

Synaptické mediátory a receptory

1. část

Rostislav Tureček

Ústav experimentální medicíny, AVČR
Oddělení neurofyzologie sluchu

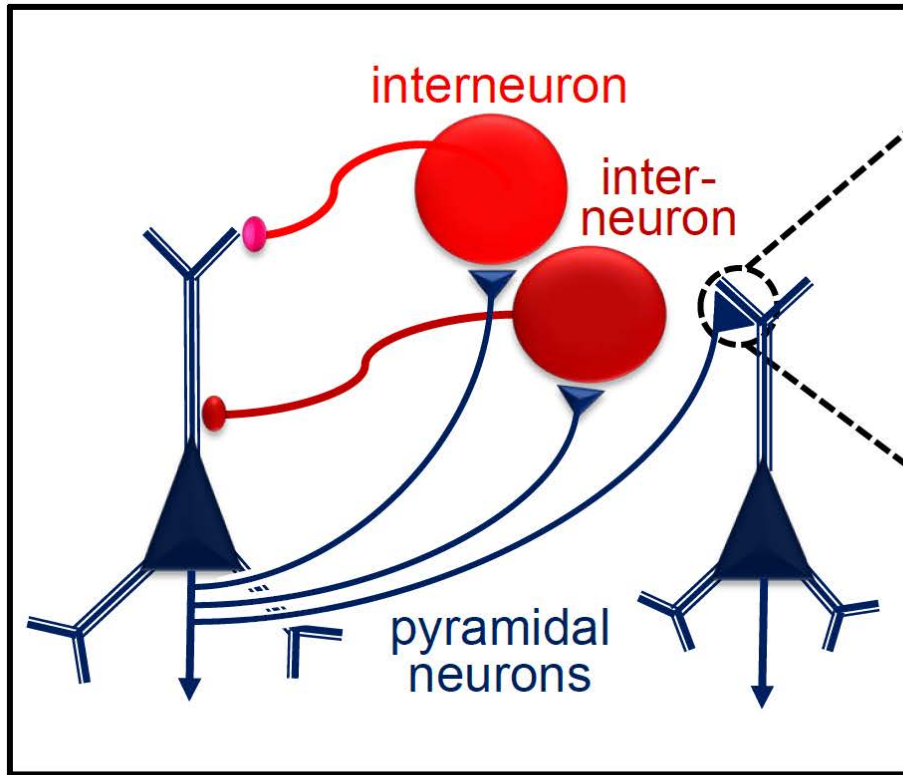
rostislav.turecek@iem.cas.cz

Signály v nervovém systému

1) Elektrické

2) Chemické

Thomas C. Südhof – Nobel Prize, 2013



Synapses: the basic computational units of the brain



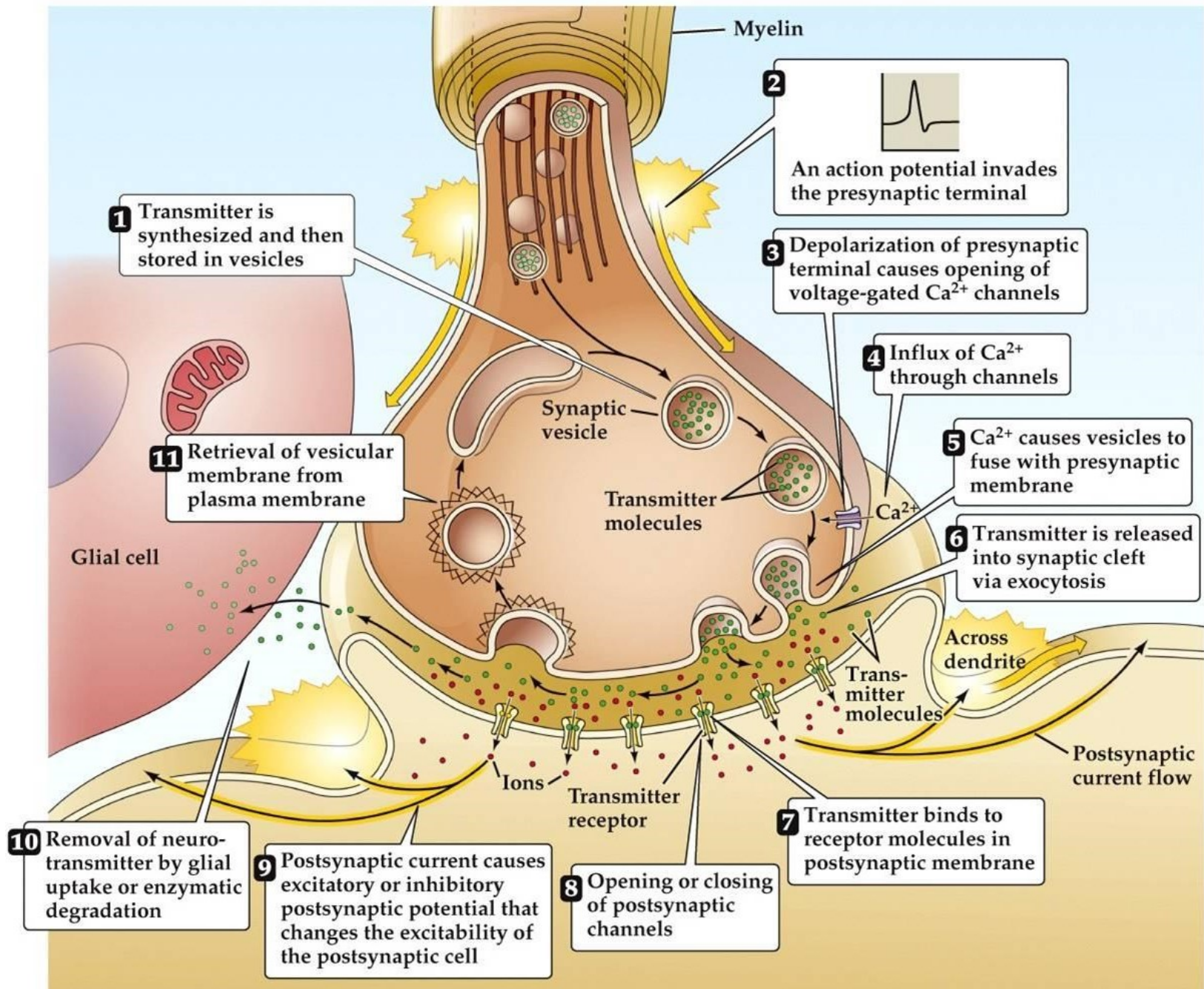
**Although synapses differ in properties,
all synapses operate by the same principle**

Bernard Katz - Nobel Prize, 1970

Principy přenosu na synapsích

- buňky uvolňují látky zvané neuropřenašeče (neboli mediátory), které jsou uloženy v synaptických váčcích v pre-synaptickém zakončení
- uvolnění mediátorů z váčků je spouštěno presynaptickou depolarizací, aktivací napětově-závislých Ca^{2+} -kanálů a zvýšením $[\text{Ca}^{2+}]$ v presynaptickém zakončení
- neuropřenašeče jsou přenášeny od presynaptické buňky k postsynaptické difuzí (okolní prostředí může být málo vodivé a proto nemůže být snadno překonáno elektrickými signály; toto prostředí bývá většinou nazýváno synaptickou štěrbinou)
- neuropřenašeče se na postsynaptické buňce váží k postsynaptickým receptorům, aktivují je a vyvolávají tak postsynaptickou odpověď

Synaptický přenos

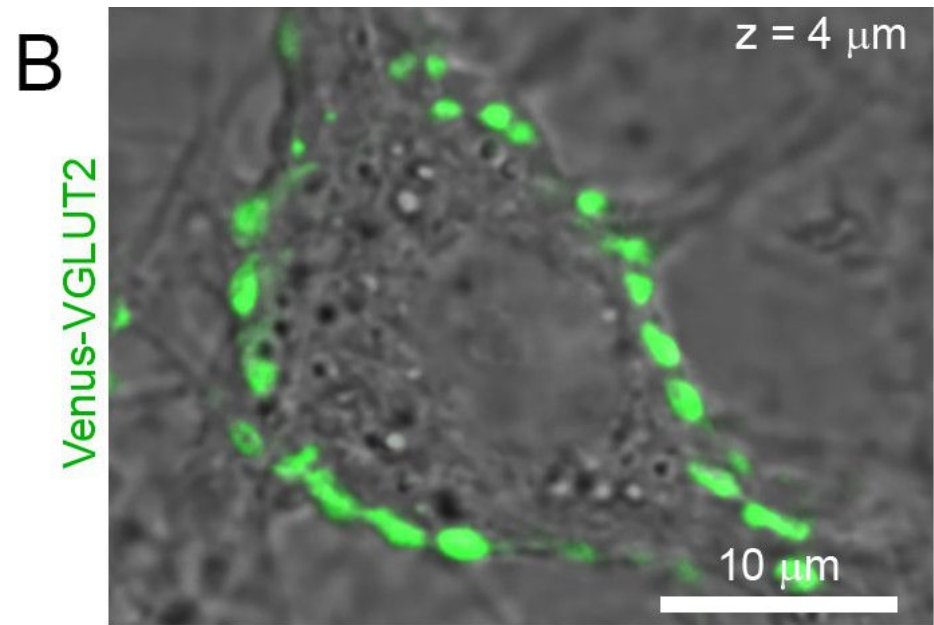
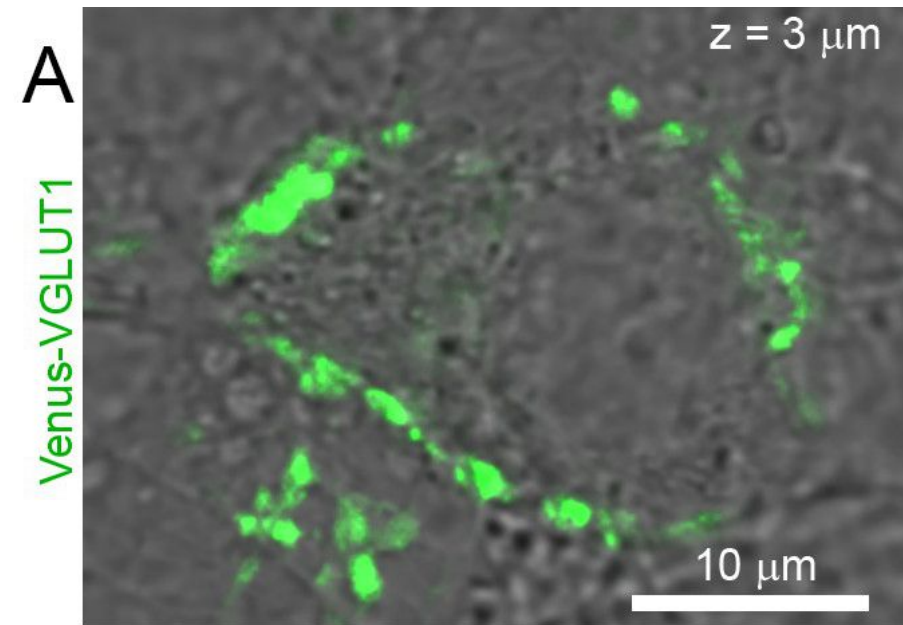


Neuropřenašeče

kritéria, která definují látky jako neuropřenašeče:

