에서 생성된 임펄스가 다른 신경원으로 전달될 수 있도록 특수하게 분화된 구조를 시냅스(synapse)라 한다. 시냅스는 주변 자극이나 개체의 경험적 요인에 따라 그 연결(synaptic connection) 강도가 변한다. 이러한 신경세포의 형태학적 변형이 초래하는 양상을 시냅스 가소성으로 설명할 수 있다[Engert and Bonhoeffer 1999]. 시냅스 연결 강도의 변화나 발생과정에서 관찰할 수 있는 신경생리학적인 시냅스의 구조적 생성 및 변형은 환경적, 경험적 자극에 대한 시냅스 가소성의 표상이라 말할 수 있다. 중추신경세포에서 대표적인 시냅스 가소성 표상의 형태로 LTP (long-term potentiation)와 LTD (long-term depression)가 있다. 신경생리학적으로 비교적 긴 시간(몇 분에서 몇 시간) 동안 시냅스 연결이 강화되거나 약화되는 양상은 해마(hippocampus)를 포함한 뇌의 많은 부분에서 학습과 기억을 의미하고[Bliss and Collingridge 1993], 이와 동시에 신경계의 발달 및 성장을 암시한다고 알려져 있다[Cline 1991]. 이러한 가설을 뒷받침 할만한 메커니즘으로는 시냅스전/후의 조절 및 변화(pre/postsynaptic

modulation)가 알려져 있으며, 이는 신경세포의 신호전달 과정과 매우 밀접한 관계가 있다 [Bliss and Lomo 1973; Malinow 1994; Nicoll and Malenka 1995].

시냅스 연결 강도 변화를 유발하는 생체분자들 간의 신호전달 과정은 생체분자들(biomolecules) 간의 생화학적 결합 및 분리, 인산화(phosphorylation), 탈인산화(dephosphorylation) 등을 통해 동시다발적이며 순차적으로 진행된다. 이러한 일련의 과정은 흥분성 시냅스(excitatory synapse)의 경우 수상돌기가지(dendritic spine) 내에 축적된 칼슘이온(Ca^{2+})의 양에 의해 조절된다[d'Alcantara *et al.* 2003]. 특히 학습과 관련해서 많은 연구가 진행되고 있는 해마의 CA3-CA1 뉴런의 이온통로조절 글루타메이트 시냅스(ionotropic glutamatergic synapse)에서는 주로 NMDA (N-methyl-D-aspartate) 수용체(receptor)의 활성화 결과로 수상돌기가지내의 칼슘이온 양이 급격히 증가한다고 알려져 있다[Barria *et al.* 1997]. NMDA 수용체 채널을 통한 칼슘이온의 다량 유입은 단백질 인산화/탈인산화 효소(protein kinase/phosphatase)의 활성화를 유발하여 LTP를 생성하는 데에 결정적인 역할을 한다[Lisman and Zhabotinsky 2001]. LTP가 유도되는 과정 중 시냅스의 활성화 및 조절(synaptic structural modulation)과 막전위의(membrane potential) 변화는 시냅스전/후의 조절 과정을 통해 시냅스 가소성을 표방한다. 그러한 맥락에서 시냅스 가소성에 대한 연구는 개체의 성장 및 발달이나 학습과 기억 형성을 이해하는 데에 도움을 줄 수 있다.

1.2 연구내용

기존의 시냅스 모델이나 신경망에서는 주로 신경세포의 전기생리학적 특성을 모델링하거나, 시냅스에서의 신경전달물질의 전도(synaptic transmission)과정을 주로 다루었다. 그러한 연구에서는 시냅스 수용체(receptor)나 이온채널(ion channel)에서 발생하는 전기적 전위차이가 일으키는 시냅스의 전기적 특성 및 신경세포의 변화 패턴 등을 제시하였다. 이러한 모델에서는 주로 신경세포의 전기적 신호 전달 매개로서의 역할을 부각하였으며, 시냅스전 말단과 시냅스후 내

의 조절 기작에 의한 신경전달물질의 전도성은 배제되어 있는 경우가 많았다. 신경전달물질이나 칼슘과 같은 주요한 생체물질은 중추 신경세포를 연결하는 신호전달과정의 매개임과 동시에 기억 및 학습에서의 생리학적 근거를 내포하는 중요한 단서 중 하나이다. 중추신경계의 생화학적 반응 및 조절기작들은 기억 및 학습 원리에 대한 연구 주제로 관심의 대상이 되고 있기도 하며, 최근 대두되고 있는 알츠하이머병(Alzheimer's disease)과 같은 신경질환 관련 연구 주제로 부각되고 있다.

본 논문에서는 LTP를 유발하는 동안 수상돌기가시에서 발생하는 생화학적 신호전달 기작과 이에 따른 시냅스후 막(postsynaptic membrane) 전류 크기의 변이 과정을 재연하고자한다. 이를 통해 전기적 시냅스와 화학적 시냅스의 특성을 결합하며, LTP를 유도하는 과정의 시냅스 가소성을 제시하고자한다. 이를 위해 시냅스후 막에서의 생화학적 신호전달 과정의 일환인 AMPA 수용체(alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor)의 어셈블리 작용을 이용한다.

AMPA 수용체의 어셈블리 과정은 LTP를 유도하는 과정에 발생하는 시냅스후 조절로서 생화학적 신호전달 기작을 통해 유도된다. 해마의 CA1-CA3 부위 뉴런의 흥분성 글루타메이트 시냅스(excitatory glutamatergic synapse)에서는 강한 자극이 주어지면 NMDA 채널(N-methyl-D-aspartate channel)을 통해 급격한 양의 칼슘이온이 유입된다. 축적된 칼슘이온은 수상돌기가시 내의 여러 효소와 단백질 인산화/탈인산화 효소 등의 활성화를 유발한다. 여러 효소 중에서도 Ca^{2+} /CaMKII (Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II)는 AMPA 수용체를 활성화하는데 필수요소로 기능한다[Hanson and Schulman 1992]. CaMKII의 역할은 LTP를 생성하는 데에서도 중요성이 부각되어 많은 연구의 대상으로 주목받고 있다[Lisman *et al.* 2002]. 칼슘이온을 필두로 발생하는 생화학적 반응들은 시냅스후 막에 있는 NMDA 수용체와 AMPA 수용체의 활성화를 조절한다. 칼슘이온 그 자체로는 글루타메이트 시냅스후의 AMPA 수용체의 어셈블리를 조절하지 못하지만, 여러 단계의 서로 다른 생체분자들의 반응과정을 통해 이를 유도하게 된다[Barria *et al.* 1997; Lisman and Zhabotinsky 2001]. AMPA 수용

체의 어셈블리는 시냅스 전도의 효율성을 높이고, LTP를 생성하는 요건으로 작용한다[Benke et al. 1998].

AMPA 수용체 어셈블리 과정을 도식화하기 위해서 수상돌기가 시냅스 내 생체물질들 간의 시간에 따른 활성화를 Michaelis-Menten식을 이용하여 미분방정식을 도출한다. 시냅스후의 NMDA 수용체를 통한 칼슘이온의 유입을 시작으로 시간에 따른 다양한 생체물질들의 활성 정도를 미분방정식으로 표현할 수 있다. 수상돌기가 시냅스 내에서 칼슘의 작용은 다양한 효소의 활성과 더불어 AMPA 수용체의 활성을 이끌어내기 때문에 시간에 따른 AMPA 수용체의 활성 정도를 유추할 수 있다. CaMKII의 영향으로 활성화된 AMPA 수용체는 그 기능이 향상되는데 이를 AMPA 수용체 컨덕턴스의 증가를 확인 할 수 있다. AMPA 수용체의 컨덕턴스 증가는 AMPA 수용체에 흐르는 전류량의 변화를 유발하며, 이는 흥분성 시냅스 후전위(EPSP; excitatory postsynaptic potential)를 조절한다. 흥분성 시냅스 후전위의 변화는 LTP를 측정하는 한 방법으로서 LTP를 유발하는 과정 중 AMPA 수용체의 역할을 확인할 수 있다.

AMPA 수용체 어셈블리 모델에서는 시냅스후의 생체물질들 간의 시간에 따른 반응식과 이온통로조절 글루타메이트 수용체에서 발생하는 전기적 전위 차이를 연계하여 LTP의 유도과정에서 발생하는 생화학적 반응들과 시냅스 전위의 관계를 규명하고자 한다. 이는 실제 신경세포에서 발생하는 전기적 자극에 대한 반응 및 작용을 생화학적 반응에 근거에 입각하여 설명하였다는 데에 의미가 있다. 본 모델을 이용하여 생체반응 과정 중 발견될 수 있는 특정 질병의 양상을 재연해 볼 수 있다. 생화학적 신호전달과정을 담당하는 생체물질을 약물 처리하여 그 기능을 약화시켰을 경우 발생하는 여러 가지 비정상적인 양상을 확인할 수 있다. 이러한 결과는 비정상적인 세포 기능이나 LTP 형성 과정을 설명하는 데에 도움을 줄 수 있으며, 더 나아가 시냅스의 신호전달체계의 부절적인 반응이나 활성화에 대한 질병연구에 도움이 될 수 있다.

시냅스 가소성에 대한 연구는 신경세포의 신호전달 과정에서 뿐만 아니라 개체의 발달이나 학습과 기억 등에서 주요 대상이 되고 있다. AMPA 수용체 어셈블리 모델을 이용한 시냅스 가소성 연구는 전기신경생리학적인 연구와 생화학

적인 연구의 접목을 통해 뇌의 기능을 연구하는 데에 도움이 되고자 하며, 더 나아가 여러 정신질환을 연구하는 데에 보다 심층적인 버팀목이 되고자 한다.

이 논문의 구성은 다음과 같다. 2장에서는 본 연구의 배경이 되는 시냅스 가소성과 시냅스후의 생화학적인 변화에 대해 살펴본다. 3장에서는 시냅스후의 생화학적 변화를 유발하는 메커니즘을 주축으로 글루타메이트 시냅스에서의 AMPA 수용체 어셈블리 모델과 이에 따른 시냅스 가소성 모델을 제시한다. 4장에서는 본 논문에서 제시하는 모델을 이용하여 시냅스 가소성 양상을 확인하기 위한 시뮬레이션을 살펴보고, 실제 생체에서 질병을 유발하는 시냅스후 신호전달 체계의 비정상적인 패턴을 위 모델을 이용해서 재연해본다. 5장에서는 4장에서의 시뮬레이션 결과를 통해 시냅스 가소성과, 질병을 유발하는 비정상적인 패턴 모델에 대해 검증한다. 또한 본 연구의 내용을 요약하고, 그 의의 및 문제점을 제시하며 앞으로 나아갈 방향에 대해 모색해 본다.

II. 시냅스 가소성

2.1 시냅스 가소성의 개념

신경전달물질의 전도는 시냅스에 주어졌던 이전 자극이나 시냅스의 활성화 정도에 따라 변한다. 시냅스 기능에 있어서 이와 같은 조절과 변화들을 시냅스 가소성이라 하며[Lisman and Harris 1993], 시냅스전나 시냅스후의 조절 기작을 통해 이를 확인할 수 있다[Malenka and Siegelbaum 2001]. 시냅스 가소성은 시냅스전와 시냅스후 간의 연결(synaptic connection)을 변화시키기도 한다. 가소성에 의해 신경전달물질의 전도가 증가되거나 감소될 수 있고, 이러한 변성은 다양한 시간 주기를 가진다. 시냅스 전위의 조절을 통해 시냅스 강도(synaptic strength)가 변할 수도 있다. 시냅스 강도의 변화는 신경세포 기능에 있어서 중요한 의미를 지닌다. 시냅스 강도의 급격한 변화들은 짧게는 감각중추 세포의 적응과 단기기억(short-term memory)에 영향을 미치고, 길게는 신경세포의 발달 및 성장과 시냅스 가소성 메커니즘에 변화를 가져온다. 이러한 특성들은 시냅스 전위에 있어서 시냅스전 말단과 시냅스후 막과 수상돌기까지 내에서 생체 반응 메커니즘의 변형으로 나타난다.

흥분성 글루타메이트 뉴런의 시냅스후 변화 및 조절은 시냅스 가소성을 단적으로 드러내는 예이다. 그 증거로 AMPA 타입의 글루타메이트 수용체의 활성화와 개수의 증가는 시냅스 전도를 조절하는 방법으로 알려져 있다[Sheng and Kim 2002]. AMPA 수용체의 이러한 기작은 휴지기의 뉴런에서는 발견되지 않고, 주로 해마 CA3-CA1 부분의 흥분성 뉴런에서 LTP를 유도할 때 관찰된다. 이때 NMDA 수용체(N-methyl-D-aspartate receptor)의 역할이 중요한데, LTP 유도를 시작하기 위해서는 NMDA 수용체를 통해 칼슘이 유입이 필수적이다. NMDA 수용체를 통해 축적된 다량의 칼슘은 시냅스후 막을 통과하여 수상돌기 가지에서 여러 생체물질들과 결합하여 단계적으로 AMPA 수용체를 활성화시킬 수 있도록 작용한다. 따라서 시냅스후를 통한 신호 전이(signal transduction)과

정과 NMDA 수용체를 거친 칼슘에 의한 신호전달 기작을 이해하는 것이 시냅스 가소성을 표현하는 데에 있어 중요하다[Sheng and Kim 2002]. 시냅스후 조절을 통한 AMPA 수용체 어셈블리 모델을 알아보기 전에 이온통로조절 흥분성 뉴런의 NMDA/AMPA 수용체 특성과 칼슘이온에 의한 신호전달과정에 대해서 살펴보겠다.