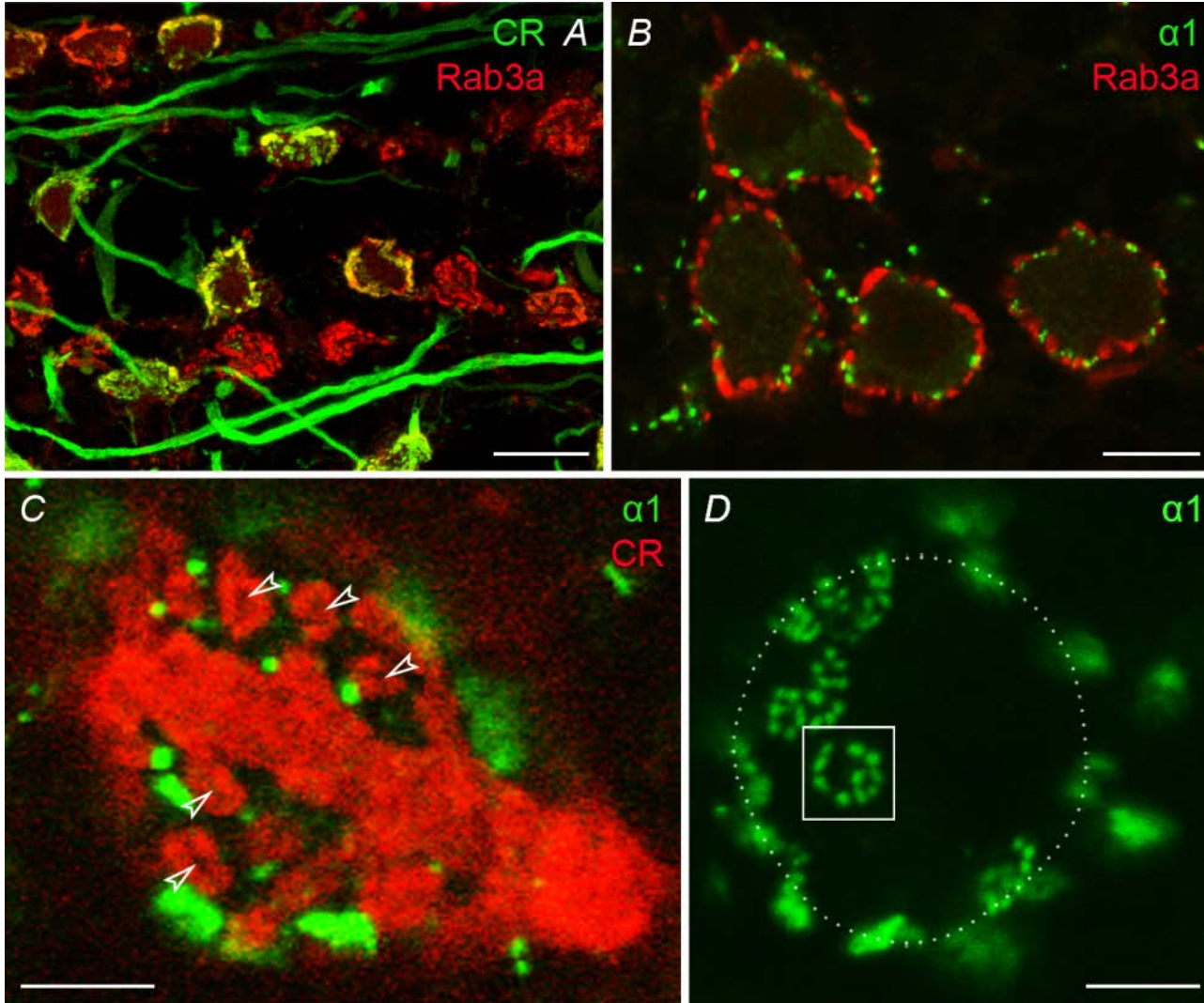
- látka musí být přítomna v presynaptickém neuronu (biochemický nebo imunocytochemický průkaz látky nebo enzymů),
- látka musí být uvolňována při presynaptické depolarizaci Ca^{2+} -závislým způsobem (elektrofyzilogické metody),
- specifické receptory pro látku musí být přítomny na postsynaptické buňce (elektrofyzilogické biochemické a imunocytochemické metody, aplikace exogenních agonistů a antagonistů)

Vesikulární glutamátový transporter (vGluT)-v presynaptických terminálech

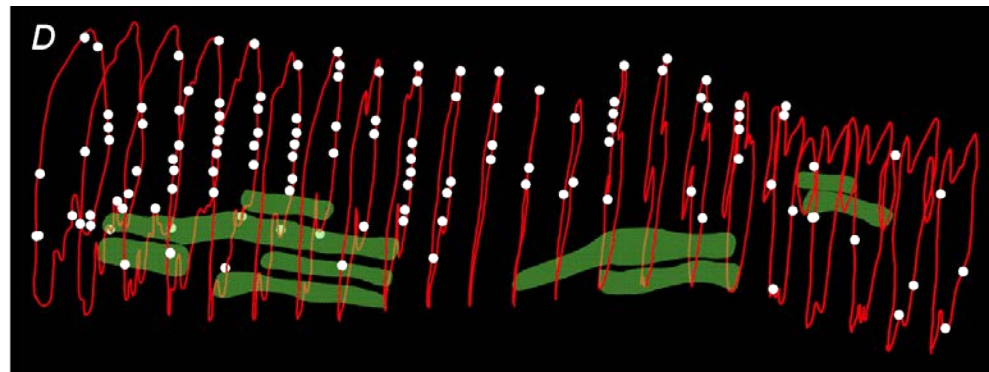
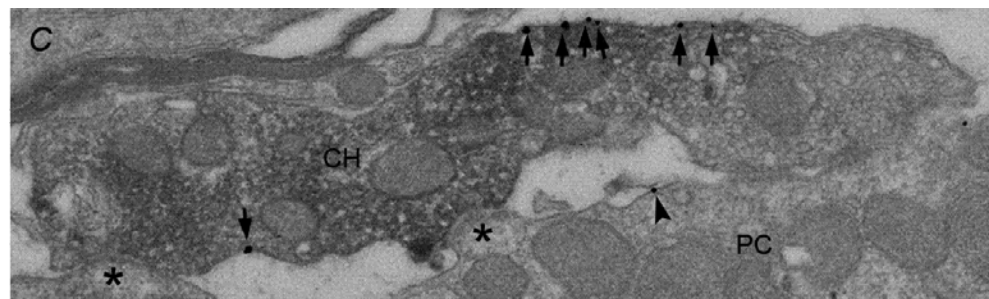
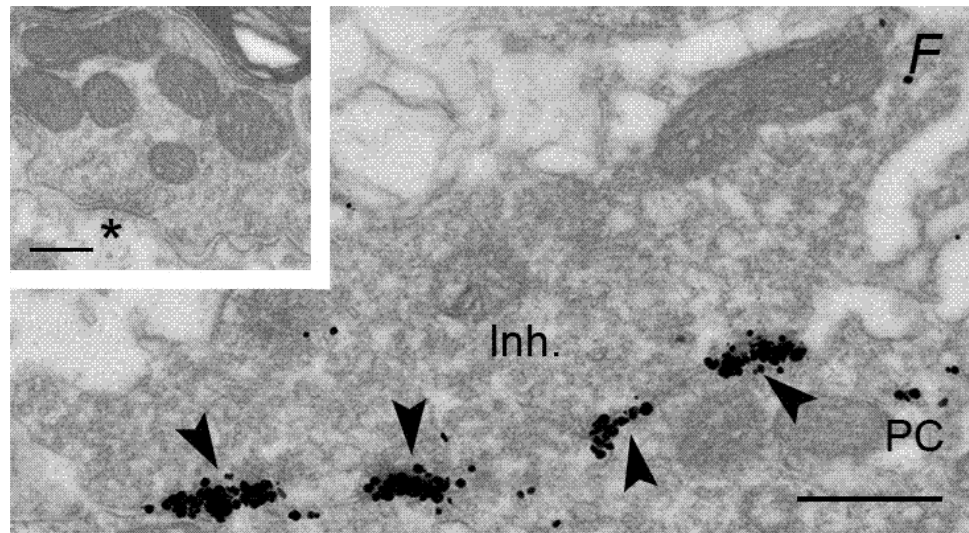
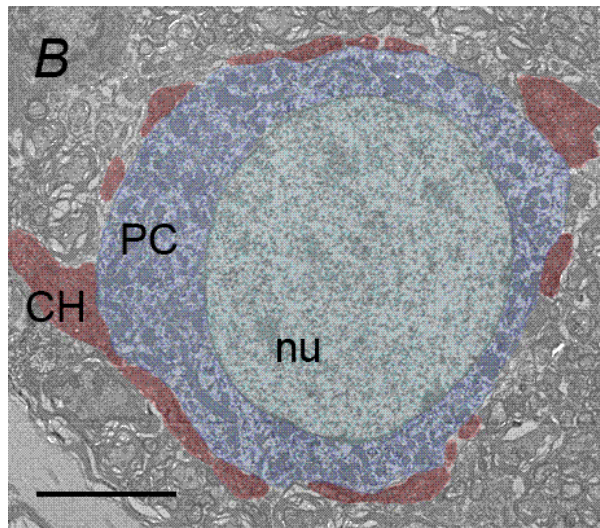


Lokalizace glycinových receptorů (GlyR) v nervové tkáni (imunohistochemie)

Konfokální mikroskopie



Imunoelektronová mikroskopie

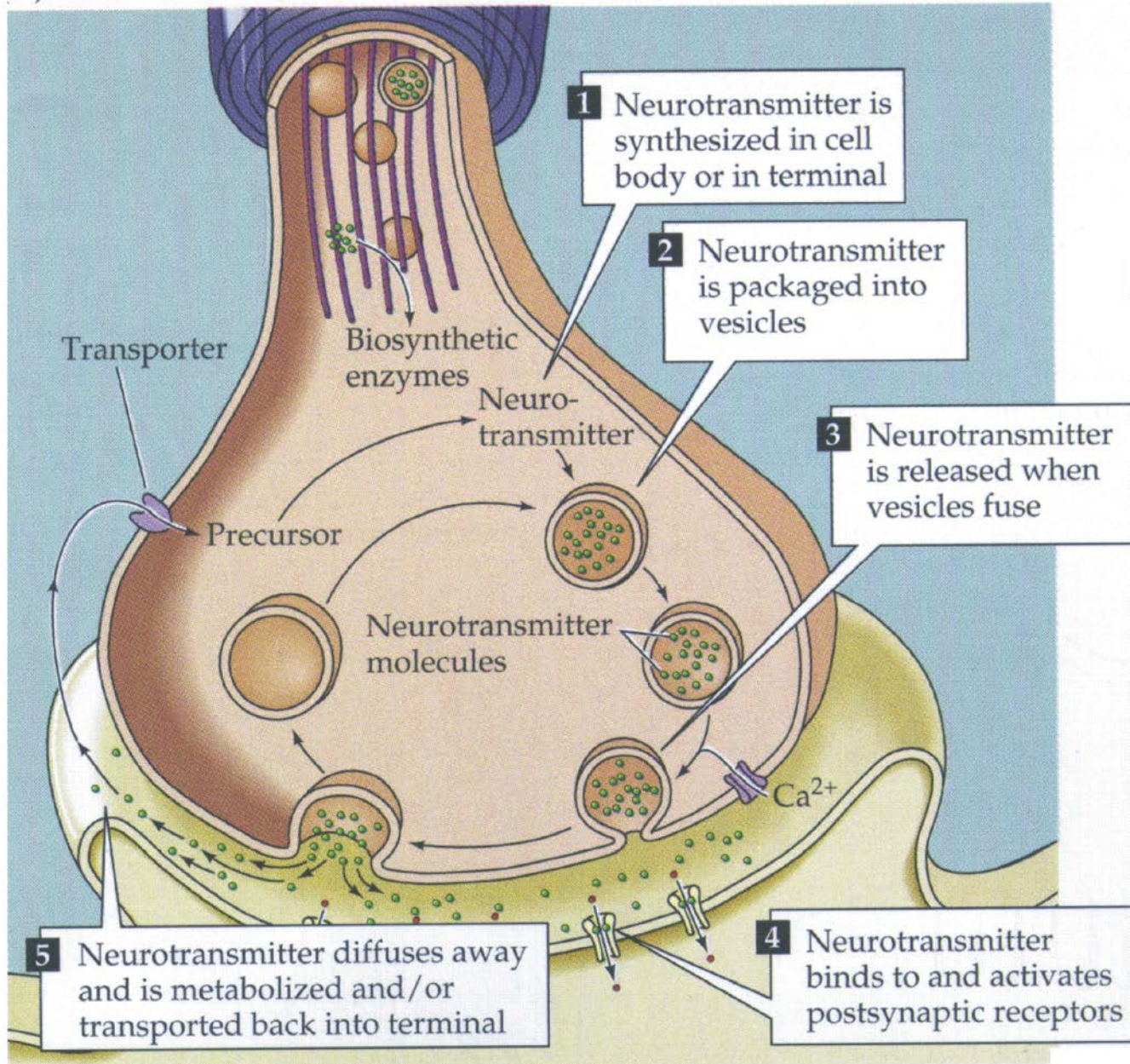


vGluT – peroxidáza
GlyR – zlaté částice

3D rekonstrukce
distribuce receptorů
v nervové tkáni

Syntéza a uložení neuro- přenašečů

A) LIFE CYCLE OF NEUROTRANSMITTER



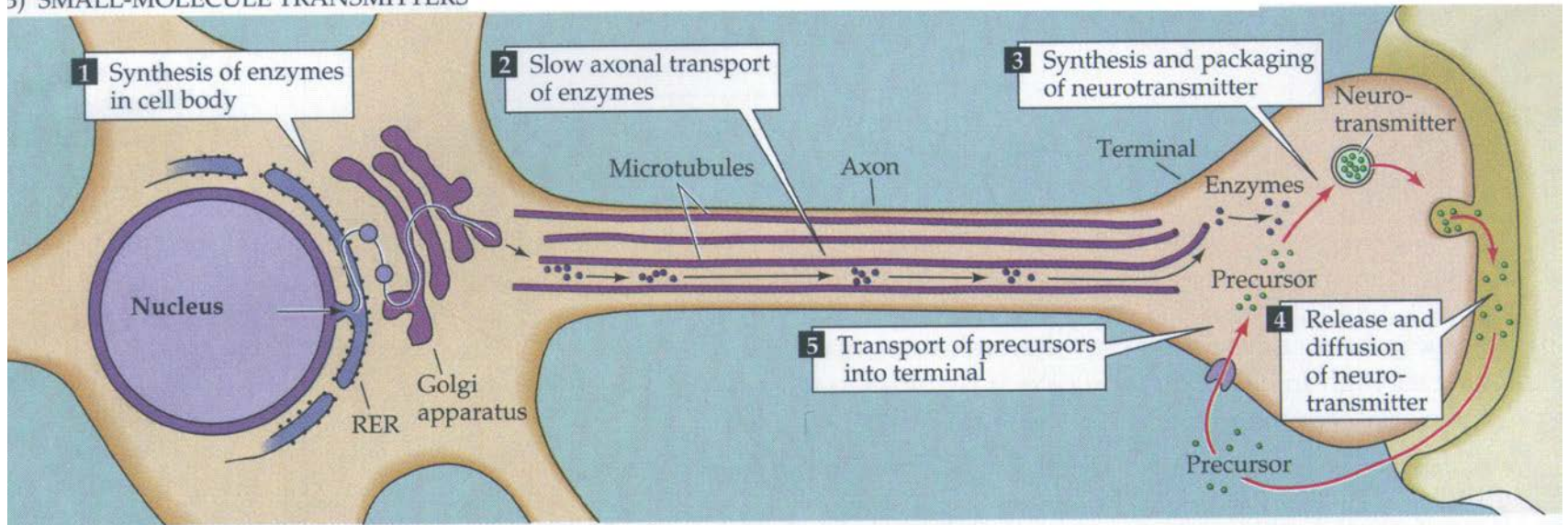
2 základní kategorie neuropřenašečů:

1. Mediátory s malou molekulovou váhou (např. ACh, GABA, glutamát, serotonin, histamin)
2. Neuropeptidy (tvořené několika až desítkami aminokyselin, např. substance P, neuropeptid Y, enkefaliny)

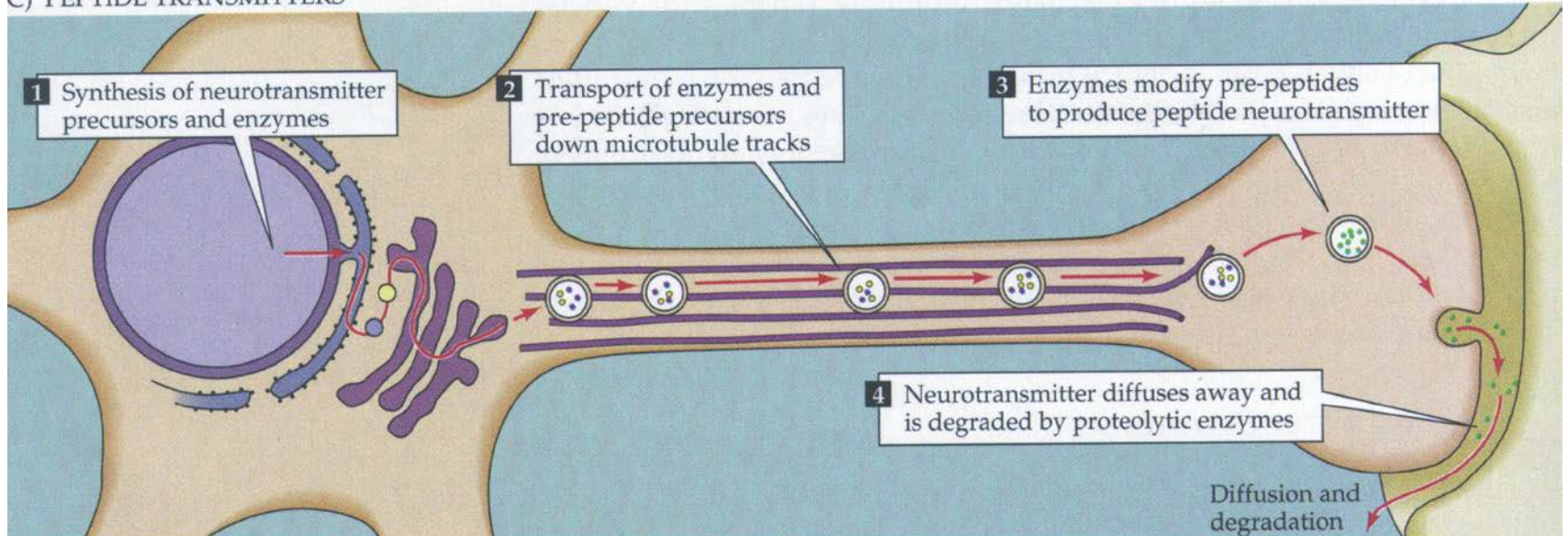
Co-transmitters – oba typy přenašečů společně uvolňované ze stejného zakončení nebo i stejného synaptického váčku

2 způsoby biosyntézy neuropřenašečů

3) SMALL-MOLECULE TRANSMITTERS



C) PEPTIDE TRANSMITTERS

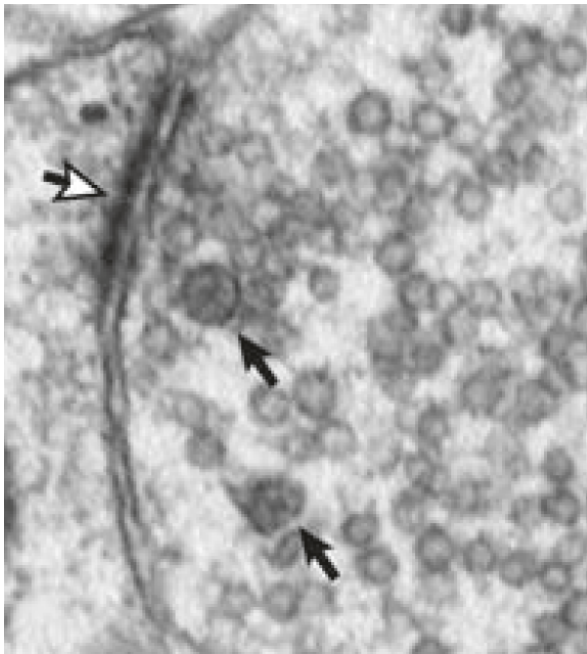


Spolupřenašeče (co-transmitters)

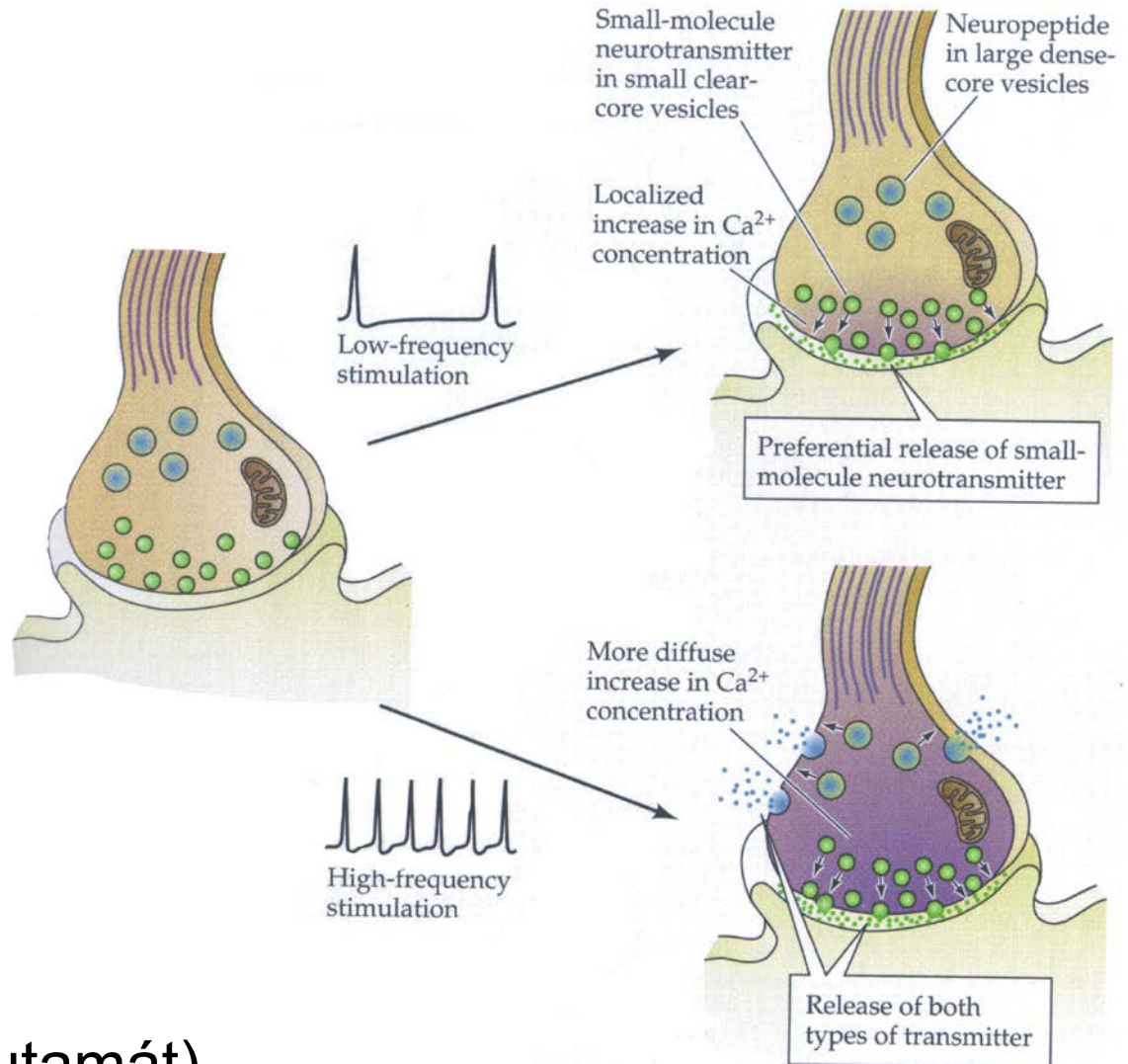
příklady:

GABA/somatostatin

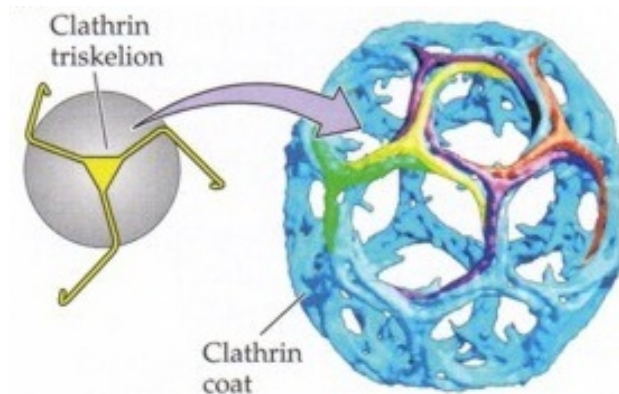
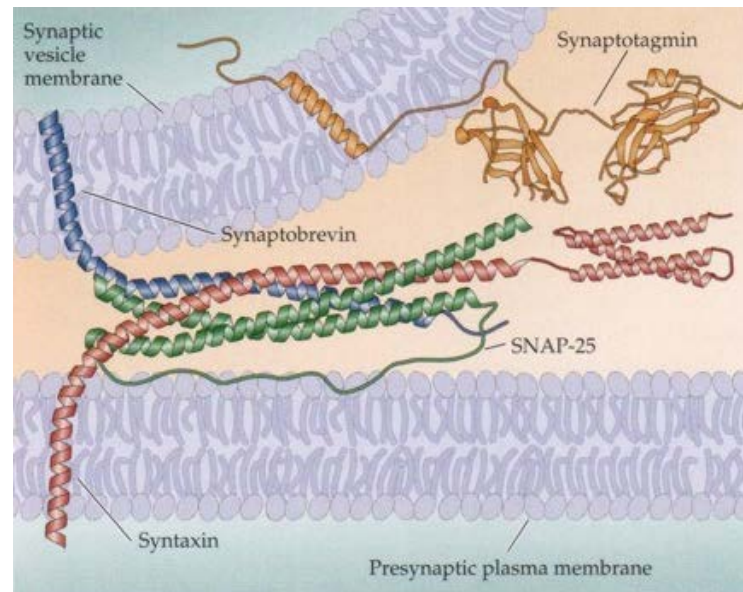
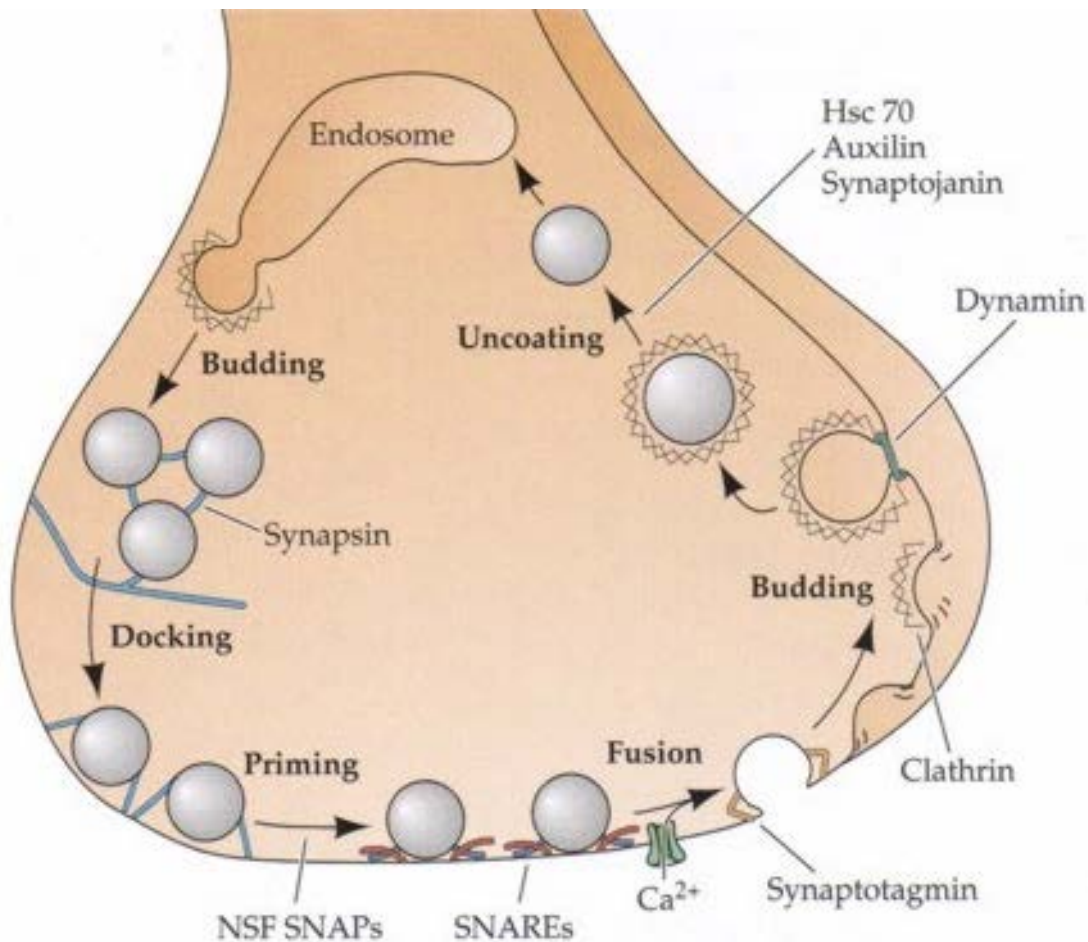
ACh/substance P



malé průhledné SV (glutamát)
velké denzní SV (neuropeptid)

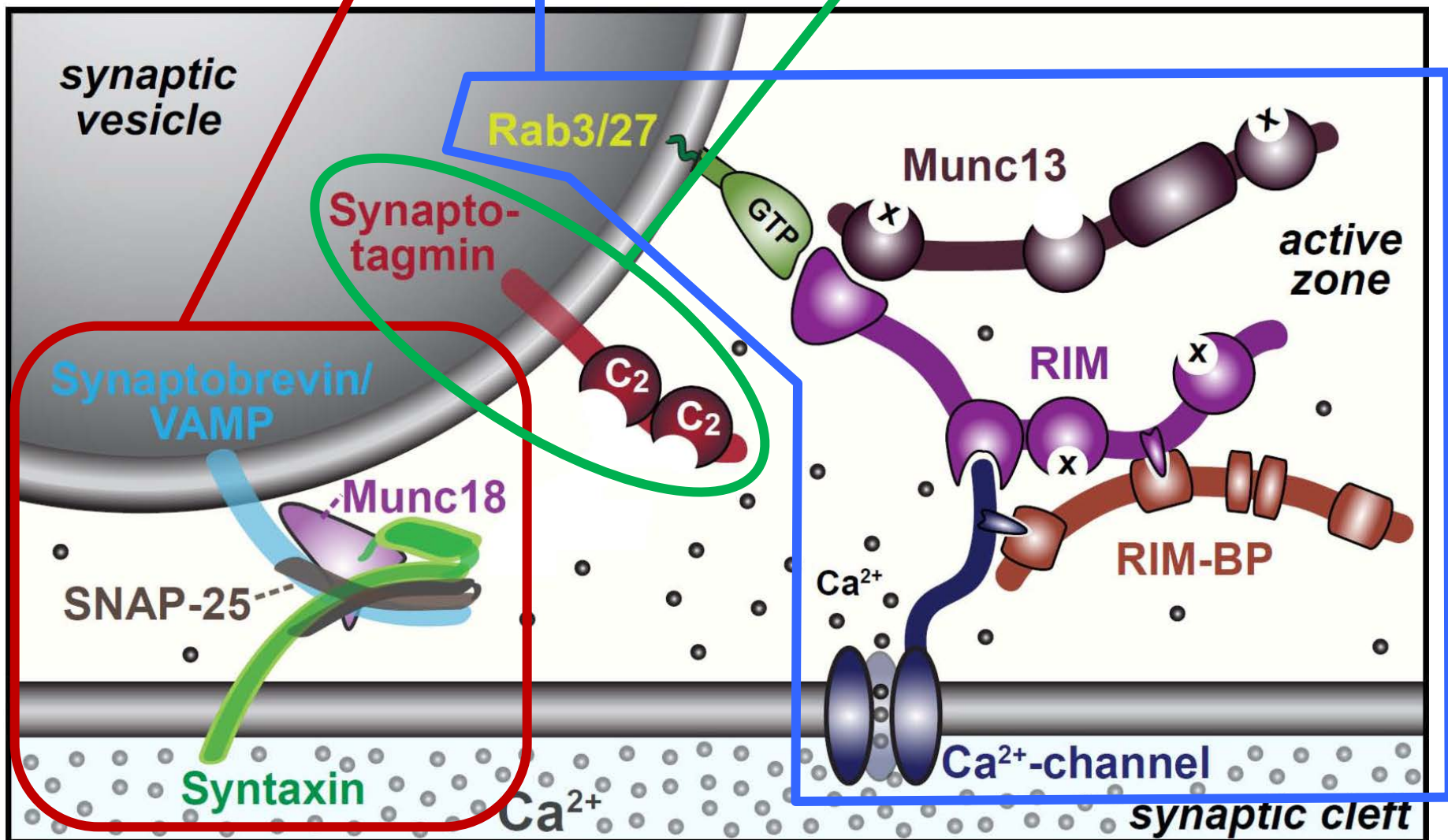


Lokální cyklus synaptických váčků (SV)

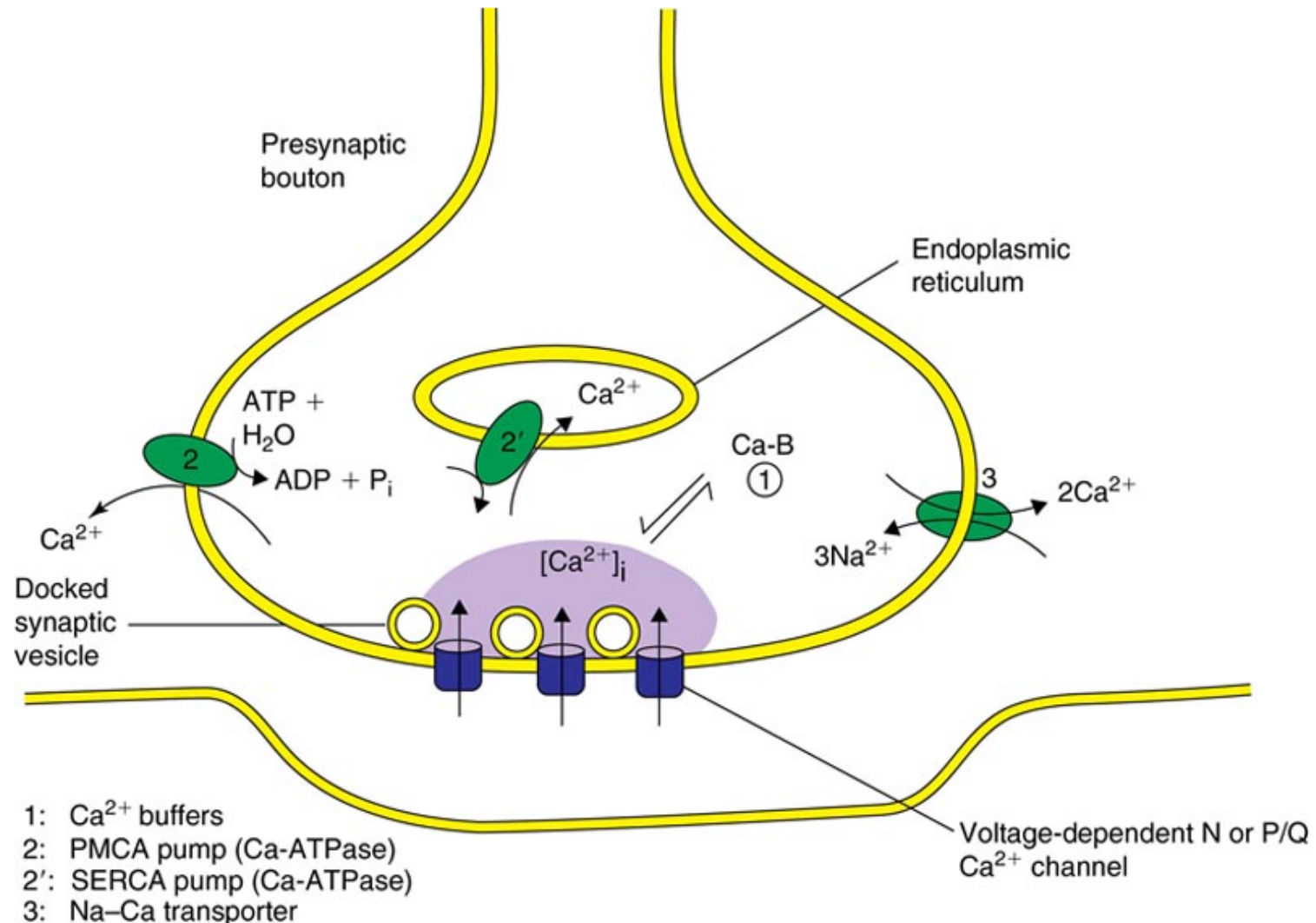


Clathrinový obal zvyšuje zakřivení membrány, což vede k vytvoření váčku. Dynamin umožňuje odškrcení váčku.

Presynaptický uvolňovací aparát provádí fúzi, Ca^{2+} -závislé spuštění a připoutání SV k Ca^{2+} -kanálu

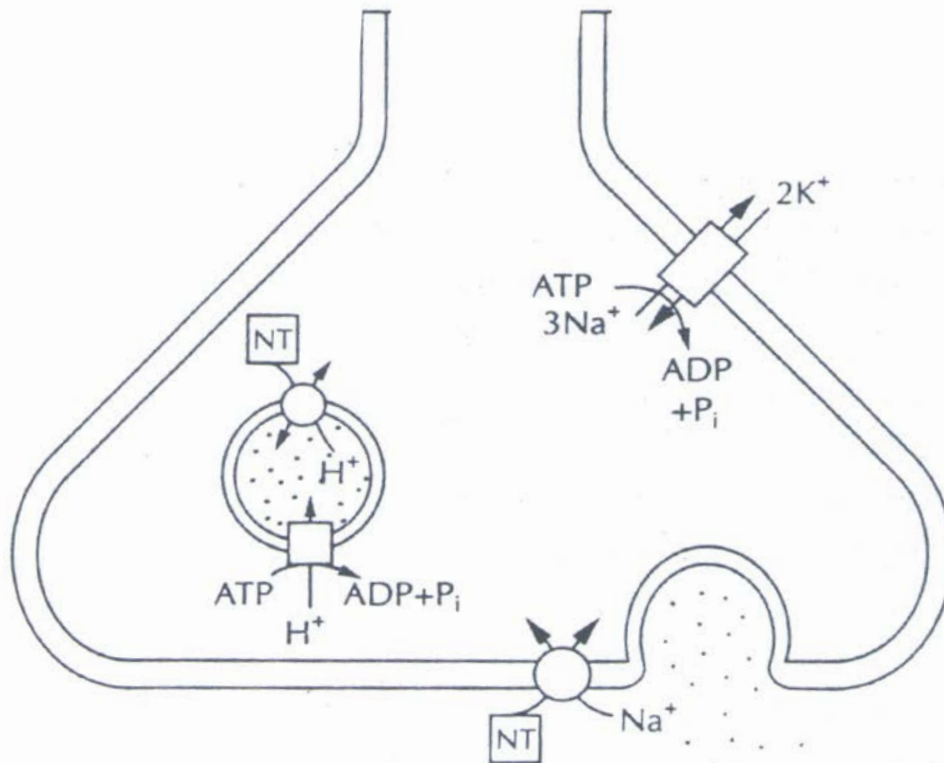


Mechanismy odstraňování presynaptických Ca^{2+}

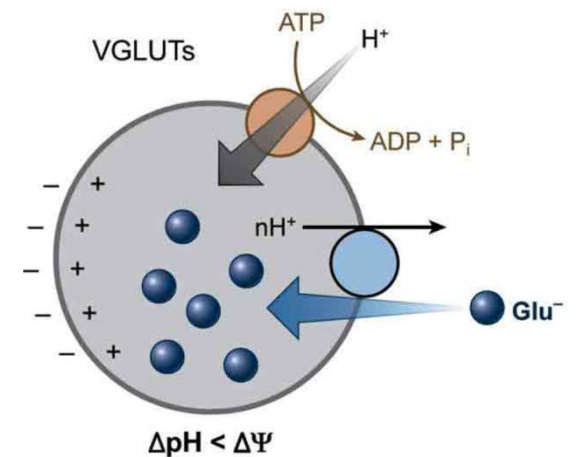
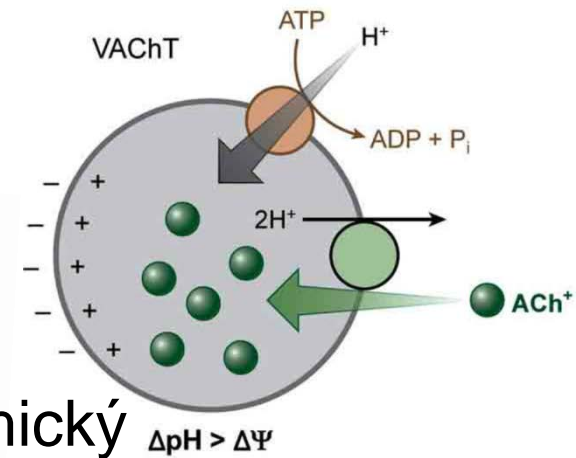