2.2 NMDA 수용체에 의한 LTP 유도

많은 학자들이 시냅스 가소성에 대한 연구를 해마의 CA1-CA3 부분에 있는 뉴런에서 수행하였다. 특히 NMDA 수용체와 관련하여 LTP 연구가 많이 시행되었는데, NMDA 수용체에 의한 LTP 유도가 많은 주목을 받았다. 해마 뉴런에서 LTP 발생과정 동안 관찰되는 시냅스 강도의 증가 현상은 학습 및 기억과 밀접한 관련 있을 거라 예측되기도 한다[Malenka and Nicoll 1993].

1) LTP 유도와 시냅스 수용체

1970년대 초반에 Bliss와 Lomo는 토끼의 해마에서 치아부위(dentate area)의 흥분성 시냅스에서 LTP 현상을 발견했다[Bliss and Lomo 1973]. LTP 현상은 자극이 가해진 시냅스 전위가 탈분극 상태로 장시간 동안 유지되는 현상을 일컫는다. 십년이 지나서야 여러 학자들에 의해 LTP를 유발하는 데에 필수적인 요건과 그 특성을 밝히는 기작들이 알려지기 시작했다.

연구의 주요 대상이 되었던 해마의 CA1-CA3 부위의 흥분성 글루타메이트 뉴런의 LTP 기작은 다음과 같다. 흥분성 글루타메이트 시냅스의 전도 과정 동안 신경전달물질인 글루타메이트(glutamate)는 이온통로조절 수용체와 결합하여 수용체를 활성화 시킨다. 활성화된 수용체의 열린 채널을 통해 이온물질들이 시냅스후 안으로 이동한다. 시냅스전의 조절 기작으로 인해 글루타메이트 양이 조

절되고, 시냅스후 막 상에서의 수용체 개수가 늘어나면 증가된 수용체에 흐르는 전류가 일정 시간동안 유지된다. 이때 AMPA/NMDA 수용체는 이온물질을 통과시키는 채널을 내포하는 이온통로조절 수용체로서 이온의 통과에 따라 그 전류가 변한다. 시냅스에 흐르는 전류 양의 변화는 LTP와 유사한 관계가 있다.

흥분성 글루타메이트 시냅스로는 앞에서 언급한바와 같이 AMPA 수용체와 NMDA 수용체가 있다. AMPA 수용체를 통해서 일가양이온인 나트륨이온(Na^+)과 칼륨이온(K^+)이 이동할 수 있으며 신경세포가 휴지상태(resting membrane potential)에 가까울 때 대부분의 내부 전류를 제공한다[Malenka and

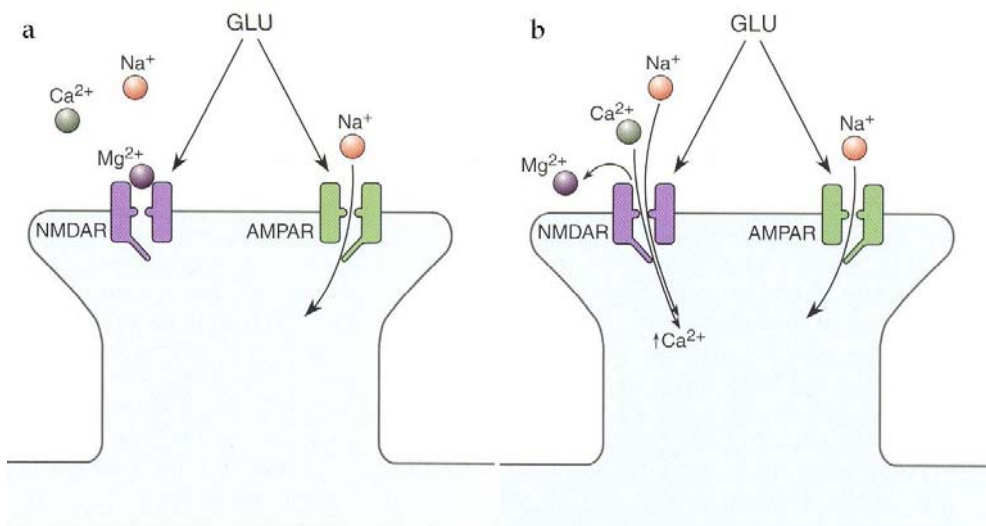


그림 2.1 NMDA 수용체에 의한 LTP 유도 모델[Malenka and Siegelbaum 2001]. (a) 일반적인 시냅스 전위 모델. 글루타메이트(GLU)가 시냅스전 말단에서 방출되어 AMPA 수용체와 NMDA 수용체에 결합한다. 탈분극이 없는 휴지전위 상태의 AMPA 수용체의 채널을 통해서 나트륨 이온이 통과하지만, NMDA 수용체는 활성화되지 않아서 마그네슘이 채널 통로를 막고 있다. (b) 신경세포 탈분극 동안의 시냅스 전위 모델. NMDA 수용체를 막고 있던 마그네슘이 수용체와 분리되면서 칼슘과 나트륨 이온이 NMDA 채널을 통과하여 수지상가지(dendritic spine)로 유입된다. 수지상가지의 시냅스후 안에 축적되는 칼슘은 LTP를 유도하는 데에 결정적인 역할을 한다.

Siegelbaum 2001]. 반면 NMDA 수용체는 채널이 마그네슘(Mg^{2+})에 의해 막혀 있어서 강한 시냅스전 임펄스 자극에만 반응한다. 따라서 낮은 빈도의 시냅스 자극에 대해서는 NMDA 수용체가 시냅스후 반응에 대해 관여하지 않고, 시냅스전 말단으로부터 강한 자극이 전해져서 시냅스후가 탈분극(depolarize)되면 마그네슘이 NMDA 채널에서 분리된다. NMDA 수용체 채널의 통로가 열리게 되면 칼슘과 나트륨이 시냅스후 안으로 유입된다(그림 2.1). 높은 빈도의 강한 자극 결과로 수상돌기가 내부의 칼슘 농도가 증가하게 되며, 이는 LTP를 유도한다. 시냅스후 막전위의 탈분극 동안 글루타메이트가 방출되어 NMDA 수용체를 활성화 시키는 것이 LTP를 유발하는 첫째 요소라 할 수 있다. 시냅스후 내로 다량의 칼슘 유입은 LTP를 촉진하는 두 번째 요소이다.

2) LTP와 칼슘의 신호전달기작

신호전달과정의 많은 분자물질들이 NMDA 수용체를 통해 유입된 칼슘이온의 신호를 전환하는 역할을 한다고 알려져 있다. NMDA 수용체를 통해 유입된 칼슘이온은 주요 단백질 인산화 효소를 지속적으로 활성화시킴으로써 궁극적으로 시냅스 전도를 향상시킨다[Malenka and Nicoll 1999]. 칼슘에 의해 활성화되는 효소로 세린-트레오닌 단백질 인산화 효소(serine-threonine protein kinase)인 CaMKII와 PKC (protein kinase C)가 있고, PKA (protein kinase A) 등의 단백질 인산화 효소가 있다.

CaMKII의 자동인산화 작용은 AMPA 수용체를 인산화함으로써 AMPA 수용체의 기능을 조절한다. CaMKII는 LTP가 유발되도록 하는 결정적인 기능을 하는 단백질 효소 중 하나로서 여러 실험을 통해 그 중요성이 확인된 바 있다[Lisman and Zhabotinsky 2001; Barria *et al.* 1997; Shirke and Malinow 1997]. Malenka 와 Nicoll에 의하면 CaMKII는 시냅스 가소성을 통해 특정 형태 기억의 근거가 된다고 한다[Malenka and Nicoll 1999].

CaMKII의 활성화는 다음과 같은 경로를 통해 일어난다(그림 2.2). NMDA 수용

체 채널을 통해 칼슘이 급격히 유입되면 칼슘은 칼슘-칼모듈린(calcium-calmodulin)과 결합한다[Bhalla and Iyengar 1999]. 칼슘-칼모듈린은 CaMKII에 작용하여 CaMKII를 활성화시킨다. 활성화된 CaMKII는 Thr286 (threonine 286) 부분에서 자동인산화를 통해 활성화 정도를 높일 수 있다. 자동인산화 과정은 칼슘-칼모듈린의 영향을 받지 않는다. 그래서 CaMKII는 칼슘 신호보다 더 오랫동안 활성화를 유지할 수 있게 된다. CaMKII의 자동인산화는 LTP를 유도하기 시

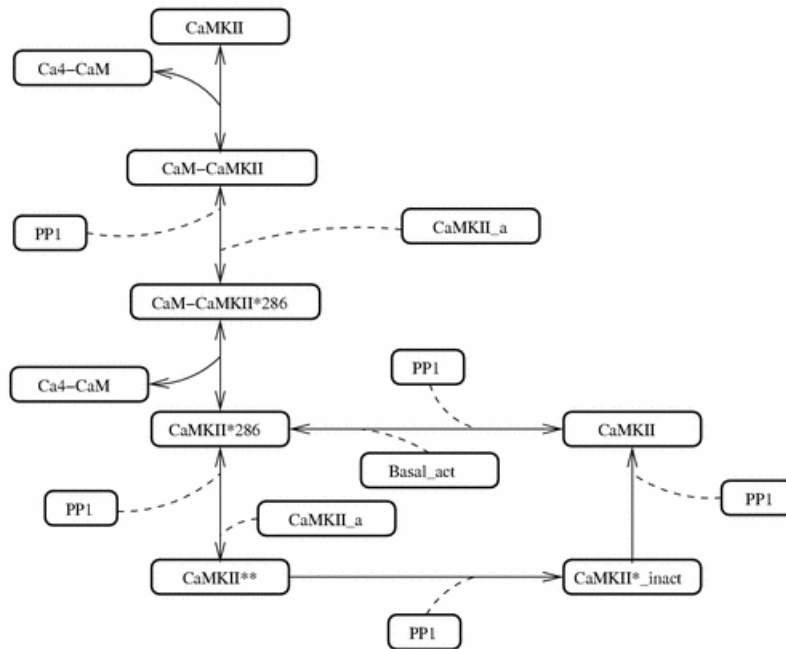


그림 2.2 CaMKII의 활성화 과정[그림 참조1]. 칼슘-칼모듈린 결합체 (Ca4-CaM)가 CaMKII와 결합하여 CaM-CaMKII를 이룬다. CaM-CaMKII의 Thr286가 활성화되면 Ca4-CaM이 CaMKII와 분리된다. Thr286이 활성화된 CaMKII*286은 자동인산화과정을 시작한다. 이때 Ca-CaM과 독립적으로 자동인산화 과정이 진행된다. PP1 (protein phosphatase type 1)은 타입 1 단백질 탈인산화 효소로서 CaMKII의 역반응에 관여하여 억제하는 기능을 한다. CaMKII_a와 CaMKII*_inact는 각각 CaMKII의 활성화 상태와 자동인산화 과정 중 CaMKII의 비활성 단계를 의미한다.

작한 후 일어나며, 이는 AMPA 수용체의 GluR1 기본유닛을 인산화 한다 [Hanson and Schulman 1992; Barria *et al.* 1997]. CaMKII는 LTP를 유도하는데 있어서 결정적인 역할을 한다[Lisman and Zhabotinsky 2001]. CA1 신경세포에서 CaMKII의 활성을 억제하거나 CaMKII의 기본유닛을 봉쇄했을 때는 다른 조건이 충분하여도 LTP가 발생하지 못한다[Malinow *et al.* 1989; Malenka *et al.* 1989].

PKA는 칼모듈린에 의해서 활성화된 AD (adenylyl cyclase)를 거쳐서 초기 활성화된다. PKA의 활성화는 단백질 탈인산화 효소의 활성화 정도를 감소시킴으로써 간접적으로 CaMKII의 활성화 촉진한다고 알려져 있다. 이는 PKA가 PP1 (protein phosphatase 1)을 억제하여 PP1이 CaMKII을 억제하는 기능을 차단하는 과정을 거쳐 발생한다[Bhalla and Iyengar 1999].

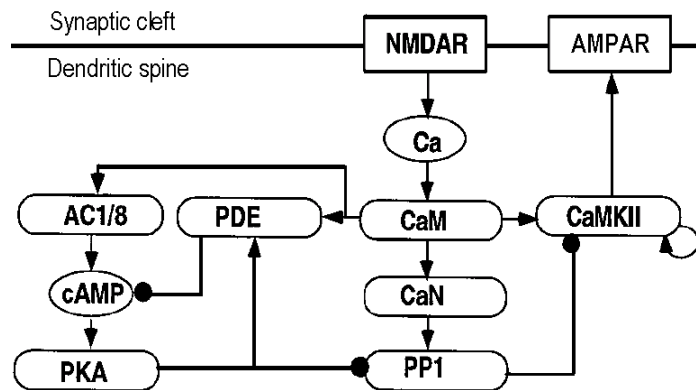


그림 2.3 칼슘의 신호전달 모델[Bhalla and Iyendar 1999]. NMDA 수용체를 통해 수상돌기가시내로 유입되는 칼슘이온의 신호전달 기작을 모형화 했다. 칼슘이온은 칼모듈린과 결합하여 PDE (phosphodiesterase), CaN (calcineurin), CaMKII 등의 효소를 활성화시키고 활성화된 효소들은 또 다른 물질을 활성화 또는 억제하여 신호를 전달하게 된다. Ca: Ca²⁺, AC1/8: adenylylcyclase 1-8, cAMP: cyclic AMP. PKA: proten kinase A, PP1: phosphatase 1, —➔: 활성화 작용, —●: 억제 작용.

PKC는 CaMKII와 유사한 역할을 한다. PKC의 억제제가 처리되어 기능을 발휘하지 못하면 LTP가 재생되지 않으며, PKC가 CA1 부분에 주입되면 시냅스 전도를 유도한다. 그러나 PKC가 매개되어 유도된 시냅스 전도가 LTP와 같은 기작을 사용하는지는 확실하게 밝혀지지 않았다. 이밖에도 LTP에 관여하는 단백질 인산화 효소로 Fyn과 Src이 있고, MAPK (mitogen-activated kinase)가 있다. Src는 LTP를 유도하는 과정에서 NMDA 수용체 기능을 증진시켜서 LTP에 관여한다. 반면 MAPK는 칼슘 채널의 활성화를 감소시키는 역할을 한다.

3) LTP와 AMPA 수용체

이제까지 살펴보았던 LTP 유도와 칼슘에 의한 신호전달 기작은 궁극적으로 AMPA 수용체의 기능을 조절한다[Malenka and Siegelbaum 2001]. LTP 유도로 인해 시냅스전에서 신경전달물질의 전도 확률이 증가되기도 하며, 시냅스후에서 AMPA 수용체의 컨덕턴스가 증가하거나 새로운 수용체가 생성되기도 한다 [Kandel 2000; Malenka and Siegelbaum 2001] (그림2.4). 이러한 조절 작용은 LTP를 유도하는 동안 나타나는 현상으로 주로 태어 난지 얼마 안 되는 어린 개체에서 발견된다.

시냅스전에서 전도되는 신경전달물질의 양을 고정시켰을 때 AMPA 수용체의 EPSC 양이 증가하는 것은 AMPA 수용체의 기능을 향상되었다는 것을 의미한다. 이러한 변화는 LTP 동안에 관찰되고, NMDA 수용체 칼슘이온 채널의 반복적인 활성화를 수반한다. 효현제(agonist)를 적용함으로써 AMPA 수용체의 변화를 확인할 수도 있다. LTP 동안 효현제의 활성화가 꾸준히 증가하는 양상은 AMPA 수용체가 LTP 생성에 기여한다는 사실을 확인할 수 있다.

다양한 연구 결과로 AMPA 수용체 반응의 증가는 LTP가 생성되도록 기여한다는 것을 제시한다. 이러한 가능성 중의 하나로 AMPA 수용체 GluR1 기본유닛의 인산화를 들 수 있다. CA1 세포의 AMPA 수용체는 두 종류의 GluR1과 GluR2을 갖고 있는데, 이중 GluR1의 Ser831 (serine 831)부분이 CaMKII에 의해

인산화 된다[Barria *et al.* 1997]. LTP는 GluR1의 인산화와 수반하여 발생하며, CaMKII의 억제제로 인해 GluR1의 효과가 봉쇄되면 LTP가 소멸되는 것을 알 수 있다[Barria *et al.* 1997]. GluR1의 인산화는 AMPA 수용체의 채널 컨덕턴스를 향상시킨다(그림 2.4)[Derkach *et al.* 1999].

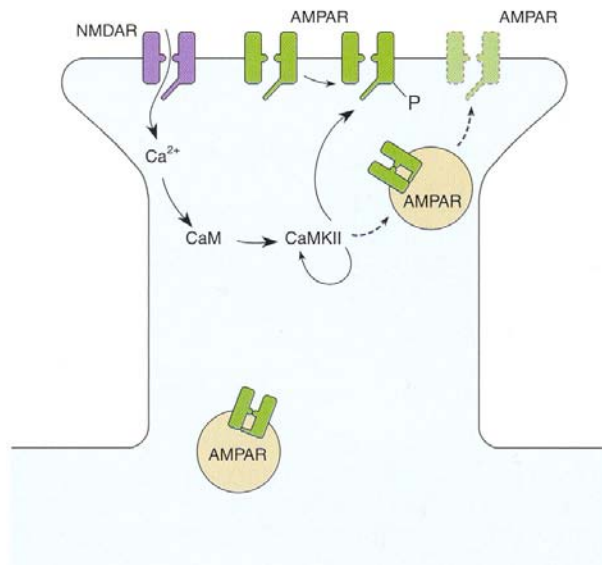


그림 2.4 NMDA 수용체에 의한 LTP 유도동안 발생하는 시냅스후에서의 AMPA 수용체의 변화[Malenka and Siegelbaum 2001]. CaMKII를 활성화하기 위해서 NMDA 수용체를 통해 유입된 칼슘이온은 칼모듈린(CaM)과 결합한다. CaMKII는 자동인산화 과정을 거쳐 시냅스후 막 상에 존재하는 AMPA 수용체의 GluR1 기본유닛을 인산화하여 AMPA 수용체 채널의 컨덕턴스를 향상시킨다. CaMKII는 수상돌기가시 내부에 존재하는 AMPA 수용체를 활성화하여 시냅스후 막에 AMPA 수용체 개수를 늘린다.

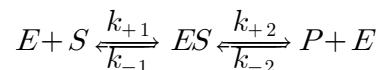
3절에서는 AMPA 수용체의 어셈블리 모델을 알아본다. NMDA 수용체를 수반한 LTP 발생 과정에서 칼슘 신호전달 과정과 CaMKII의 AMPA 수용체 인산화 과정을 시냅스 가소성 관점에서 모델화 한다.

III. AMPA 수용체 어셈블리 모델

시냅스 가소성에 대한 칼슘 및 CaMKII의 일반적인 윤곽을 제시한 사람은 Lisman이다. Lisman은 칼슘이온이 조절하는 두 가지 경로를 설명하였다 [Lisman 1994]. 첫 번째 경로는 CaMKII의 활성화에 관한 것이고, 다른 하나는 LTP 유도과 연관된 것이다[d'Alcantara *et al.* 2003]. 두 경로는 AMPA 수용체의 GluR1과 연관되어있으며, 앞에서 언급한 바와 같이 GluR1의 활성화는 LTP를 유도하고 AMPA 수용체 기능을 향상시킨다. AMPA 수용체의 활성화 조절은 AMPA 수용체 채널의 컨덕턴스를 증대시키며, 시냅스후 상의 AMPA 수용체 개수가 늘어나도록 AMPA 수용체 삽입을 촉진한다[Benke *et al.* 1998; Derkach *et al.* 1999].

3.1 칼슘 신호전달 반응 과정 및 반응식

NMDA 수용체를 통해 유입되는 칼슘이온이 AMPA 수용체의 활성화를 유도하는 생화학적 반응 과정을 알아보도록 하겠다. 생화학 반응은 Michaelis-Menten 반응식에 기반을 두고 있다. 효소와 기질 간의 반응 관계를 Michaelis-Menten 반응식을 이용해서 나타낼 수 있다. 아래 식에서와 같이 기질과 효소는 각각 S와 E로 표현되며, 그 결합체는 ES라 한다. P는 ES의 결과물이고, k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} 는 각 반응의 반응계수이다. 괄호 표기는 물질의 농도를 의미하며, 생화학 반응에서 시간에 따른 효소와 기질의 농도변화를 미분방정식으로 도출할 수 있다.



$$\frac{d[S]}{dt} = -k_1[E][S] + k_{-1}[ES]$$

$$\frac{d[E]}{dt} = -k_1[E][S] + (k_{-1} + k_2)[ES] - k_{-2}[E][P]$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] + k_{-2}[E][P]$$

$$\frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] - k_{-2}[E][P]$$

칼슘신호전달 과정은 세포 내에서 다양한 기작을 갖지만, 여기서는 AMPA 수용체의 어셈블리 과정에 관여하는 메커니즘에 초점을 두기로 한다(그림3.1). 그 과정은 다음과 같다. NMDA 수용체를 통해 수상돌기가 시냅스로 유입된 칼슘이온은 칼모듈린과 반응하여 칼슘-칼모듈린 결합체를 형성한다. 칼슘-칼모듈린 결합체는 각각 CaMKII와 CaN과 반응한다. CaMKII은 자동 활성화 단계를 거쳐 CaMKII의 Thr286부위를 자동인산화 한다(그림2.2). 활성화 단계에 있는 CaMKII과 자동인산화 되는 CaMKII는 각각 AMPA 수용체를 활성화하는 데에 관여한다. CaN은 칼슘-칼모듈린 결합체와 반응하여 활성화되며 AMPA 수용체의 활성화를 억제한다. 활성 상태의 CaN는 DARPP-32 (dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein)를 억제한다. 활성화된 PP1은 CaMKII의 활성을 저해하는 억제제로서 CaN과 같이 AMPA 수용체의 활성화를 방해한다. 활성 상태의 PKA는 DARPP-32의 활성을 억제하고, AMPA 수용체 활성화를 돕는다. AMPA 수용체 어셈블리 과정은 효소와 기질의 모든 반응 과정을 적용하지 않고, 계략적으로 묘사하였다(그림 3.1)[d'Alcantara *et al.* 2003].

NMDA 수용체를 통해 유입된 칼슘이온은 칼슘-칼모듈린과 결합하여 활성을 띠게 된다(CaM*). 이때 K_d 는 해리상수(dissociation constant)로서 칼슘과 칼슘-칼모듈린 결합이 분리될 때의 값을 의미한다. n_H 는 Hill 계수(Hill coefficient)로서 결합 과정의 상호작용을 나타내는 계수이다. K_d 와 n_H 는 칼슘과 칼슘-칼모듈린 결합 관계를 표현하는 수치이다. CaMKII의 두 활성상태(K' , K^*)는 각각 AMPA 수용체(AR)의 정반응에 관여한다(그림 3.1).

활성을 띠는 칼슘-칼모둘린 결합체(CaM*)는 CaMKII (K)와 반응한다. 그림 3.1의 반응식은 2절에서 제시한 실제 CaMKII의 반응 단계를 축소시킨 모형이다. 따라서 K'은 칼슘-칼모둘린 결합체에 의한 활성화단계이고, K*는 Thr286의 자동인산화를 의미한다. k_1 , k_2 , k_3 , k_4 는 각각 반응 관계를 나타내는 반응 계수로서 진행되는 방향의 반응에 대한 비율을 제공해준다. 특히 k_3 는 Thr286의 자동인산화 과정을 의미한다.

활성을 띠는 칼슘-칼모둘린 결합체는 CaMKII뿐 아니라 CaN과도 반응한다. 활성화를 통해 CaN (CaN*)는 억제제로서의 기능을 수행한다. AMPA 수용체의 역반응을 촉진하고, 활성 상태에 있는 DARPP-32 (D)를 억제한다. DARPP-32는 PP1 (P)과 반응하여 결합체를 형성하고, PP1의 기능을 억제한다. 활성 상태의 PP1은 CaMKII와 AMPA 수용체의 역반응을 촉진하여 AMPA 수용체 어셈블리

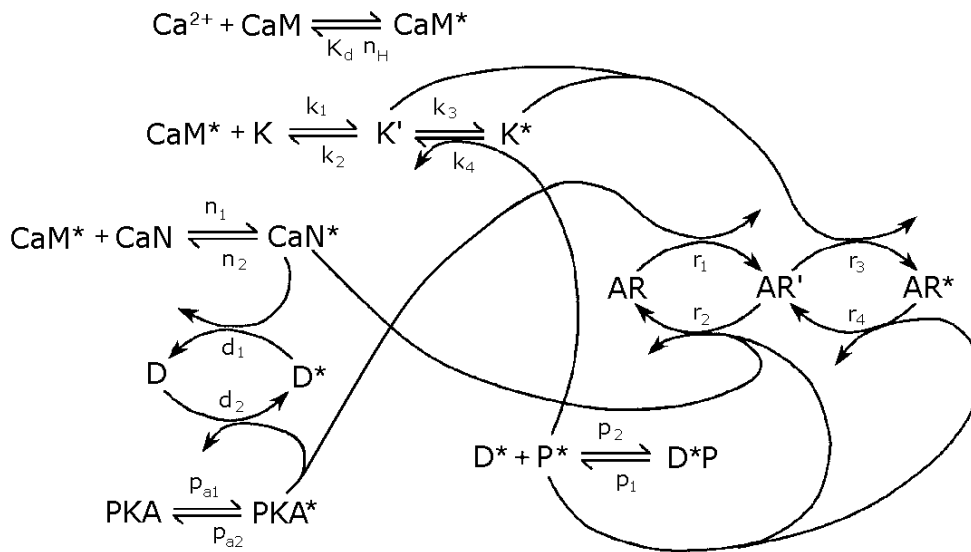


그림3.1 칼슘 신호전달 반응 경로 및 AMPA 수용체 활성화 경로 모델 [d'Alcantara *et al.* 2003]. CaM: 칼슘-칼모둘린, K: CaMKII, CaN: calcineurin, D: DARPP-32, P: PP1, PKA: PKA, AR: AMPA 수용체를 의미한다. 칼슘-칼모둘린 반응에서 K_d , n_H 는 각각 분리 상수(dissociation constant)와 Hill coefficient이다.