Zpětná absorpce mediátorů nervovým zakončením

- specifické transportní proteiny vyžadující Na^+ gradient

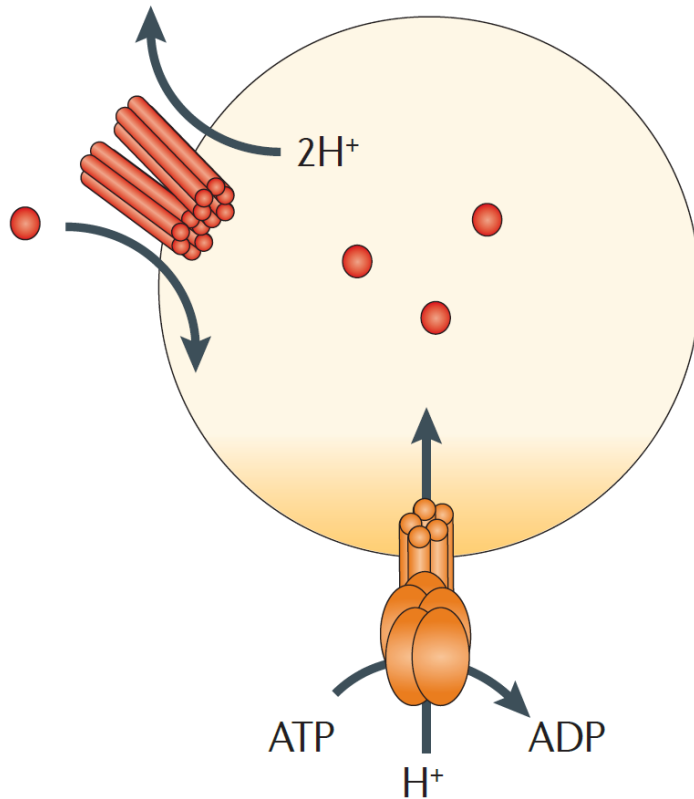


vesikulární přenašeče využívají elektrochemický gradient: ΔpH a $\Delta\Psi$ (rozdíl potenciálů)

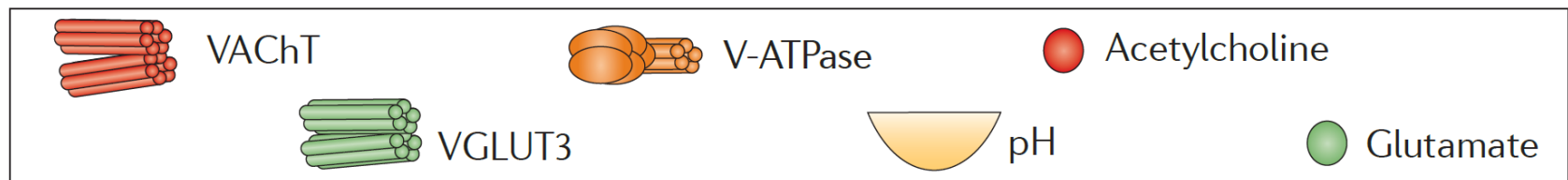
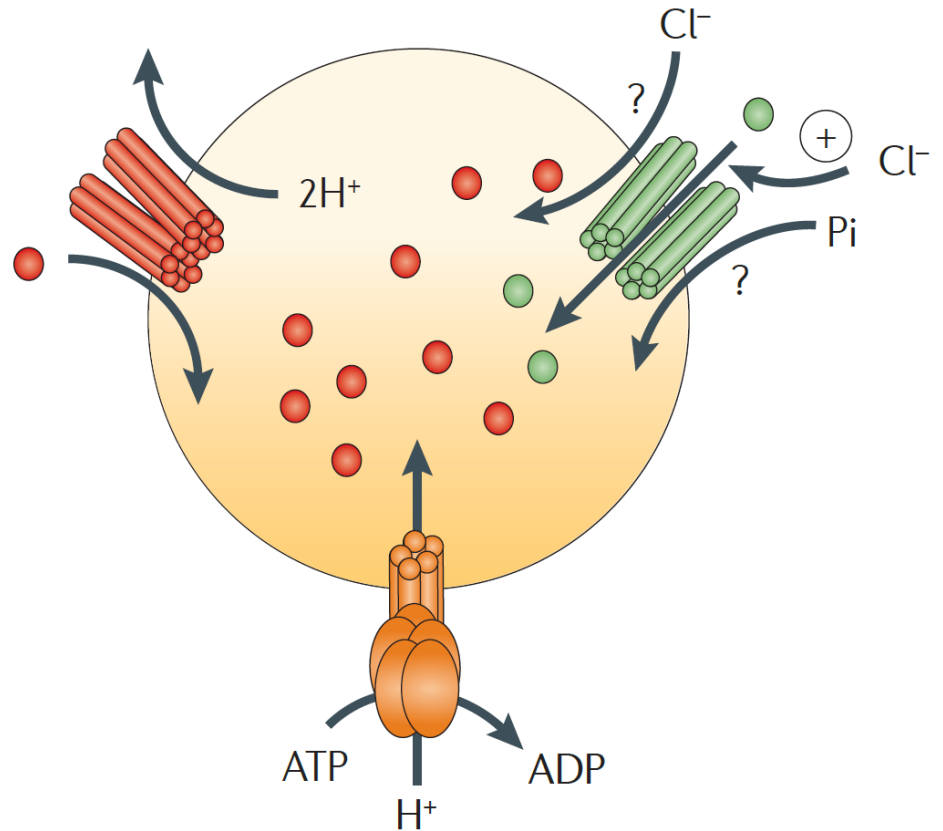


Spolupřenašeče uvolňované stejným SV

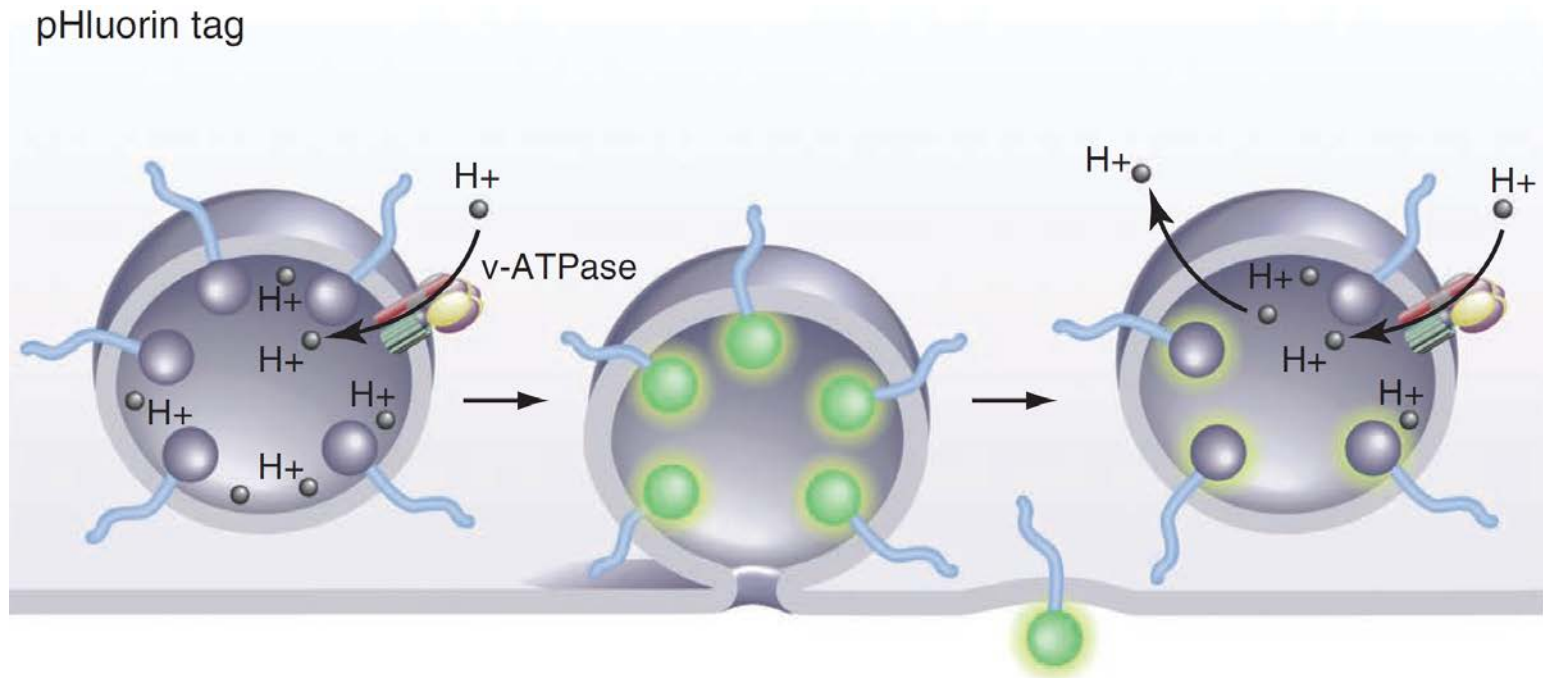
Acetylcholine vesicle



Acetylcholine-VGLUT3 vesicle



Optogenetika: monitorování recyklace SV



Poruchy exocytózy synaptických váčků → neurologická onemocnění

- myastenické syndromy, vyzn. se abnormálním syn. přenosem na nervosval. spojeních → svalová slabost. Příklad: Lambert-Eaton myastenický syndrom (komplikace při rakovině plic) – autoimunitní reakce na presyn. VDCC, snížení uvolň. ACh, imunosupresiva
- vrozený myastenický syndrom – poruchy recyklace syn. váčků - snížení uvolň. ACh, inhibitory AChE

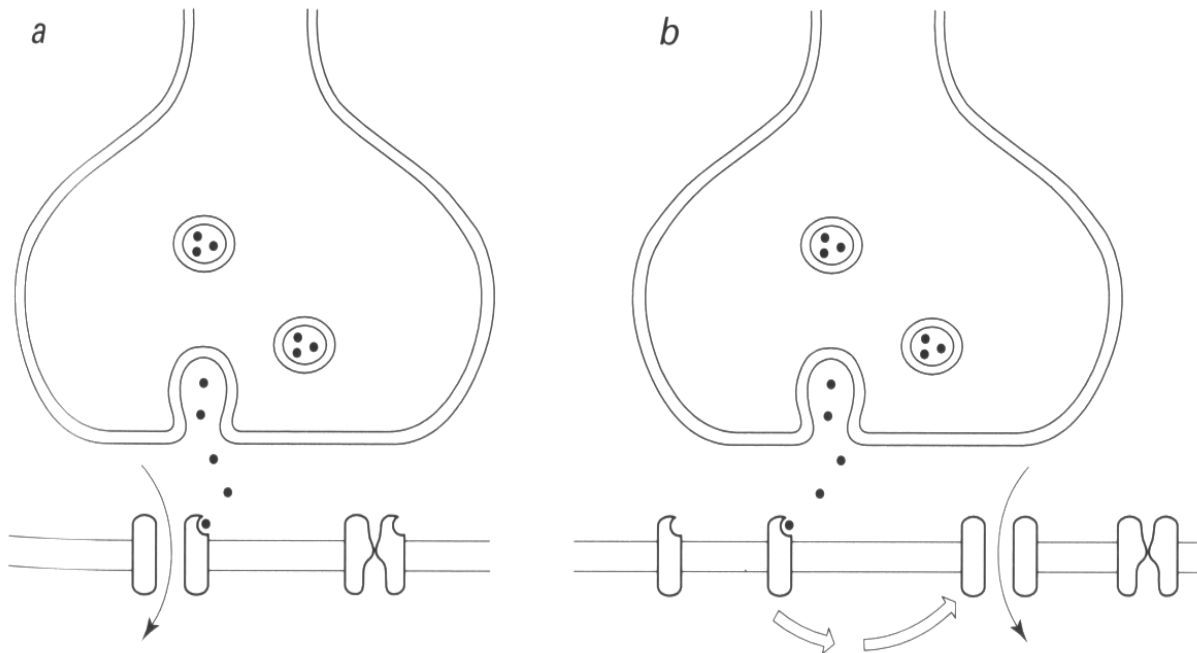
(pozn. myasthenia gravis – imunitní systém vytv. protilátky k nAChR → svalová slabost, inhibitory AChE)

Bakteriální toxiny a neurotoxiny:

- r. Clostridium - botulin (jeden z nejprudších jedů) a tetanus toxin, proteázy, štěpí SNARE
- botulismus - kontaminovaná potrava nebo infekce poranění, paralýza nervosval. synapsí, snížení uvolň. ACh, svalová slabost (diafragma), estetická medicína
- tetanus - infekce rány, blokáda uvolň. inhibičních mediátorů v míše → hyperexcitace kosterní svaloviny, tetanické kontrakce
- konotoxiny - mořský plž r. Conus, šipky, blok presynaptických Ca²⁺ kanálů

Postsynaptické receptory

Synaptický přenos: - rychlý: ligandem řízené kanály
- pomalý: metabotropní receptory

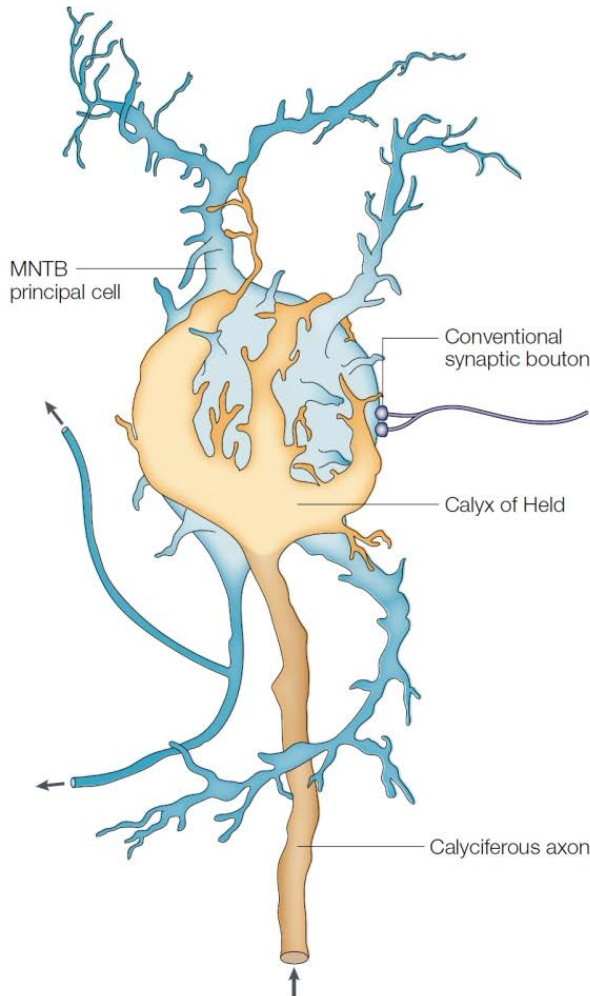
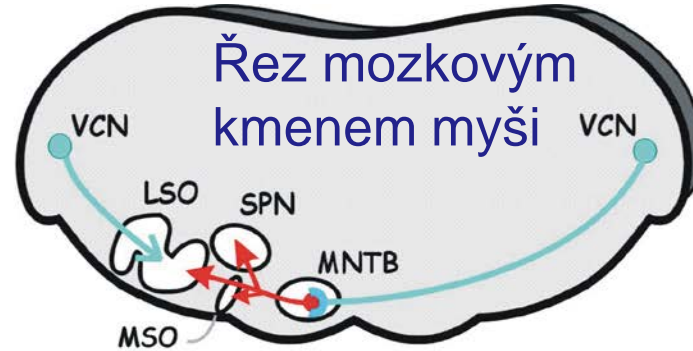


Ligandem řízené iontové kanály

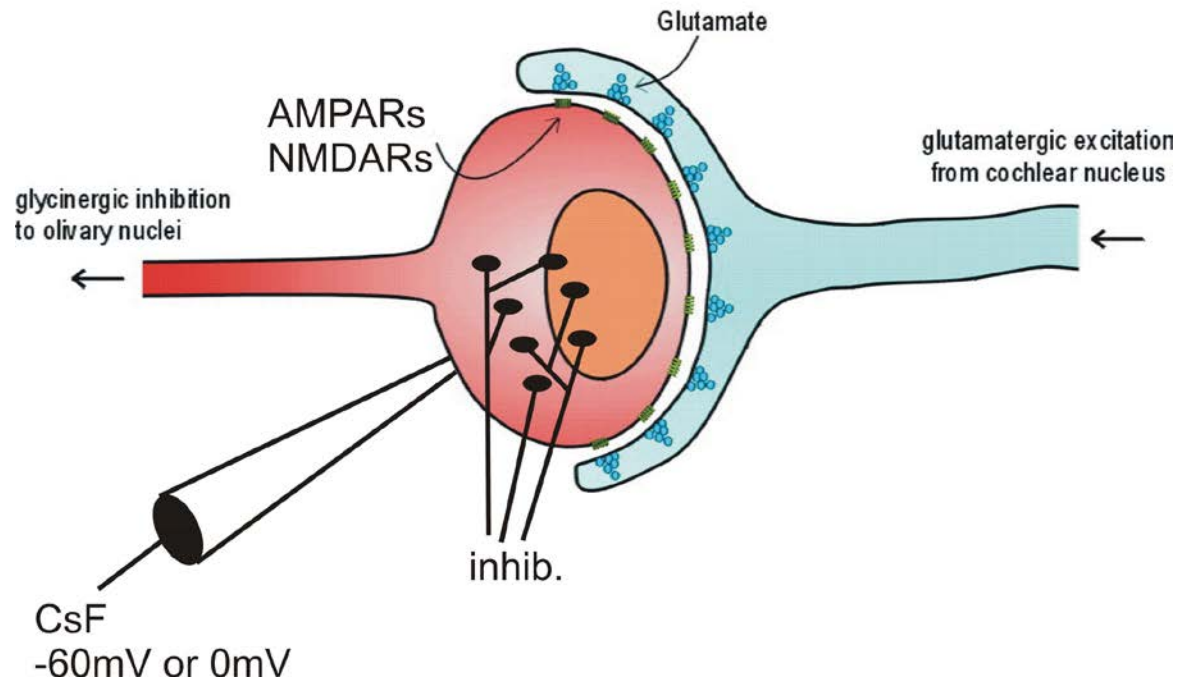
3 rodiny:

- cys-loop (GABA-A, GlyR, 5-HT, nAChR)
- Glutamátové (AMPA, KR, NMDA)
- ATP (P2X)

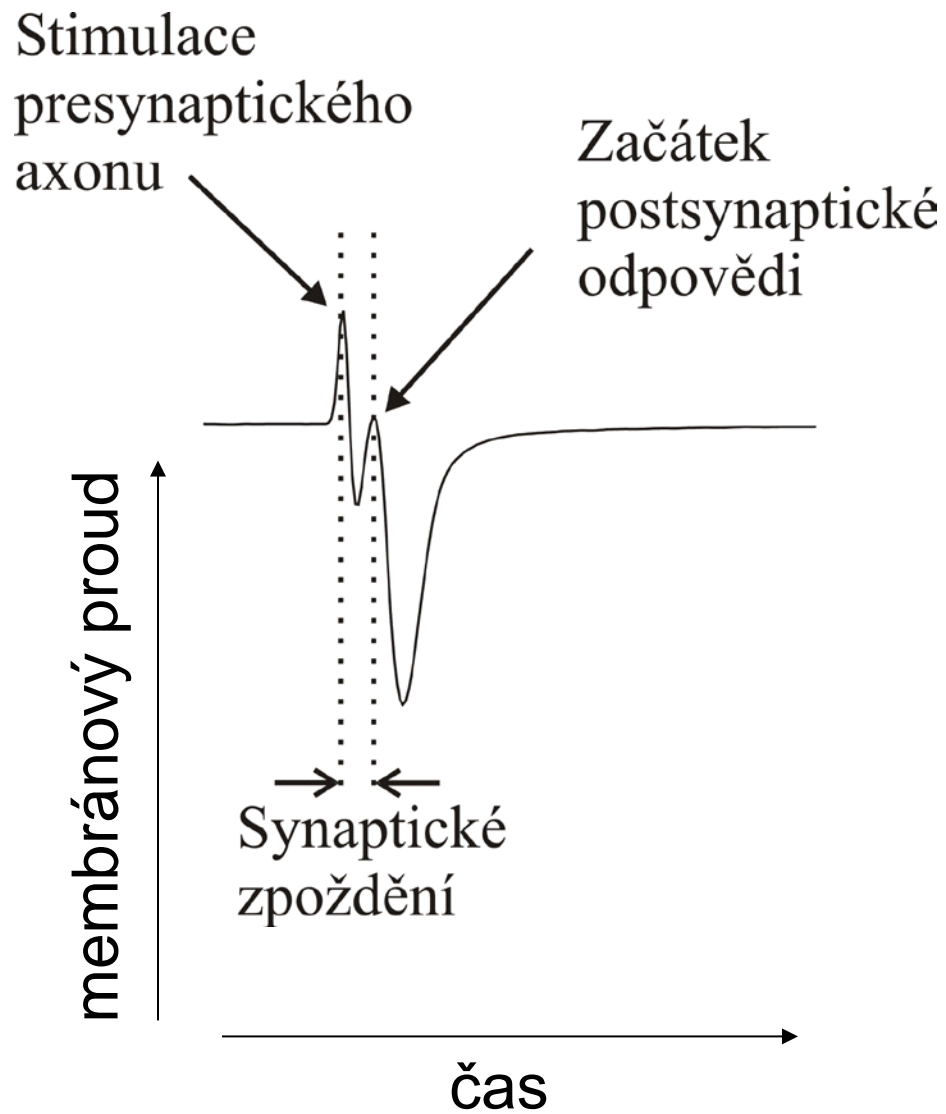
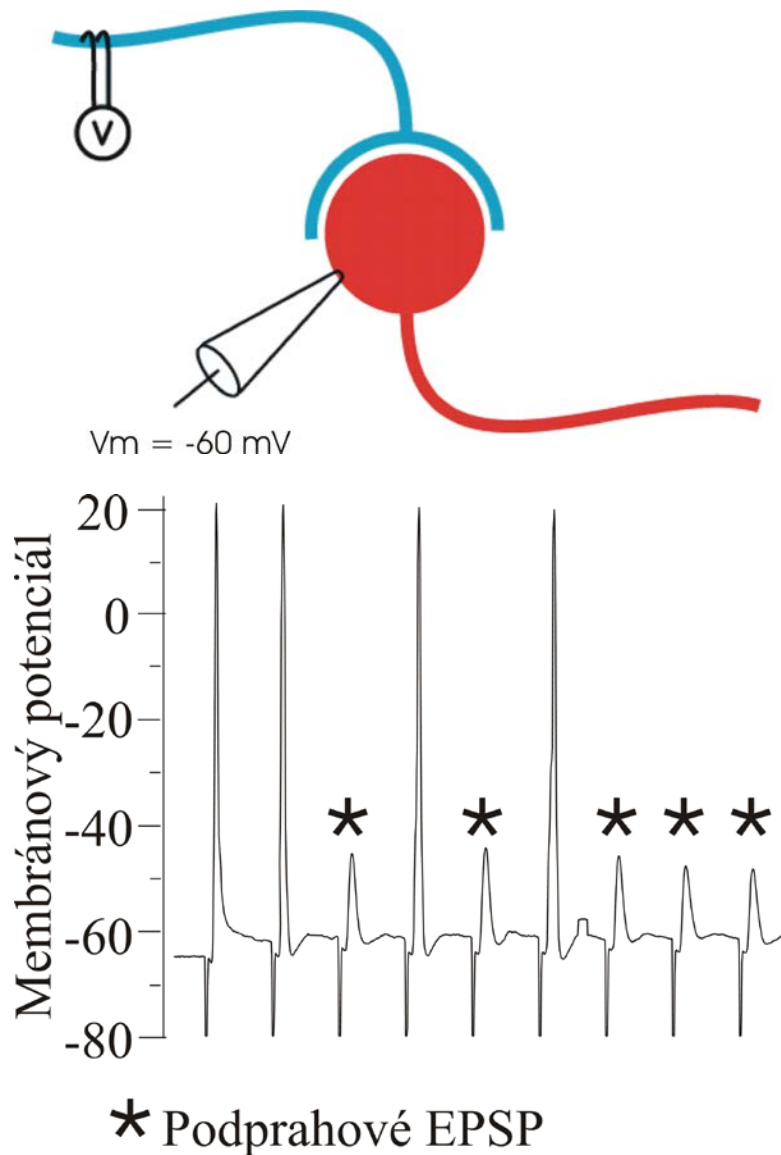
Studium rychlého synaptického přenosu využitím živých řezů z mozkových tkání