과정을 조절하는 역할을 하는 일종의 잠금장치이다. PP1은 CaMKII와 더불어 길항 작용을 함으로써 칼슘 신호전달 과정의 완충제 역할을 한다. PKA (PKA)는 CaMKII와 같이 AMPA 수용체의 인산화를 돕는 주요 인산화 효소 중 하나로 작용한다.

많은 종류의 효소나 분자물질이 AMPA 수용체의 활성화에 관여한다. 반응에 관여하는 물질들이 PSD (postsynaptic density)나 수상돌기가시 안에 존재하고 있으며, AMPA 수용체 활성화 과정은 신경세포의 핵 안의 여러 생체분자의 반응을 수반한다. 그림 3.1의 반응 단계를 함수식으로 반영하려면 초기 값이 주어져야 한다. 따라서 반응에 참여하는 다음 7가지 물질에 대해 초기 값으로 총 농도를 다음과 같이 나타내었다[d'Alcantara *et al.* 2003].

$$CaM_{tot} = CaM + CaM^* + K + K^* + CaN^* \quad (3.1)$$

$$K_{tot} = K + K' + K^* \quad (3.2)$$

$$CaN_{tot} = CaN + CaN^* \quad (3.3)$$

$$D_{tot} = D + D^* + D^* P \quad (3.4)$$

$$P_{tot} = P^* + D^* P \quad (3.5)$$

$$PKA_{tot} = PKA + PKA^* \quad (3.6)$$

$$AR_{tot} = AR + AR' + AR^* \quad (3.7)$$

그림 3.1에서 제시한 동역학적 화학 반응 과정에 참여하는 효소와 단백질은 Michaelis-Menten 반응식에 따라 다음과 같이 나타낼 수 있다[d'Alcantara *et al.* 2003].

$$\begin{aligned} \frac{dCaM^*}{dt} = & - \frac{\left(\frac{dK'}{dt} + \frac{dK^*}{dt} + \frac{dCaN^*}{dt} \right)}{\left\{ 1 + \left(\frac{K_d}{[Ca^{2+}]} \right)^{n_H} \right\}} \\ & + \frac{4K_d(CaM_{tot} - K' - K^* - CaN^*)}{[Ca^{2+}]^2 \left\{ 1 + \left(\frac{K_d}{[Ca^{2+}]} \right)^{n_H} \right\}^2} \cdot \frac{d[Ca^{2+}]}{dt} \end{aligned} \quad (3.8)$$

$$\frac{dK'}{dt} = k_1 CaM^* (K_{tot} - K' - K^*) - (k_2 + k_3) K' + k_4 K^* P^* \quad (3.9)$$

$$\frac{dK^*}{dt} = k_3 K' - k_4 K^* P^* + k_5 K^* \quad (3.10)$$

$$\frac{dCaN^*}{dt} = n_1 CaM^* (CaN_{tot} - CaN^*) - n_2 CaN^* \quad (3.11)$$

$$\frac{dP^*}{dt} = p_1 P^* - p_2 (P_{tot} - P^*) \quad (3.12)$$

$$\begin{aligned} \frac{dD^*}{dt} = & d_2 PKA^* (D_{tot} - D^* - P_{tot} + P^*) - d_1 D^* CaN^* \\ & + p_1 (P_{tot} - P^*) \end{aligned} \quad (3.13)$$

$$\frac{dPKA^*}{dt} = p_{a1} (PKA_{tot} - PKA^*) - p_{a2} PKA^* \quad (3.14)$$

$$\begin{aligned} \frac{dAR'}{dt} = & a_{r1} PKA^* (AR_{tot} - AR' - AR^*) - a_{r2} AR' (P^* + CaN^*) \\ & - a_{r3} AR' (K' + K^*) + a_{r4} P^* AR^* \end{aligned} \quad (3.15)$$

$$\frac{dAR^*}{dt} = a_{r3} AR' (K' + K^*) - a_{r4} P^* AR^* \quad (3.16)$$

식 3.8-3.16은 시냅스후 내의 그림 3.1의 반응식을 시간에 따라 변하는 역동적인 양상을 표현할 수 있다. 이는 NMDA 수용체를 통해서 칼슘이 유입된다는 가정 하에 형성된 구조이다. 궁극적으로 시냅스에서 주어지는 자극에 대한 LTP 유도 과정을 알아보기 위해서는 칼슘 신호전달 과정과 NMDA 수용체와 AMPA 수용체에서 흐르는 전류의 양적 변화 관계를 이해해야한다. 앞에서도 언

급하였지만, AMPA 수용체 어셈블리 모델은 칼슘을 매개로 한 수상돌기가시 내의 다양한 생화학적 반응과 전기적 신호처리의 연계 과정이라 할 수 있다. 단계적인 생화학적 반응 과정을 통해 AMPA 수용체의 기능이 향상된다는 것은 단적으로 AMPA 수용체의 컨덕턴스가 증가한다는 것을 의미한다. 이는 다양한 실험을 통해 생리학적으로 증명된 바이며[Derkach *et al.* 1999; Lisman *et al.* 2002; Sabatini and Oertner 2002], 신경세포의 자극이 칼슘 신호전달 체계를 거쳐 AMPA 수용체의 기능 변화로 도출된다는 의미이다. AMPA 수용체의 조절 과정은 LTP 유도과 맥을 이어가며, 시냅스 활성화는 신경세포 내에서 개체의 경험적 산물로 여겨질 수 있다. 물론 이러한 변화는 시냅스에서만 국한하여 일어나지 않는다. 이는 신경세포 전반에 걸쳐 일어나는 조절 작용의 한 본보기로서 자극에 대한 반응이다. 이제부터 수용체의 전류 변화와 칼슘 신호전달 과정과의 관계를 유도한다.

3.2 흥분성 시냅스후 전류

1) 수용체 전류 및 칼슘 농도

신경전달물질이 NMDA 수용체와 결합하면 칼슘이온이 수상돌기가시 내로 유입된다. 그러나 실제 칼슘이온이 수상돌기가시내로 투과되는 경로가 다양하게 존재한다. AMPA 수용체 어셈블리 모델을 제한적으로 규명하기 위해서 칼슘이온은 NMDA 수용체의 채널을 통해서만 수상돌기가시 내로 들어간다고 가정한다.

NMDA 채널을 통해 수상돌기가시 내로 유입되는 칼슘이온 농도는 다음과 같이 정의 할 수 있다[Sabatini *et al.* 2002; Yeung *et al.* 2002].

$$\frac{d[Ca^{2+}]}{dt} = I_{NMDA} - \frac{1}{\tau} ([Ca^{2+}] - [Ca^{2+}]_{\min}) \quad (3.17)$$

3.17식에서 시간에 따라 변하는 칼슘이온의 농도는 시냅스후 막의 NMDA 수용체에 흐르는 전류량인 $EPSC_{NMDA}$ 와 상관관계가 있음을 알 수 있다. $[Ca(t)]$ 는 수상돌기 내로 유입되는 칼슘이온 농도를 $I_{NMDA}(t)$ 는 NMDA 수용체 채널에 흐르는 전류량이다. τ 는 칼슘농도가 수상돌기가시 내에서 감소하는 시간이다. $[Ca(t)]_{min}$ 는 휴지전위 상태에 존재하는 칼슘이온 농도이다[De Schutter and Smolen 1998].

해마 뉴런에서 LTP를 유도할 정도의 강한 자극에 대해서 주로 NMDA 수용체의 컨덕턴스 영향을 받는다고 알려져 있다[Mainen *et al.* 1999]. NMDA 수용체의 활성화와 더불어 칼슘 이온의 유입은 칼슘 신호전달 과정을 촉진하고, AMPA 수용체의 기능을 증대시킨다. 이는 AMPA 수용체의 컨덕턴스 변화를 통해 확인할 수 있다. 우선 NMDA 수용체와 AMPA 수용체의 전류량에 대해 알아본다.

NMDA 수용체의 전류량은 다음과 같이 나타난다[Destexhe *et al.* 1998].

$$I_{NMDA} = \bar{g}_{NMDA} r B(V) (V - V_r) \quad (3.18)$$

\bar{g}_{NMDA} 는 NMDA 채널의 최대 컨덕턴스이고, r 은 채널이 열려있는 비율을 의미한다. V 는 휴지막 전위이고, V_r 은 칼슘이온에 대한 역전위(reversal potential)이다. $B(V)$ 는 NMDA 수용체를 막고 있는 마그네슘 차단을 의미하며 다음과 같이 정의한다[Destexhe *et al.* 1998].

$$B(V) = \frac{1}{1 + \exp(-0.062)[Mg^{2+}]_o / 3.57} \quad (3.19)$$

$[Mg^{2+}]_o$ 는 시냅스(synaptic cleft)의 마그네슘 농도이다.

AMPA 수용체에서 흐르는 전류는 NMDA 수용체에서 흐르는 전류와 마찬가지로 표기될 수 있다[Destexhe *et al.* 1998]. 신경전달물질이 수용체와 결합하면 채널이 열려 전류가 발생한다. 단 AMPA 수용체는 NMDA 수용체의 채널처럼 마그네슘으로 막혀있지 않아서 마그네슘 변수는 포함되지 않는다.

$$I_{AMPA}(t) = \bar{g}_{AMPA} r (V - V_{AMPA}) \quad (3.20)$$

\bar{g}_{NMDA} 는 AMPA 수용체의 컨덕턴스이고, V_{AMPA} 은 AMPA 수용체의 평형전위 (equilibrium potential)이다. r 과 V 는 3.19식과 동일하다.

칼슘이온의 유입량은 NMDA 수용체에 흐르는 전류량에 따라 결정된다(식 3.17). 이는 NMDA 채널의 상태에 따라 칼슘이온이 유입될 수 있는 정도가 달라질 수 있음을 시사한다. LTP를 유도할 정도의 강한 자극은 NMDA 수용체를 활성화시키기 때문에, NMDA 채널은 신경전달물질의 결합정도에 따라 칼슘이온 유입량이 결정된다. NMDA를 비롯하여 이온채널의 열림 여부와 컨덕턴스 변화는 수용체의 전류량에 적지 않은 영향을 미친다.

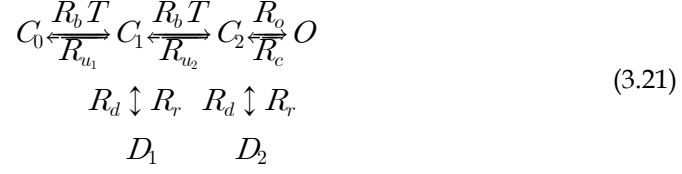
2) 이온채널과 시냅스전 신호

이온채널은 Hodgkin-Huxley에 의해 처음 그 모델이 소개되었다. 이온 채널은 휴지 막전위 상태에서는 닫혀 있고, 시냅스전로부터 신경전달물질이 방출되어 시냅스후 수용체와 결합하면 채널이 활성화되어 열리게 된다. 그 모식도는 다음과 같다.



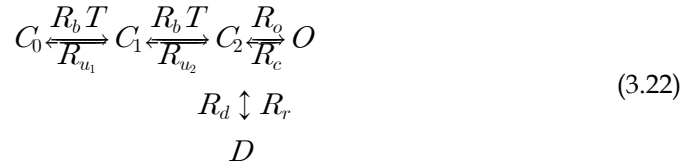
채널이 닫혀있는 상태(C)에서 신경전달물질이 결합하면 채널이 열린다(O). $r_1(V)$ 와 $r_2(V)$ 는 각각 열린 상태와 닫힌 상태로 진행되는 비율이다. 그러나 실제 AMPA 수용체나 NMDA 수용체 채널이 열리는 과정은 Hodgkin-Huxley가 제시한 모델보다 훨씬 복잡하다.

AMPA 수용체의 경우 다음과 같은 과정을 거쳐 채널이 열린다[Destexhe *et al.* 1998].



신경전달물질(T)이 수용체와 결합하지 않은 상태인 C_0 는 한 분자의 신경전달물질이 결합함으로써 C_1 상태가 된다. 여기에 또 한 분자의 신경전달물질이 더 결합된 C_2 상태가 되어야 비로소 AMPA 수용체가 열리게 된다(O). 신경전달물질은 R_b 의 비율로 수용체와 결합하고, R_{u_1} , R_{u_2} 의 비율로 해리된다. C_1 과 C_2 상태에서 AMPA 수용체가 비활성상태(D_1 , D_2)로 될 경우도 있다. 이때 비활성상태로 되는 비율은 R_d 이고, 비활성상태에서 활성상태로 될 경우는 R_r 이다. C_2 상태에서 채널이 열릴 비율은 R_o 이고, 다시 닫힐 비율은 R_c 이다.

NMDA 수용체의 이온채널도 AMPA 수용체 채널과 같이 다음과정을 따른다 [Destexhe *et al.* 1998].



신경전달물질 T 는 R_b 의 비율로 수용체와 결합하고, R_{u_1} 의 비율로 해리된다. C_2 상태에서는 NMDA 수용체가 비활성상태(D)로 될 경우도 있다. 비활성상태로 되는 비율은 R_d 이고, 비활성상태에서 활성상태로 되는 비율은 R_r 이다. C_2 상태에서 채널이 열릴 비율은 R_o 이고, 다시 닫힐 비율은 R_c 이다.

3.21과 3.22의 모식도에서 보면 수용체 채널이 열리는 비율은 채널 상태에 따라 다양하게 변하지만, 본 AMPA 어셈블리 모델에서는 채널이 열리는 변수를 다음과 같이 정의한다(식3.18, 3.20)[Destexhe *et al.* 1998].



$$\frac{dr}{dt} = \alpha x(t)(1 - r) - \beta r \tag{3.34}$$

채널이 닫혀있는 상태에(C) 신경전달물질(T)이 결합하면 채널이 열려서(O) 채널

의 컨덕턴스가 증가한다. r 은 채널이 열려있는 비율이고, a 와 β 는 각각 채널이 열리는 비율과 닫히는 비율이다. x 는 신경전달물질이 시냅스전 말단에서 수용체까지 도달하는 분포를 의미한다[Feng *et al.* 2001]. 신경전달물질이 수용체에 전달되는 시간이 무시할 수 있을 정도의 짧은 시간이고, 동일한 양이 방출된다고 가정하면, 신경전달물질은 시냅스전에 주어지는 자극 빈도에 비례하여 수용체와 결합하게 된다. 일정 시간 동안 자극이 주어지는 횟수와 동일한 양의 신경전달물질이 방출되어 시냅스후의 수용체와 반응한다.

시냅스 관점에서 AMPA 수용체 어셈블리 과정을 규명하고자 할 때, 시냅스전에서 주어지는 자극은 신경전달물질을 통해 입력된다고 할 수 있다. 신경전달물질과 결합하여 활성화된 수용체는 이온물질들을 투과시키는데, 이 과정을 통해 수용체의 기능이 향상된다. 신경전달물질은 수용체를 인식하여 그 종류에 따라 특정 수용체와 결합한다. 이 결합은 기질과 수용체간에 특수한 결합법칙이 작용하여 신경전달물질은 정해진 수용체하고만 결합한다. 이는 수용체 채널이 열리도록 자극하여 이온물질이 통과하도록 하는데, 해마 CA3-CA1 뉴런의 흥분성 시냅스에서는 NMDA 수용체와 AMPA 수용체가 신경전달물질인 글루타메이트의 작용에 따라 그 역할이 조절된다.

수용체와 결합하는 신경전달물질은 시냅스전를 통해 시냅스후 막으로 신호를 전달하는 매체이다. 수용체와 결합하는 신경전달물질의 양은 시냅스전를 통해 전달되는 자극의 세기와 빈도에 따라 그 양이 조절된다. 신경전달물질의 농도가 시냅스전 자극과 비례적인 상관관계를 갖고 있다고 가정하면, 신경전달물질의 농도가 높아질수록 수용체와 결합할 수 있는 경우의 수가 많아지게 되어 채널이 열리는 확률이 높아진다. 따라서 채널이 열리는 확률은 시냅스전에서 전달되는 자극에 대해 비례적 상관관계라고 가정할 수 있다.

3.3 AMPA 수용체 활성화

시냅스 활성화가 시냅스후 세포막 상에 존재하는 글루타메이트 수용체의 개

수를 조정하고 LTP에 기여한다는 가설은 이미 1989년에 Lynch와 Baudry가 제시하였다[Lynch and Baudry 1989]. 시냅스 활성화는 그 기능을 하지 못하는 수용체가 있는 경우에 보다 더 잘 관찰될 수 있는데, 이러한 시냅스를 휴지 시냅스(silent synapse)라 한다. 휴지시냅스에서 기능을 못하는 수용체는 LTP 유도과 함께 그 기능이 증대된다. 휴지 시냅스의 발견이후 LTP를 유도하는 기작이 밝혀지게 되었다.

휴지시냅스에 AMPA 수용체를 삽입하는 과정은 LTP를 유도하는 데에 중요한 기능을 한다고 알려져 있다. 휴지시냅스는 수용체가 존재하지만, 시냅스 전도에 있어서 그 기능을 발휘하지 못하는 시냅스를 뜻하며, LTP 유도 이후에 새로운 수용체가 삽입되어 휴지시냅스가 시냅스전 자극에 대한 반응을 하게 된다. CaMKII의 자동인산화 과정은 기존의 AMPA 수용체 기능을 증진시키기도 하지만 새로운 AMPA 수용체를 시냅스후막에 삽입하기도 한다. 이는 결국 AMPA 수용체의 컨덕턴스 증가효과를 가져다주어 LTP 생성 요건으로 작용한다.

칼슘신호전달 과정과 AMPA 수용체의 어셈블리가 LTP를 생성하는 데에 기여하는 정도를 알아보기 위해서는 3.1절에서 살펴본 AMPA 수용체의 활성화 정도와 3.2절에서 알아본 AMPA 수용체 전류량의 변화간의 관계를 이해해야 한다. AMPA 수용체의 기능 및 구조는 칼슘신호전달 과정동안 다양한 효소의 영향을 받아 조절된다. I_{AMPA} 의 값을 통해 그 변동을 확인 할 수 있는데, 이는 곧 NMDA 채널을 통해 유도된 LTP가 AMPA 수용체 기능의 향상으로 지속될 수 있다는 가능성을 뜻한다. 따라서 시냅스후 칼슘신호전달 기작에 따른 AMPA 수용체의 컨덕턴스에 미치는 영향을 측정하기 위해서는 AMPA 수용체 활성화 정도와 컨덕턴스의 관계를 규명하여야 한다.

AMPA 수용체의 활성화에 다양한 효소와 기질이 작용하지만, CaMKII의 역할이 AMPA 수용체 어셈블리에 결정적이라고 알려져 있다[Derkach *et al.* 1999; Lisman and Zhabotinsky 2001; Lisman *et al.* 2002]. 자동인산화된 CaMKII가 AMPA 수용체의 GluR1 기본유닛을 인산화하면 채널의 기능이 향상된다[Barria *et al.* 1997]. 활성화된 CaMKII를 AMPA 수용체에 노출시켰을 경우 그렇지 않았을 경우에 비해 AMPA 채널의 컨덕턴스가 50%이상 증가한다. LTP를 유도하

는 과정에서 AMPA 수용체의 컨덕턴스 증가는 LTP의 정도를 결정하는 중요한 요소로 알려져 있다[Lisman *et al.* 2002].

이러한 연구 결과에 근거하여 다음과 같은 관계식을 유도할 수 있다. 시냅스 후 신호전달 과정 중 활성화된 AMPA 수용체의 농도는 수상돌기가시 내부에서 발생하는 생화학적 반응의 결과이다. 활성화된 AMPA 수용체는 CaMKII에 의해 컨덕턴스가 증가하고, 그 기능이 향상된다. CaMKII의 인산화 작용으로 인해 새로운 AMPA 수용체가 생성되기도 한다. 결국 시냅스전의 임펄스에 대한 시냅스후의 반응으로 시냅스후 막의 전체 AMPA 수용체 전류량이 증가하며, 이는 향상된 AMPA 수용체 컨덕턴스를 이용하여 식으로 표현될 수 있다.

$$I_{AMPA}(t) = \bar{g}_{AMPA}(r + AR^*)(V - V_{AMPA}) \quad (3.35)$$

AMPA 자동인산화에 의해 활성화된 AMPA 수용체는 그렇지 못한 AMPA 수용체에 비해 74%정도 높은 컨덕턴스 비율을 보인다고 알려져 있다[Derkach *et al.* 1999].

지금까지 살펴본 칼슘신호전달과정과 AMPA의 활성화 정도 등에 입각하여 LTP가 생성되는 여부를 확인해본다. 또한 CaMKII이나 AMPA 수용체의 기능 장애가 생길 경우 나타나는 현상을 알아보겠다.

IV. 실험 및 결과

칼슘이온 유입과 시냅스후 조절작용에 따른 AMPA 어셈블리 과정의 변화 양상을 알아본다. AMPA 수용체 활성화에 주로 작용하는 CaMKII의 활성화 정도와 AMPA 수용체의 활성화 단계를 비교해봄으로써 AMPA 수용체에 대한 CaMKII의 자동인산화작용 확인할 수 있다. AMPA 수용체의 활성화는 주로 CaMKII의 영향을 받아 상태 변이를 보이므로 CaMKII의 활성화 정도와 AMPA 수용체 컨덕턴스의 변화 양상을 비교해 볼 수 있다. CaMKII의 역할과 AMPA 수용체의 컨덕턴스 증가는 LTP 생성에 결정적인 작용을 하므로 LTP 유도과 CaMKII, AMPA 수용체의 연관성도 알아 볼 수 있다.

AMPA 수용체의 어셈블리 과정 중 특정 효소나 수용체에 문제가 생겨서 그 기능을 발휘하지 못하는 경우 LTP 생성에 영향을 미칠 수 있다. 특히 CaMKII는 LTP 생성에 결정적인 역할을 한다고 알려져 있는 물질이므로 AMPA 수용체의 GluR1 기본유닛이 봉쇄되었을 경우와 CaMKII의 자동인산화 과정에 문제가 생겼을 경우의 LTP 생성 양상을 알아본다.

4.1 LTP 생성 조건

LTP의 생성 및 유지는 수상돌기가 내의 생화학적인 조절 기작과 다양한 신호전달 과정을 통해 이루어진다. 앞에서 살펴본 NMDA 수용체를 거쳐 유입된 칼슘이온의 신호전달기작은 AMPA 수용체의 어셈블리 과정을 초기화한다. AMPA 수용체 어셈블리 과정을 통해 시냅스가 활성화 된다. 지금부터 AMPA 수용체의 어셈블리 과정을 유발하기 위해서 선행되어야 하는 조건들을 알아본다.

1) LTP 유도

LTP는 일시적인 두 단계의 국면을 갖는다. 이는 E-LTP (early LTP)와 L-LTP (late LTP)인데, E-LTP 단계는 100-Hz 정도의 높은 빈도 자극(HFS; high-frequency stimulation)이 주어지는 LTP 초기화 과정 후 나타나며[Johnston and Wu 1995; Woo and Nguyen 2002], 시냅스후의 증가한 칼슘이온이 CaMKII와 PKC와 같은 단백질 인산화효소를 활성화하는 과정을 수반한다[Woo and Nguyen 2002]. L-LTP는 100-Hz 정도의 높은 빈도 자극이 여러 횟수에 걸쳐 주어지면 나타나는 현상으로 몇 시간동안 지속된다. E-LTP와는 달리 cAMP에 의한 PKA 활성화와 MAPK의 활성화 및 MAPK에 의한 유전자 전사(transcription) 작용, 단백질 합성 등이 L-LTP 유지에 필수적이다.

NMDA 수용체를 통한 LTP를 초기화하기 위해서는 높은 빈도의 강한 자극을 가한다. 100Hz 정도의 자극을 가하고, LTP를 생성하기 위해 처음 자극을 가한 시점에서 일정 시간 뒤에 또 다른 자극을 가한다. 두 번째 자극을 가함으로써 LTP를 유발할 수 있다.

2) 시냅스전 자극

100-Hz 정도의 자극이 시냅스전에 주어지면 칼슘이온의 유입과 더불어 E-LTP를 상태를 유도할 수 있는 기작이 시작된다. 신경전달물질의 방출 빈도와 양은 시냅스전에 주어지는 임펄스 자극에 비례하여 전달된다는 가정을 하였으므로 그 방출 분포는 시냅스전에 주어지는 자극의 빈도 및 크기와 상관관계를 갖는다. 이 분포는 신경전달물질과 결합하는 수용체의 채널 활성화와 채널이 열려있는 시간에 영향을 미친다. 따라서 신경전달물질 시냅스전 자극에 따라 방출되는 분포는 시냅스후 조절과 AMPA 수용체 어셈블리 과정에 대한 입력이라 할 수 있다.(식 3.34). 신경전달물질은 다음과 같은 분포를 따라 수용체와 결합한다. x 로 정의되는 신경전달물질의 방출 패턴은 특정 시간에 가해지는 스파이크의 분포

를 따르게 된다(그림 4.1, 4.2).