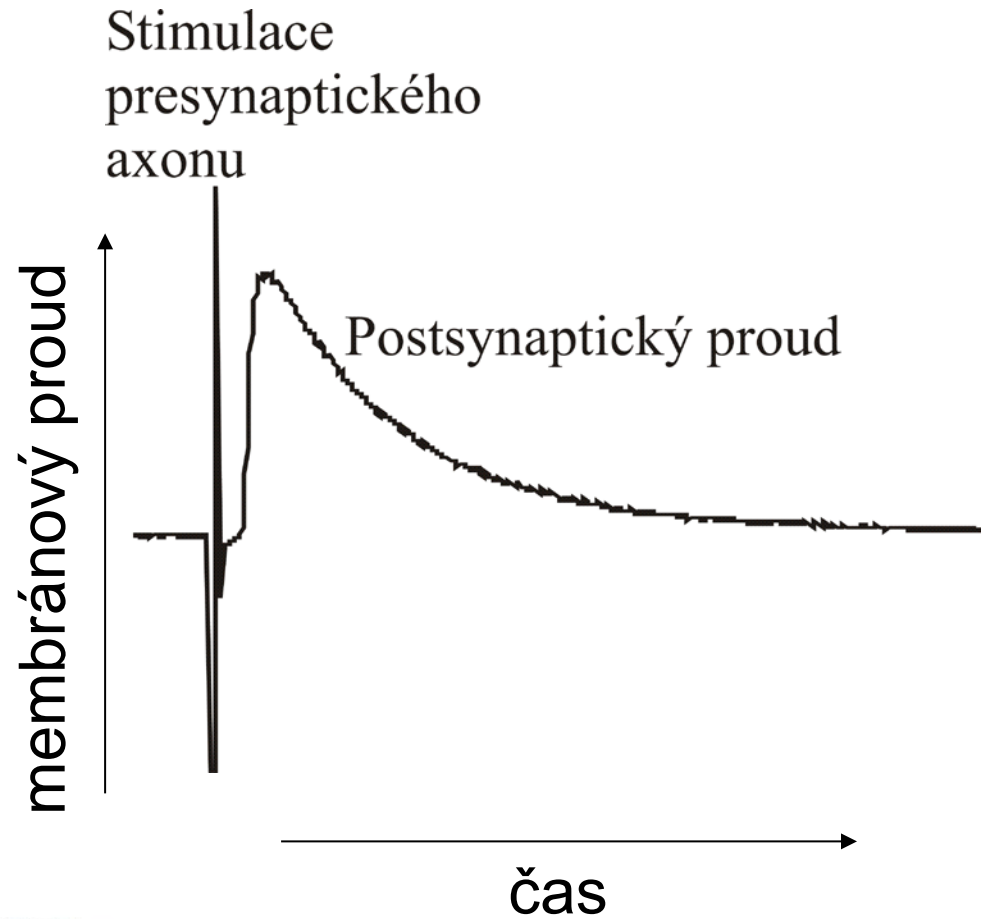
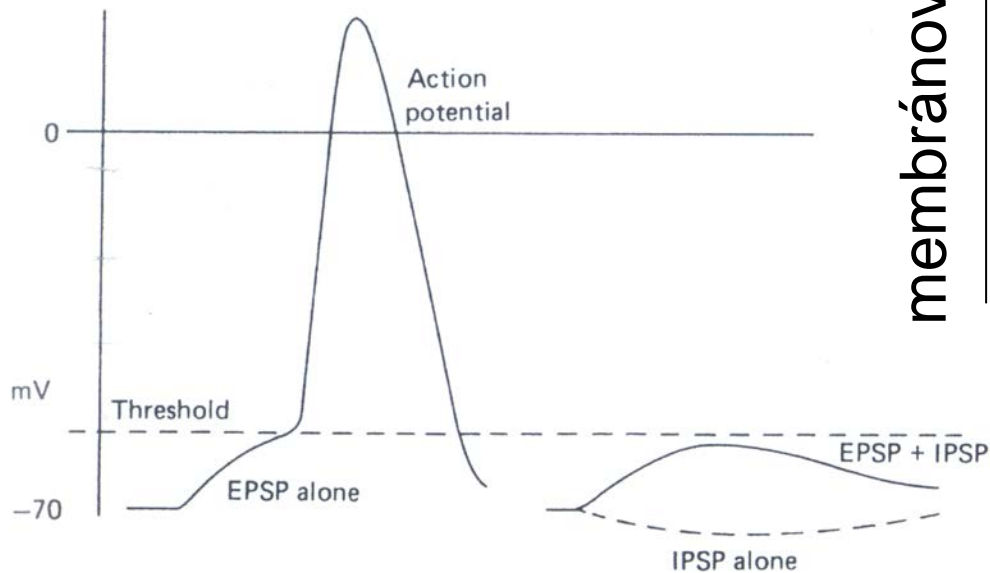
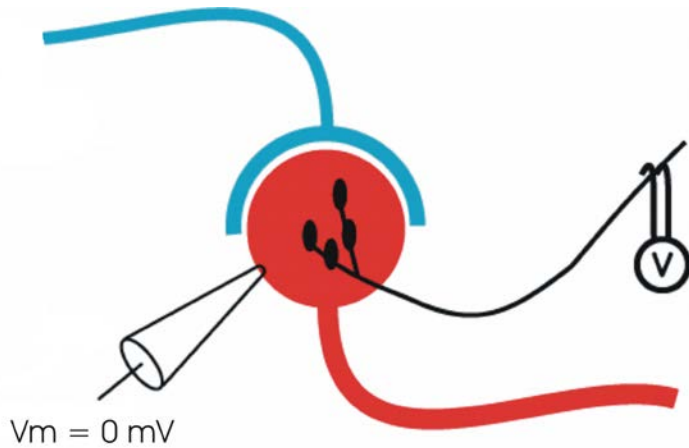
The calyx of Held



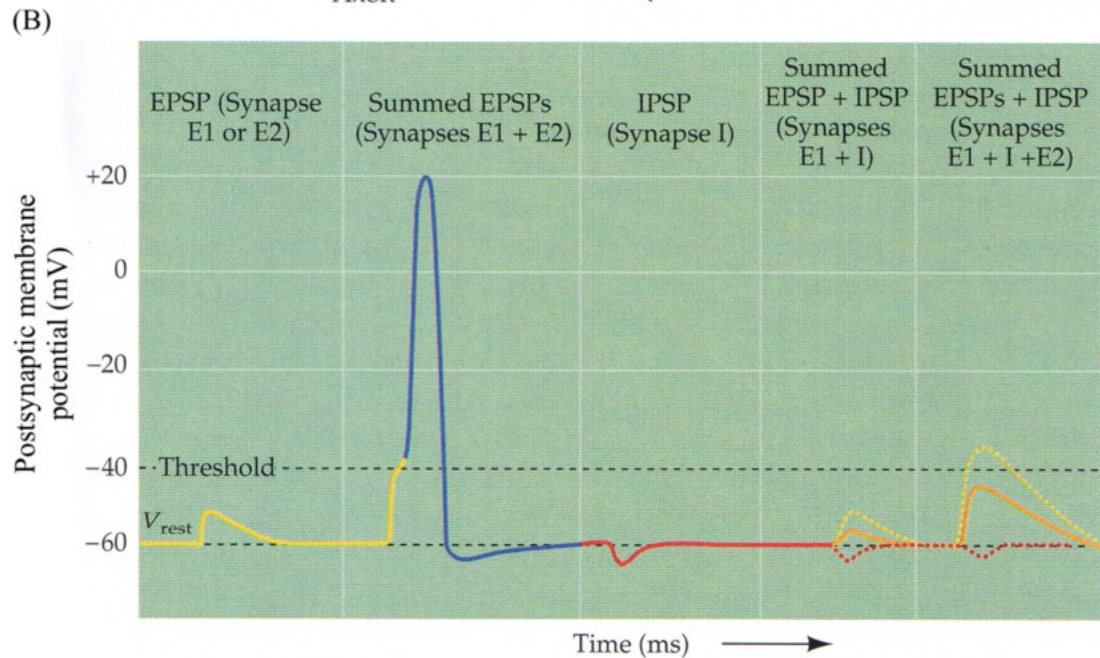
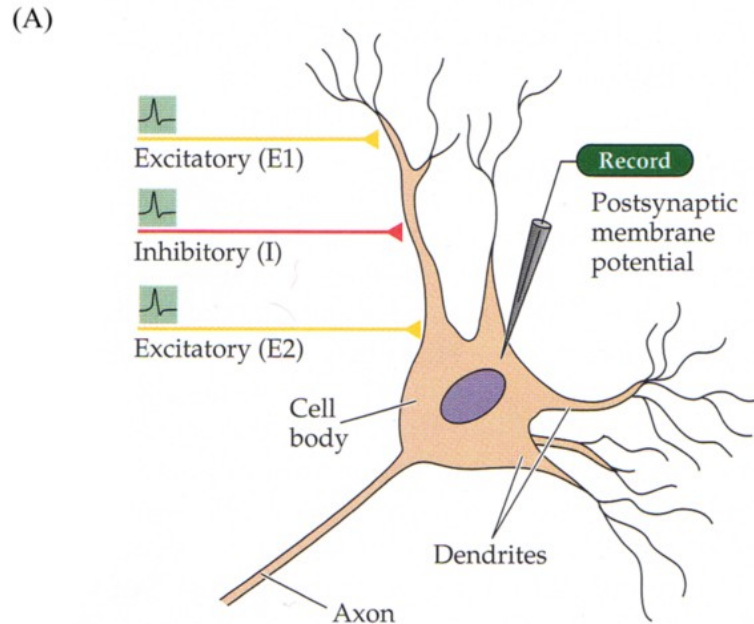
Excitační postsynaptický proud (EPSC) a potenciál (EPSP)



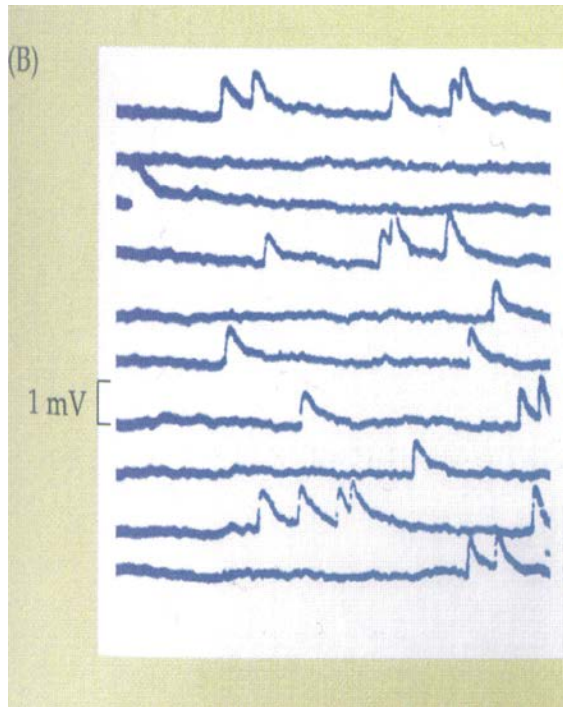
Inhibiční postsynaptický proud (IPSC) a potenciál (IPSP)



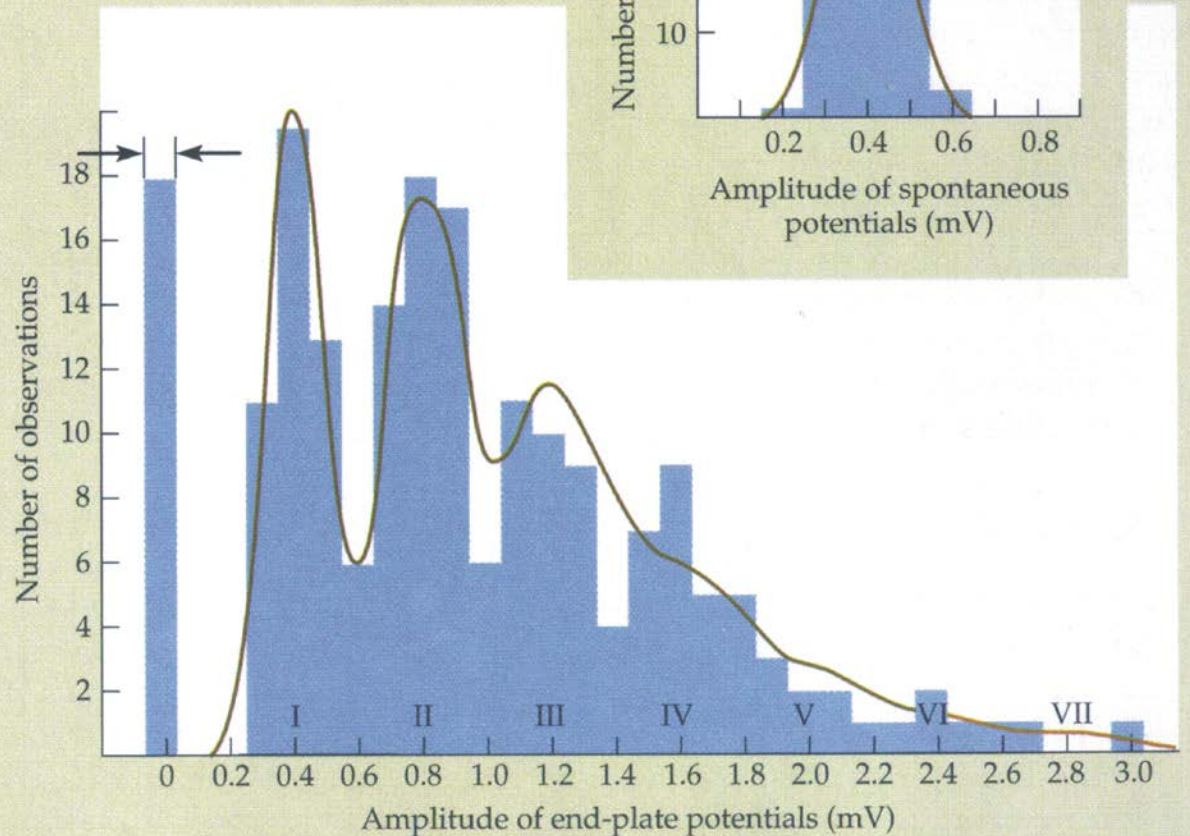
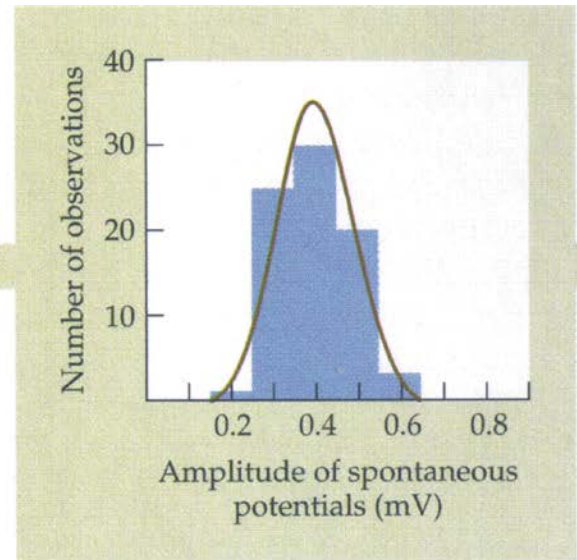
Sumace postsynaptických potentialů