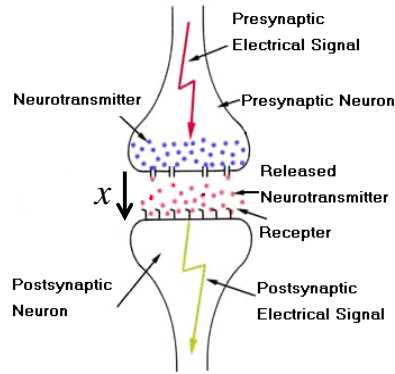


그림 4.1 시냅스전의 신경전달물질의 방출 확산 모식도

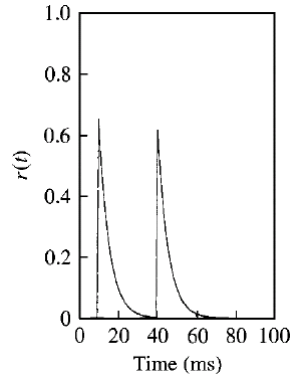


그림 4.2 시간에 따른 자극입력 신호

4.2 CaMKII 및 AMPA 수용체 활성화

AMPA 수용체를 활성화 하고 LTP를 유도하는 데에 주된 역할을 하는 CaMKII는 이미 많은 학자들에 의해 그 기능이 확인되었다[Lisman et al. 2002]. AMPA 수용체 기본유닛인 GluR1은 CaMKII에 의해 Ser831 (Serine831)부위가 인산화 된다. AMPA 수용체 인산화가 일어나지 않을 경우엔 낮은 컨덕턴스를 보이지만, GluR1부위에 활성화된 CaMKII을 노출시키면 50%이상 컨덕턴스가 증가한다[Lisman et al. 2002]. GluR1의 Ser831 인산화 작용은 LTP 유도 이후에 AMPA 채널의 컨덕턴스를 증가시키고 그 기능을 향상시키는 역할을 한다. 따라서 이러한 CaMKII의 기능은 LTP를 설명하는 주요 요소로 간주된다.

1) 칼슘-칼모듈린과 CaMKII의 활성화 관계

NMDA 수용체를 통해 수상돌기가 내로 유입된 급격한 양의 칼슘이온에

의해 칼슘-칼모듈린 활성이 일어난다(그림 3.1). 칼슘이온과 결합하여 활성을 갖게 되는 칼슘-칼모듈린 결합체는 CaMKII을 K' 단계로 활성화한다. 자동인산화 단계인 K*단계에서는 칼슘-칼모듈린 결합체의 영향 없이 CaMKII이 독자적으로 인산화를 시행한다[Giese *et al.* 1998]. 이 단계의 활성정도가 AMPA 수용체의 GluR1의 인산화를 결정한다고 알려져 있다[Lisman and Zhabotinsky 2001; Lisman *et al.* 2002]. CaMKII의 활성정도는 칼슘이온의 유입에 따라 결정되므로 칼슘이온 유입에 따른 CaMKII의 활성화 정도를 알아볼 수 있다.

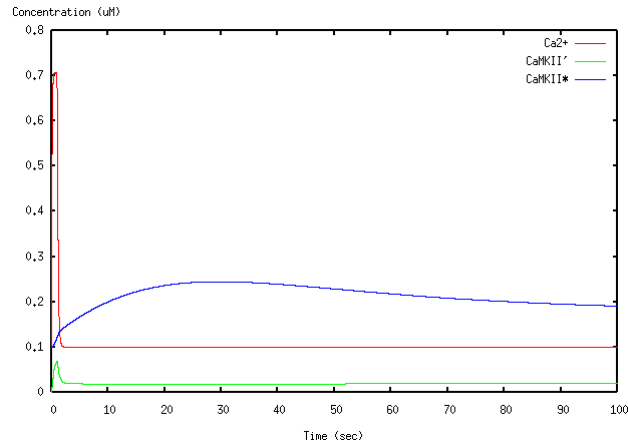


그림 4.3 칼슘이온과 CaMKII의 활성 정도

그림 4.3에서 보면 알 수 있듯이 CaMKII의 K'는 칼슘-칼모듈린 결합체의 활성 정도와 비슷한 추이를 보인다. 그러나 CaMKII의 K*는 칼슘-칼모듈린 결합체보다 더 오랜 시간동안 그 활성을 보인다. 이는 CaMKII은 칼슘이온과 칼슘-칼모듈린 결합체에 의해 활성이 생기면 더 이상 칼슘이온이 없어도 일정 시간동안 활성을 지속한다는 점을 의미한다. 즉, CaMKII의 자동인산화 과정이 칼슘-칼모듈린과 독립적으로 발생한다는 점을 시사하며, 그 활성을 지속하면서 AMPA 수용체 활성화에 영향을 끼친다는 것을 짐작할 수 있다.

2) AMPA 수용체의 활성화

AMPA 수용체 어셈블리 모델에서 대부분의 물질들이 AMPA 수용체의 활성 조절에 관여한다(그림 3.1). 그러나 최근 연구에 따르면 CaMKII의 자동인산화 작용이 결여되면 AMPA 수용체 활성이 현저하게 떨어지는 것을 알 수 있다 [Barria *et al.* 1997; Derkach *et al.* 1999; Benke *et al.* 1998]. CaMKII의 자동인산화 작용으로 증가하는 AMPA 수용체 채널의 컨덕턴스는 대략 74%에서 76% 정도이며, AMPA 수용체에 흐르는 전류가 20%이상 증가한다고 알려져 있다 [Derkach *et al.* 1999]. 따라서 CaMKII의 자동인산화 정도에 따른 AMPA 수용체의 활성정도를 알아보고 칼슘이온 유입에 따른 AMPA 수용체의 활성 과정을 살펴본다.

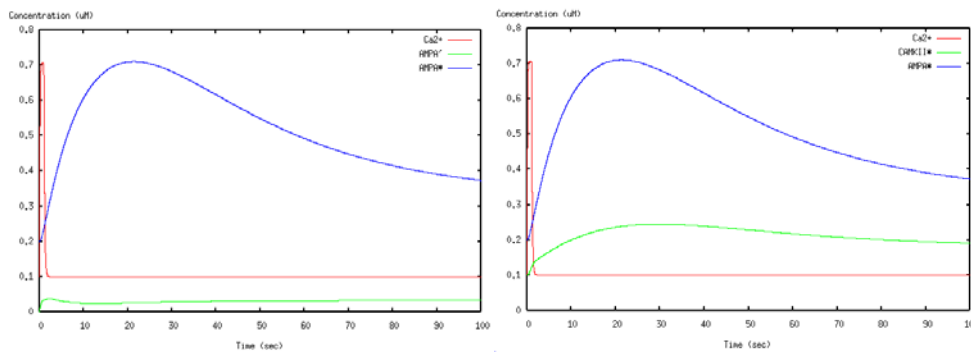


그림 4.4 AMPA 수용체의 활성 정도 그림 4.5 자동인산화 단계의 CaMKII와 AMPA 수용체의 활성 정도 비교

그림 4.4에서는 AMPA 수용체의 활성과정을 살펴보았다. 급격한 자극에 대한 AMPA 수용체의 활성변화는 단계에 따라 다른 양상을 보였다. 첫 활성 단계인 AR'단계는 칼슘이온 유입과 함께 급격한 증가추세를 보인다. 그러나 시간이 얼마 지나자 그 활성 정도가 초기에 주어진 기본 값으로 떨어짐을 알 수 있다. 반면 두 번째 활성단계인 AR*은 AR'에 비해 서서히 증가하는 것을 알 수 있다. AR' 상태에서 AR*상태로 전이하는 동안 CaMKII의 영향을 받았음을 짐작할 수 있는 패턴을 보여주고 있다. 이를 그림 4.5에서 확인할 수 있는데, 여기서 AMPA 수용체의 AR*활성 단계와 CaMKII의 자동인산화 상태인 K*가 유사한

증가 추세를 보이는 것을 확인할 수 있다. AMPA 수용체의 AR*나 CaMKII의 K*는 시간이 지남에 따라 점차 일정 양의 농도에 수렴하는 것을 알 수 있다.

3) CaMKII 및 AMPA 수용체의 기능장애

CaMKII이나 AMPA 수용체 기능에 장애가 생겼을 경우 LTP에 어떤 영향을 미치는지 AMPA 어셈블리 모델을 통해 알아본다.

(1) CaMKII Thr286 돌연변이

CaMKII가 봉쇄되었을 때나 약물 처리하여 그 기능을 하지 못하게 하면 LTP가 감소하는 경향을 알 수 있다[Lisman and Zhabotinsky 2001]. CaMKII의 Thr286을 알라닌(T286A)으로 대체하면 CaMKII^{T286A}는 칼슘-칼모듈린에 대해 독립적으로 활성이 이루어지는 자동인산화 단계로 전환하지 못한다[Giese *et al.* 1998]. CaMKII이 칼슘-칼모듈린에 의해 초기 활성을 띄게 되어 그림 3.1에서와 같이 K'상태로 전환되지만, CaMKII^{Thr286}의 자동인산화 상태인 K*은 칼슘-칼모듈린의 활성 작용과 독립적으로 일어난다. CaMKII^{Thr286}의 자동인산화는 LTP 생성과 학습에 영향을 미친다고 알려져 있다. CaMKII의 Thr286이 T286A으로 대체되면 CA1 부분의 시냅스 연결에 영향을 미치지 못하며 변형된 CaMKII을 내재하고 있는 신경세포는 LTP를 생성하지 못하게 된다.

CaMKII^{T286A} 처리를 한 신경세포에서 발생하는 LTP를 관찰한 결과 NMDA 수용체를 거쳐 발생하는 LTP는 발견되지 않았다[Giese *et al.* 1998]. Thr286부분에서의 CaMKII 자동인산화는 NMDA 수용체의 채널이 열리는 확률을 감소시키는 작용을 하는 칼슘-칼모듈린이 기능을 하지 못하도록 한다. 따라서 CaMKII의 Thr286부분 돌연변이는 칼슘-칼모듈린을 제재하지 못하게 되어 비정상적인 NMDA 수용체 전류 감소를 유발한다[Giese *et al.* 1998].

AMPA 수용체 어셈블리 과정에서 CaMKII의 자동인산화는 그림 3.1에서 k_3

반응 비율로 표기되었다. CaMKII의 자동인산화가 일어나는 Thr286이 다른 아미노산으로 대체되어 그 기능을 하지 못하는 경우 AMPA 수용체의 기본유닛인 GluR1의 Ser831부분에서 활성화 과정이 활발히 일어날 수 없다. CaMKII의 Thr286 부분이 처리되어 자동인산화 과정이 정상적으로 일어나지 못하는 경우의 CaMKII의 활성화 상태를 알아본다.

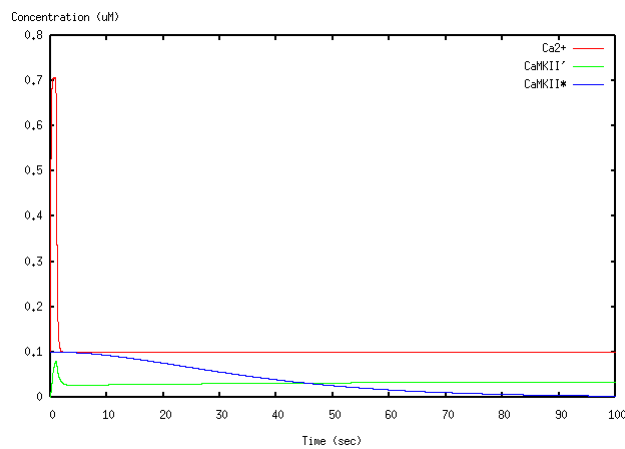


그림 4.6 CaMKII의 Thr286부분 이상으로 인한 비정상적인 자동인산화 과정

그림 4.6에서 알 수 있듯이 CaMKII의 자동인산화 과정이 봉쇄되면 정상적인 활성화 패턴에 비해 활성화 정도가 급격하게 떨어짐을 알 수 있다. CaMKII의 자동인산화가 일어나지 않는 과정을 식 3.9에서 k_3 값을 0으로 변환하여 실행하였다.

(2) CaMKII의 기능장애로 인한 AMPA 수용체의 활성화 억제

CaMKII의 Thr286부분의 돌연변이로 인해 자동인산화 단계가 일어나지 못하면 AMPA 수용체의 활성화에도 영향을 미치게 된다. AMPA 수용체의 기본유닛인 GluR1의 Ser831부분은 CaMKII에 의해 인산화되기 때문에 K^+ 상태가 적절치 못하면 AR^* 에도 영향을 끼치게 된다.

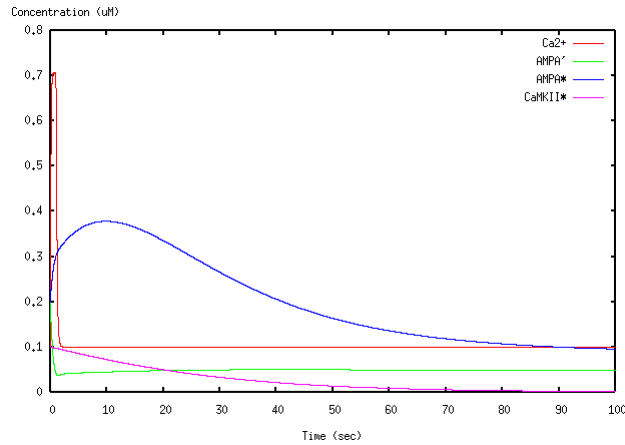


그림 4.7 CaMKII의 Thr286부분의 돌연변이로 인한 AMPA 수용체 활성의 변화

그림 4.7에서는 CaMKII의 Thr286부분의 돌연변이로 인해 나타나는 AMPA 수용체의 활성상태를 보여준다. CaMKII의 자동인산화 상태인 K*의 기능이 상쇠 되었을 경우 AMPA 수용체의 최종 활성 단계인 AR*의 활성이 정상적으로 나타나지 않는다. 이는 곧 앞에서 살펴보았던 CaMKII의 인산화가 AMPA 수용체 활성화에 필수적으로 작용함을 뜻한다. 그림 4.7을 통해 CaMKII의 K*와 AMPA 수용체의 AR*의 상관관계를 더욱 잘 알 수 있다.

4.3 LTP와 CaMKII 및 AMPA 수용체의 역할

CaMKII의 자동인산화 및 AMPA 수용체의 활성화로 인한 LTP의 생성 여부는 AMPA 수용체의 증가된 전류량으로 확인할 수 있다. AMPA 수용체의 활성화 과정으로 인해 시냅스후 막에 새로운 AMPA 수용체가 삽입되고, 기존의 AMPA 수용체의 기능이 향상되는 과정이 AMPA 수용체에 흐르는 전류량의 증가로 표상된다.

AMPA 수용체의 전류량인 I_{AMPA} 는 AMPA 수용체의 컨덕턴스와 채널의 열림 비율, 시냅스후 막전위차의 곱으로 이루어져 있다(식 3.20). AMPA 수용체의 활성 정도로 인해 증가하는 전류량을 측정하기 위해서 AR^* 의 값을 도입한다(식 3.35). AMPA 수용체의 활성 정도를 나타내는 AR^* 값은 1미만의 값을 갖는다. AMPA 수용체의 활성정도를 측정하기 위해 AMPA 수용체 전체 초기값을 1로 주었는데, 이는 초기값 1에 대한 AMPA 수용체 활성 정도를 퍼센트로 확인하기 위함이었다. 따라서 AMPA 수용체의 AR^* 의 활성 정도 측정값은 AMPA 수용체의 활성 정도를 백분율로 반영하고 있다.

AMPA 수용체의 활성으로 인해 결과적으로 I_{AMPA} 의 값이 증가하게 된다. 이는 r 에 AR^* 을 더해줌으로써 설명할 수 있다. AR^* 을 r 에 부가하는 효과는 시냅스전를 통해 전달되는 임펄스 값을 버퍼링하는 것이고, LTP 초기화 후 다른 자극을 주었을 때 LTP가 생성되도록 유도하는 요소로 작용하도록 하는 것이다. 이는 아래 그림을 통해 확인할 수 있다.

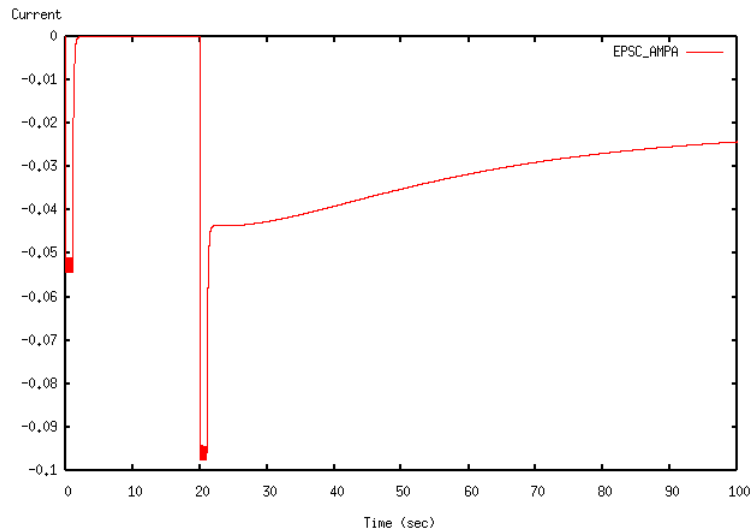


그림 4.8 LTP 생성과 I_{AMPA}

그림 4.8은 LTP를 초기화 하는 자극(100Hz)을 0sec에 준 후 AMPA 수용체 어셈블리 과정이 진행되는 동안 또 한번의 자극을 주었을 때의 I_{AMPA} 의 변화 추

이를 보여준다. NMDA 수용체를 통해 전해지는 자극 형태는 NMDA 채널이 열리는 시간이나 활성정도를 반영하지 못한다. 따라서 I_{NMDA} 의 패턴은 자극이 없으면 0값을 갖는다. I_{AMPA} 의 변화 패턴도 마찬가지로 변한다. 그러나 I_{AMPA} 는 AMPA 수용체가 활성을 띠게 되면 AMPA 수용체에 흐르는 전류 값에 영향을 미치기 때문에 그림 4.8과 같은 양상은 보인다.

LTP 생성에 있어서 CaMKII의 자동인산화 역할을 알아보겠다. 앞에서 언급한 바와 같이 CaMKII은 LTP 유발에 있어 결정적인 작용을 한다고 알려져 있다. CaMKII의 Thr286부분이 변이되어 자동인산화 기능을 하지 못할 경우 CaMKII의 기능장애가 LTP 생성에 미치는 영향을 살펴본다.

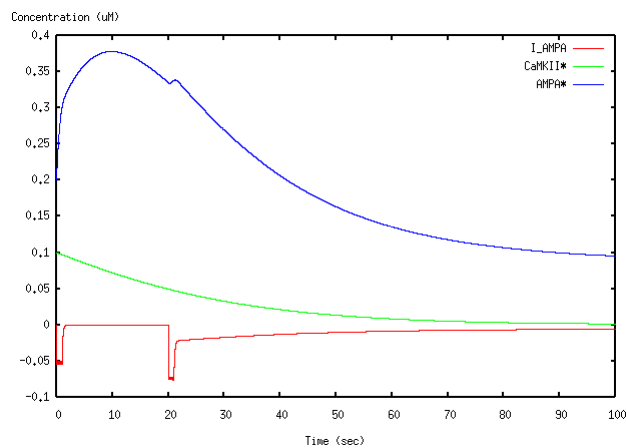


그림 4.9 LTP 생성과 CaMKII의 역할

그림 4.9에서 볼 수 있듯이 자동인산화 기능을 하지 못하는 CaMKII은 LTP 생성을 정상적으로 수행하지 못하는 것을 확인할 수 있다. 여러 실험 결과를 통해 밝혀진 CaMKII의 자동인산화 기작과 LTP의 상관관계를 AMPA 수용체 어셈블리 모델을 통해 살펴볼 수 있다.

표 4.1 상수 값

상수	값(단위)	상수	값(단위)
n_H	4	CaM_{tot}	$30\mu M$
K_d	$7\mu M$	K_{tot}	$0.5\mu M$
k_1	$0.15\mu M^{-1}ms^{-1}$	CaN_{tot}	$1.0\mu M$
k_2	$2.17\times 10^{-3}ms^{-1}$	D_{tot}	$3.0\mu M$
k_3	$0.5\times 10^{-3}ms^{-1}$	P_{tot}	$1.8\mu M$
k_4	$0.3\times 10^{-4}\mu M^{-1}ms^{-1}$	PKA_{tot}	$0.25\mu M$
n_1	$1.67\mu M^{-1}ms^{-1}$	AR_{tot}	$1.0\mu M$
n_2	$1.0\times 10^{-2}ms^{-1}$	$[Ca^{2+}]_{min}$	$0.1\mu M$
p_1	$0.3\times 10^{-4}ms^{-1}$	τ_{Ca}	50ms
p_2	$0.3\times 10^{-1}\mu M^{-1}ms^{-1}$	\bar{g}_{NMDA}	-0.2×10^{-2}
d_1	$2.0\mu M^{-1}ms^{-1}$	V	-65mV
d_2	$0.5\times 10^{-3}ms^{-1}$	V_r	130mV
p_{a1}	$1.0\times 10^{-3}\mu M^{-1}ms^{-1}$	α_{NMDA}	$7.2\times 10^{-5}\mu M^{-1}ms^{-1}$
p_{a2}	$0.6\times 10^{-1}ms^{-1}$	β_{NMDA}	$6.6\times 10^{-3}ms^{-1}$
a_1	$0.25\times 10^{-1}ms^{-1}$	\bar{g}_{AMPA}	0.1×10^{-2}
a_2	$1.0\times 10^{-3}ms^{-1}$	E_{AMPA}	0mV
a_3	$1.0\times 10^{-2}ms^{-1}$	α_{AMPA}	$1.1\times 10^{-3}\mu M^{-1}ms^{-1}$
a_4	$1.0\times 10^{-4}ms^{-1}$	β_{AMPA}	$1.9\times 10^{-1}ms^{-1}$

V. 결론

시냅스전 말단을 통해 자극이 전달되어 시냅스후에서 일어나는 다양한 변화로는 세포의 특수화 (cellular specialization), 생체분자들 간의 상호작용을 통한 밀집화 및 구획화가 알려져 있다. 이러한 과정들은 신경계에서 복잡한 세포 기관이 형성되도록 유도하고, 개체의 성장 및 학습을 가능하게 한다. 신경세포를 연결하는 시냅스의 구조변형 또한 신호전달 과정의 일환으로 다양한 생리학적 반응 과정을 수반한다.

해마 CA1-CA3 신경세포의 신호전달과정에 있어서 시냅스의 활성 조절 및 변형은 외부 혹은 내부 신호에 대한 반응 작용이다. LTP는 대표적인 시냅스 가소성의 표상으로 생물학적으로 규명되는 학습과 기억형성의 기본 개념이다. 흥분성 글루타메이트 시냅스에서 발견할 수 있는 AMPA 수용체 어셈블리 과정은 세포의 신호전달 반응에 대해 시냅스 활성을 표방하는 일례이다. LTP를 초기화할 수 있는 강한 자극을 입력으로 시작하여 칼슘이온을 매개로하는 생화학적 신호전달 반응 과정은 궁극적으로 시냅스의 강도를 조절하는 기작이기도 하다. 본 논문에서 제시하는 AMPA 수용체 어셈블리 모델을 통해 유발된 LTP 현상은 신호 전달과 시냅스 활성에 대한 반응 현상으로서 시냅스 가소성의 한 형태이다.

본 글에서는 시냅스 가소성의 한 형태인 LTP 현상을 외부 자극 신호에서부터 수상돌기가 내의 화학적 반응기작과 이를 반영하는 시냅스후 막의 전류변화 감지를 통해 전기생리학적이고 화학적인 시냅스의 신호전달 특성을 통합해서 제시하였다. 해마 CA1-CA3의 흥분성 글루타메이트 시냅스에서 AMPA 수용체의 어셈블리는 다양한 효소와 기질 반응 기작에 의해 이루어진다. 우선 시냅스전에서 전달된 자극이 NMDA 채널을 통해 주어지면 수상돌기가 내부로 급격한 양의 칼슘이온 유입이 일어난다. 칼슘이온의 급격한 유입은 LTP를 초기화하는 과정이며, AMPA 수용체의 활성을 촉진하는 매개이다. AMPA 수용체의

활성화를 통해 진행되는 AMPA 수용체의 어셈블리 과정은 궁극적으로 시냅스 활성을 촉진하여 LTP를 생성하고 효율적인 시냅스 전도를 꾀한다.

AMPA 수용체 어셈블리 모델을 이용해서 어셈블리 반응에 관여하는 기질과 효소 간의 활성 정도를 알아볼 수 있다. 칼슘-칼모듈린 결합체의 활성반응과 CaMKII의 연관성을 알아본 결과 CaMKII의 Thr286부분 자동인산화는 칼슘-칼모듈린 결합체의 반응과는 독립적으로 발생한다는 사실을 확인할 수 있었다. 또한 CaMKII의 비정상적인 자동인산화 기작이 AMPA 수용체 활성화에 미치는 영향을 알아봄으로써 CaMKII가 AMPA 수용체 활성화와 LTP 생성에 필수적으로 작용한다는 점을 살펴볼 수 있다. AMPA 어셈블리 모델에서 살펴보았던 AMPA 수용체의 활성화는 결국 소마(soma)로 전달되는 전기적 신호로 전환된다. 또한 LTP 생성에 있어서 CaMKII의 역할을 확인할 수 있었는데, 이는 CaMKII가 AMPA 수용체를 활성화시키는 생화학적 반응 작용이 LTP 유발에 필수적임을 뜻한다고 해석할 수 있다.

이와 같이 기존의 연구와는 다르게 전기적 신호와 시냅스후 막 안에서 일어나는 생화학 반응의 전환을 도모한 점이 본 연구의 의의라 하겠다. AMPA 수용체의 어셈블리 모델을 이용해서 다양한 효소와 기질 반응 기작을 재연할 수 있고, 그 활성 정도를 파악할 수 있다. 효소의 활성 정도는 그 기능을 가늠하는 척도로 사용되기 때문에 실험을 수행하기 전에 미리 예상해 볼 수 있는 기준이 된다. 또한 전기적 신호에 대한 화학반응의 결과를 예측할 수도 있다.

그러나 그림 3.1에서 제시한 칼슘 신호전달 반응 경로 및 AMPA 수용체 활성화 경로 모델은 실제 기질과 효소의 반응식을 완전히 반영하지는 못했다. 수식의 복잡성과 서로 다른 실험 조건의 연구 결과에서 반응상수를 찾기가 어려워 많은 부분의 반응 작용을 단순화해야 했다. 실제 AMPA 수용체에 관여하는 물질도 AMPA 수용체 어셈블리 모델에서 사용한 것보다 많다. 따라서 보다 정교한 화학반응식을 도입하면 실제 신경세포 내에서 일어나는 생화학 반응 기작을 더 잘 모델링 할 수 있을 것이다. 본 논문에서 사용한 효소와 기질 외에도 AMPA 수용체 어셈블리 과정에 참여하는 물질을 수식화하여 첨가할 수 있기 때문에 보다 다양한 신호전달기작을 설명하는 도구로 사용될 수 있을 것이다.

본 글에서 제시한 AMPA 수용체 어셈블리 모델에 관여하는 효소와 기질들은 기질 특이적으로 활성화 혹은 억제하며 신호전달 과정을 진행한다. AMPA 수용체 어셈블리 반응 물질을 비롯하여 다양한 신호전달 반응 과정들은 세포내로 들어오는 신호를 완충하는 작용을 한다. 효소나 단백질을 통해 전달되는 신호는 세포 내에서 자극의 정도를 완충하거나 증폭하는 등의 여과과정을 거치게 된다. CaMKII의 자동인산화도 피드백 루프를 이루어 시냅스 효율을 높이는 데 기여한다.

신경세포를 포함한 세포의 신호전달기작은 다양한 방법과 과정을 거쳐 형성된다. 비단 중추신경계에서만 아니라 말초신경과 접해있는 근육세포를 통해서도 자극의 전달 및 처리 과정은 일어난다. 학습과 기억 과정 뿐 아니라 개체의 성장에 있어서도 시냅스를 통한 신호전달기작과 그 구조적 변형은 대외 또는 대내적인 적응방법의 일환이라 하겠다. 세포생물학적 관점에서 세포간의 접촉은 시냅스의 구조적인 생리학적·생화학적 청사진이며, 이는 더 나아가 개체의 인격과 역사를 의미한다.

참고문헌

- Barria A., Muller D., Derkach V. Griffith L.C. and Soderling T.R. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaMKII during long-term potentiation. *Science* 276:2042-2045, 1997.
- Benke T.A., Lüthi A., Isaac J.T.R. and Collingridge G.L. Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393:793-797, 1998.
- Bhalla U.S. and Iyengar R. Emergent properties of networks of biological signaling pathways. *Science* 283:381-387, 1999.
- Bliss T.V.P. and Collingridge G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361:31-39, 1993.
- Bliss T.V.P. and Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232:331-356, 1973.
- Cline H.T. Activity-dependent plasticity in the visual systems of frogs and fish. *Trends in Neuroscience* 14:104-111, 1991.
- d'Alcantara P., Schiffmann S.N. and Swillens S. Bidirectional synaptic plasticity as a consequence of interdependent Ca^{2+} -controlled phosphorylation and dephosphorylation pathways. *European Journal of Neuroscience* 17:2521-2528, 2003.
- De Schutter E. and Smolen P. Calcium dynamics in large neuronal models. *Methods in Neuronal Modelling*, Koch C. and Segev I. (eds.), MIT Press, pp. 211-250, 1998.
- Derkach V., Barria A. and Soderling T.R. Ca^{2+} /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of National Academy of Sciences* 96:3269-3274, 1999.
- Destexhe A., Mainen Z.F. and Sejnowski T.J. Synthesis of models for

- excitable membranes, synaptic transmission and Neuromodulation using a common kinetic formation. *The Journal of Computational Neuroscience* 1:196-231, 1994.
- Destexhe A., Mainen Z.F. and Sejnowski T.J. Kinetic models of synaptic transmission. *Methods in Neuronal Modelling*, Koch C. and Segev I. (eds.), MIT Press, pp. 1-26, 1998.
- Engert F. and Bonhoeffer T. Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature* 399:66-70, 1999.
- Feng J., Li G., Brown D. and Buxton H. Balance between four types of synaptic input for the integrate-and-fire model. *Journal of Theoretical Biology* 209:61-73, 2001.
- Giese K.P., Fedorov N.B., Filipkowski R.K. and Silva A.J. Autophosphorylation at Thr286 of the alpha calcium-calmodulin kinase II in LTP and learning. *Science* 279:870-873, 1998.
- Goelet P., Castellucci V.F., Schacher S. and Kandel E.R. The long and short of long-term memory-a molecular framework. *Nature* 323:419-422, 1986.
- Hanson P.I. and Schulman H. Neuronal Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases. *Annual Review of Biochemistry* 61:559-601, 1992.
- Isaac J.T., Crair M.C., Nicoll R.A. and Malenka R.C. Silent synapses during development of thalamocortical inputs. *Neuron* 18:269-280, 1997.
- Isaac J.T., Nicoll R.A. and Malenka R.C. Evidence for silent synapses: implications for the expression of LTP. *Neuron* 15:427-34, 1995.
- Johnston D. and Wu S.M.-S. Foundations of cellular neurophysiology. MIT Press, 1995.
- Kandel E.R. Cellular mechanisms of learning and biological basis of individuality. *Principles of Neuroscience* (4th), Kandel E.R., Schwartz J.H. and Jessell T.M. (eds.), McGraw-Hill, pp.1247-1279, 2000.
- Lisman J.E. and Harris K.M. Quantal analysis and synaptic anatomy-integrate

- two views of hippocampal plasticity. *Trends in Neurosciences* 16:141-147, 1993.
- Lisman J.E. The CaM kinase II hypothesis for the storage of synaptic memory. *Trends in Neurosciences* 17:406-412, 1994.
- Lisman J.E. and Zhabotinsky A.M. A model of synaptic memory: a CaMKII/PP1 switch that potentiates transmission by organizing an AMPA receptor anchoring assembly. *Neuron* 31:191-201, 2001.
- Lisman J.E., Schulman H. and Cline H. The molecular basis of CaMKII function in synaptic and behavioural memory. *Nature Reviews Neuroscience* 3:175-190, 2002.
- Lüscher C., Nicoll R.A., Malenka R.C. and Muller D. Synaptic plasticity and dynamic modulation of the postsynaptic membrane. *Nature Neuroscience* 3:545-550, 2000.
- Lynch G. and Baudry M. The biochemistry of memory: a new and specific hypothesis. *Science* 224: 1057-1063, 1989.
- Mainen Z.F., Malinow R. and Svoboda K. Synaptic calcium transients in single spines indicate that NMDA receptors are not saturated. *Nature* 399:151-155, 1999.
- Malenka R.C. and Nicoll R.A. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in Neurosciences* 16:521-527, 1993.
- Malenka R.C. and Nicoll R.A. Long-term potentiation - A decade of progress? *Science* 285:1870-1874, 1999.
- Malenka R.C. and Siegelbaum S.A. "Synaptic plasticity - diverse targets and mechanisms for regulating synaptic efficacy". *Synapses*, Cowan W.M., Südhof T.C. and Stevens C.F. (Ed), The Johns Hopkins Univ. press, pp. 393-453, 2001
- Malinow R. LTP: desperately seeking resolution. *Science* 266:1195-1196, 1994.

- McGlade-McCulloch E., Yamamoto H., Tan S.-E., Brickey D.A. and Soderling T.R. Phosphorylation and regulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Nature* 362:640-642, 1993.
- Nicoll R.A., and Malenka R.C. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 377:115-118, 1995.
- Sabatini B.L., Oertner T.G. and Svoboda K. The life cycle of Ca²⁺ ions in dendritic spines. *Neuron* 33:439-452, 2002.
- Sheng M. and Kim M.J. Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science* 298:776-780, 2002.
- Shirke A.M. and Malinow R. Mechanisms of potentiation by calcium-calmodulin kinase II of postsynaptic sensitivity in rat hippocampal CA1 neurons. *Journal of Physiology* 78:2682-2692, 1997.

Abstract

As impulses arriving at a presynaptic terminal, the calcium ions in the synaptic cleft are delivered via NMDA receptor channels on postsynaptic membrane. The influx of calcium ions into the dendritic spine undergoes the diverse biochemical signaling pathways. These processes promote AMPA (alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) receptor anchoring assemblies. AMPA receptor anchoring assemblies enhance the function of AMPA receptor channels and induction of LTP (long-term potentiation). Eventually the assembly model of AMPA receptors represents synaptic plasticity of LTP on an excitatory glutamatergic synapse. This model leads to maximize efficacy of synaptic transmission.

The AMPA receptor anchoring assemblies on an excitatory glutamatergic synapse in a hippocampal CA1-CA3 neuron are resulted from dynamic reaction mechanisms between enzymes and substrates in a dendritic spine. The influx of calcium ions via NMDA receptor channels is essential to trigger Thr 286 autophosphorylation of the CaMKII (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II) in the dendritic spine. The key process of biochemical signaling pathways is the phosphorylation of the Ser831 of GluR1 subunit of AMPA receptor due to the autophosphorylation of the CaMKII. Phosphorylation of the AMPA receptor dependent CaMKII triggers synaptic activity and is known to contribute to induce LTP.

We propose the way to connect electrophysiological stimulation and biochemical signaling mechanisms at synapses of hippocampal neurons by using the assembly model of AMPA receptors. The electrical spikes can be transmitted into biochemical signal transduction processes in dendritic spine. This shows how to simulate LTP with assembly model of AMPA receptors. It is required that electrical spikes transmitted from the presynapse convert

into the differential equation of calcium concentration to present assembly model of AMPA receptors. Increase in calcium concentration triggers biochemical signal transduction processes in postsynapse. Accordingly we arranged biochemical signal transduction processes based on Michaelis-Menten equation model. The biomolecules, involved in biochemical signal transduction processes, regulate the activity of the AMPA receptors. Therefore the activity of the AMPA receptors are modified by downstream biochemical signal transduction processes from calcium influx, which is transmitted from electrical stimuli via presynapse. These simultaneous chain reactions result in a change in AMPA receptor current (I_{AMPA}) and lead to modify synaptic activity.

In this paper we could find out the activity correlations between enzymes and substrates involved in AMPA receptor anchoring assembly processes. We confirmed that the relation of Thr286 autophosphorylation of the CaMKII and CaM (calcium-calmodulin) activation was independent and the role of CaMKII was essential for activating AMPA receptor and inducing LTP based on the assembly model of AMPA receptors.

Keywords: Assembly model of AMPA receptors, AMPA receptor, synaptic plasticity, LTP, CaMKII

Student Number: 2002-20623

감사의 글

대학교 입학했을 때가 엇그제 같은데 시간이 훌쩍 지나 벌써 석사논문을 쓰게 되었습니다. 대학원 생활을 하면서 아쉬웠던 점, 가슴 뿌듯했던 기억과 즐거웠던 추억도 많았습니다. 이 모든 것들이 제가 앞으로 남은 인생을 살아갈 밑거름으로 자리할 거라 생각합니다. 지금까지 석사과정을 마무리하고 논문을 쓸 수 있도록 도와주신 주님께 감사드립니다.

대학원 생활을 하는 데에 많은 분들께 감사의 말씀을 전하고 싶습니다. 우선 연구방향을 잡아주시고 세심한 부분까지 지도해주신 지도교수 장병탁 교수님께 감사드립니다. 논문 내용을 꼼꼼하게 살펴주시고 조언말씀을 해주신 류판동 교수님과 강봉균 교수님께도 감사의 말씀드립니다. 그리고 같이 세미나 하면서 신경과학 분야의 지식을 쌓을 수 있도록 도와준 본웅오빠, 이화에게도 고맙다는 말을 전하고 싶고, 신경과학의 원리 시험 볼 때 도움을 주셨던 재원오빠와 라미 언니, 영혜 그리고 뇌과학 협동과정 동기 여러분께도 감사드립니다. 그밖에 대학원 생활을 하는 데에 있어 즐거운 추억을 만들어준 카우보이 비밥 인희와 맛있는 저녁을 자주 사주는 하영오빠, 지금은 유학 가서 공부하고 있는 동민오빠, 스쿼시를 열심히 치는 수용오빠, 얼마 전 훈련을 마치고 돌아온 희용오빠, 석사 논문 때문에 고생한 제균오빠, 바둑을 좋아하는 수동오빠, 예전 417 멤버였던 승준·재홍·선이오빠, 지금은 졸업한 승우, 현구오빠를 비롯한 BI 연구실 선후배 및 동기 여러분들께 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 301동에서 자주 만나며 힘이 되어준 윤희와 든든한 친구 주영, 멀리 떨어져있어도 마음은 가까운 혜명에게도 감사의 마음을 전합니다.

무엇보다 논문 실험을 도와주고, 즐거울 때나 힘들고 지칠 때 항상 옆에서 함께 기뻐하고 힘이 되어준 동연오빠한테 감사와 고마움을 전합니다. 마지막으로 저를 믿어주시고 사랑해주시는 부모님과 멀리서도 기도해주고 걱정해주는 언니, 가끔 다투기도 하지만 착한 오빠와 저를 아끼고 사랑해주는 가족 여러분들께 감사드립니다.