Kvantové uvolnění neuropřenašeče



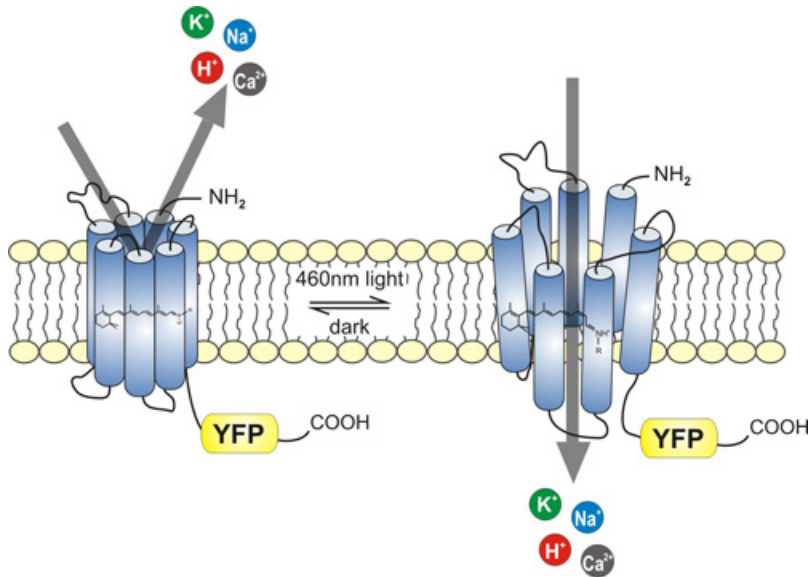
Evokované EPSP:
násobky mEPSP



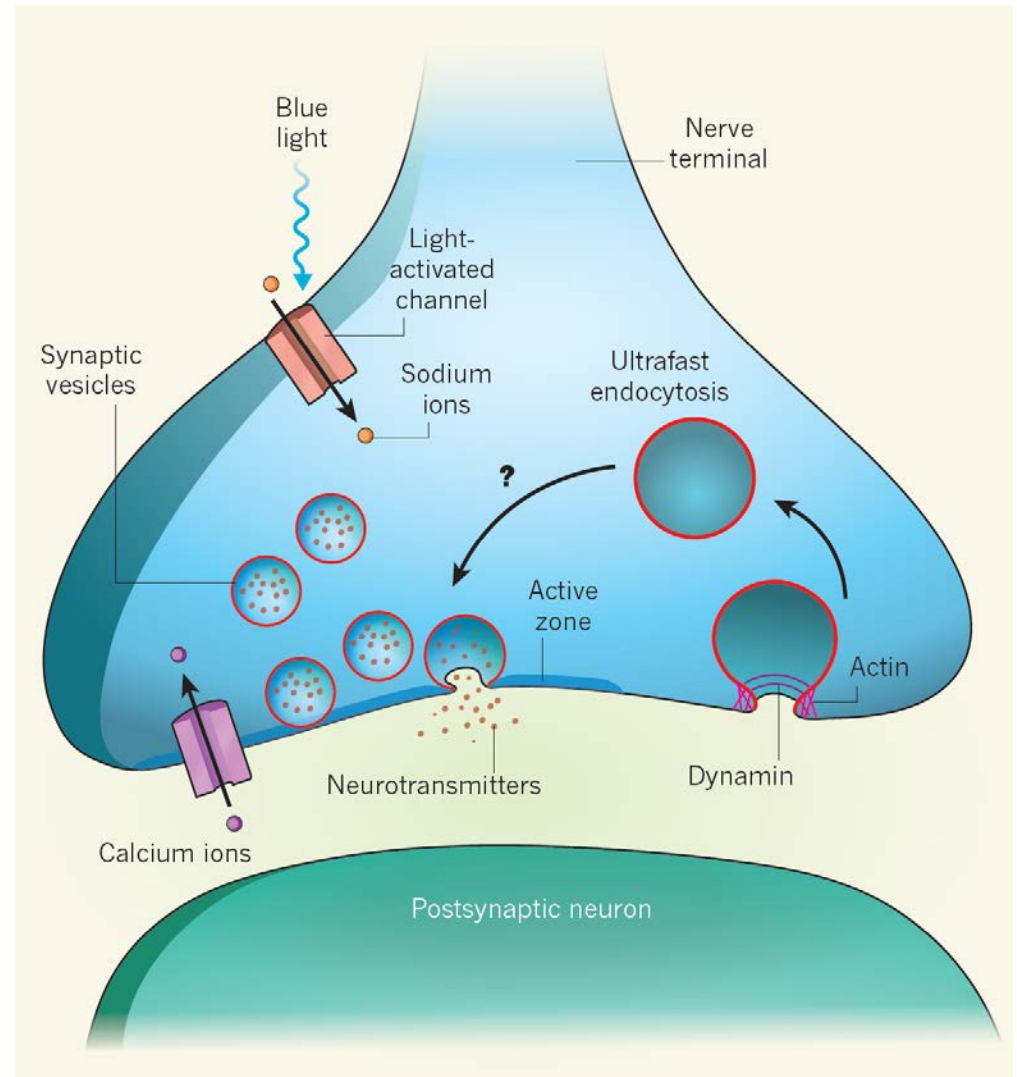
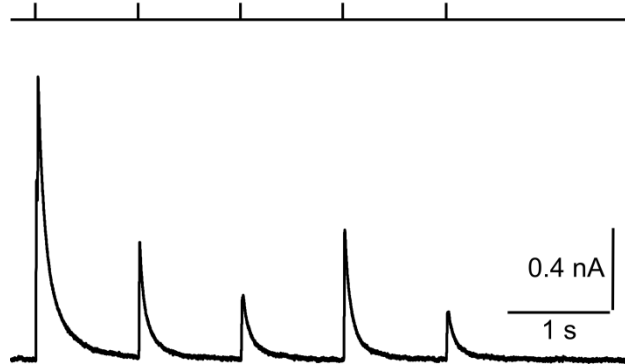
Miniaturní EPSP
vznikají uvolněním
jednoho synaptického
váčku

Optogenetická technika stimulace synaptického přenosu

Channelrhodopsin 2



blue light flashes



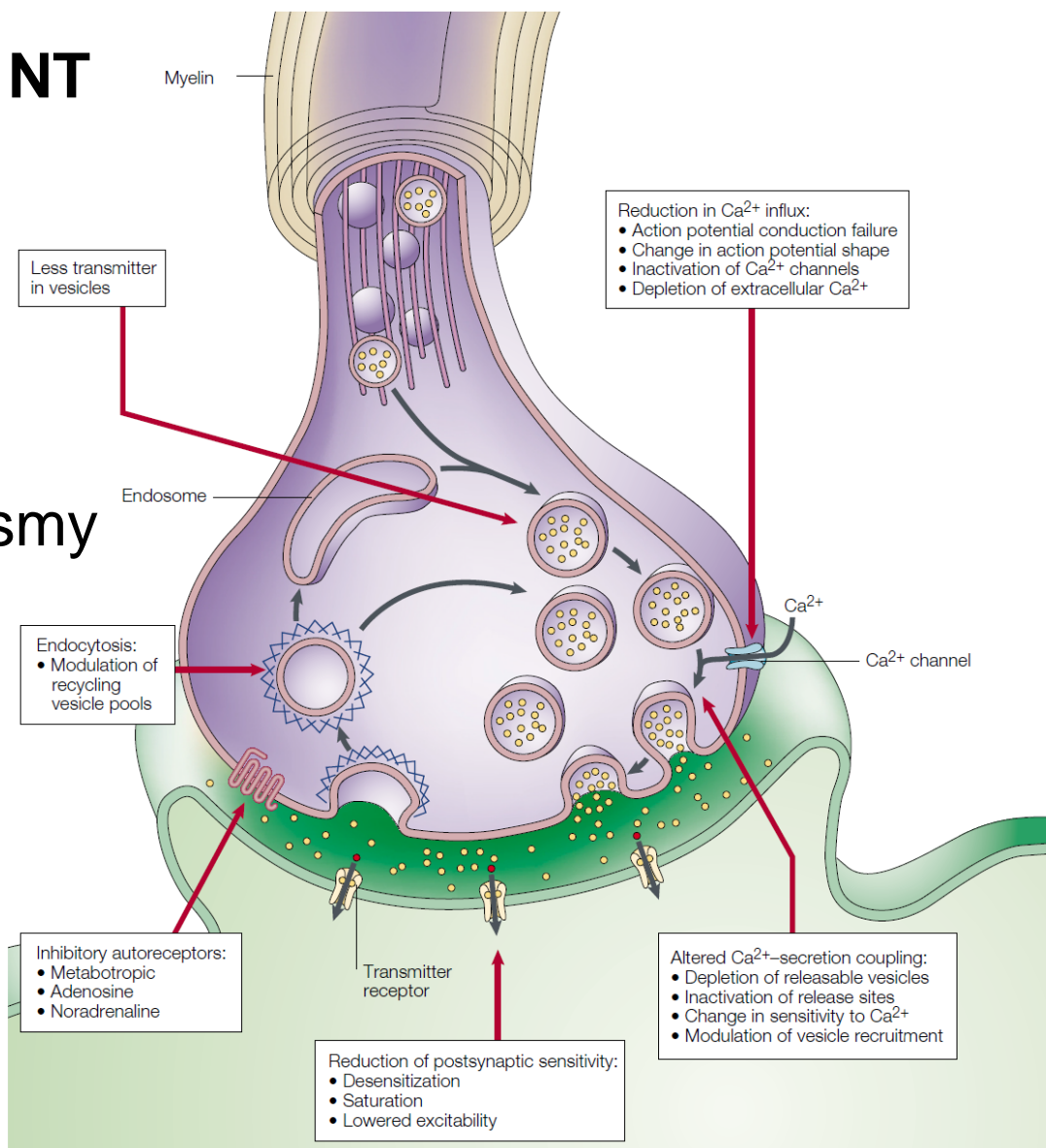
Nagel et al., PNAS, 2003

Plasticita synaptického přenosu

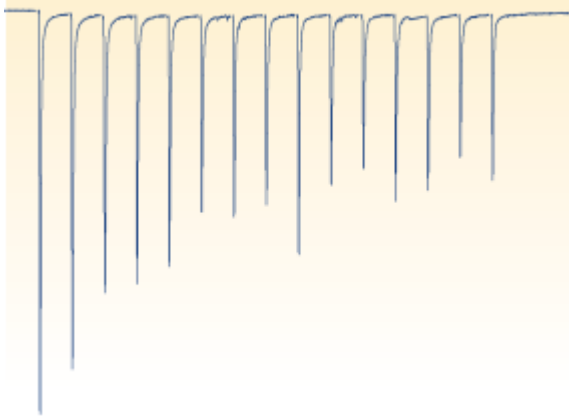
Cyklus SV nebo cyklus NT

- krátkodobá plasticita
vs.
dlouhodobá plasticita

- presynaptické mechanismy
vs.
postsynaptické mechanismy

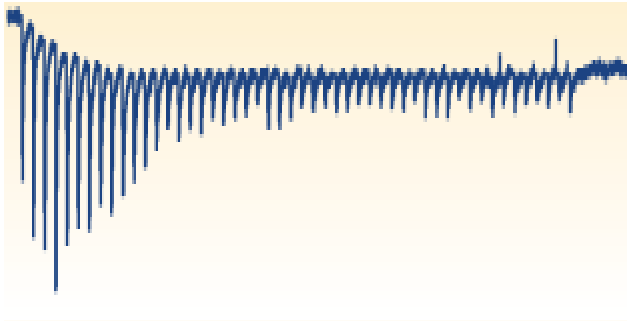


Krátkodobá synaptická plasticita



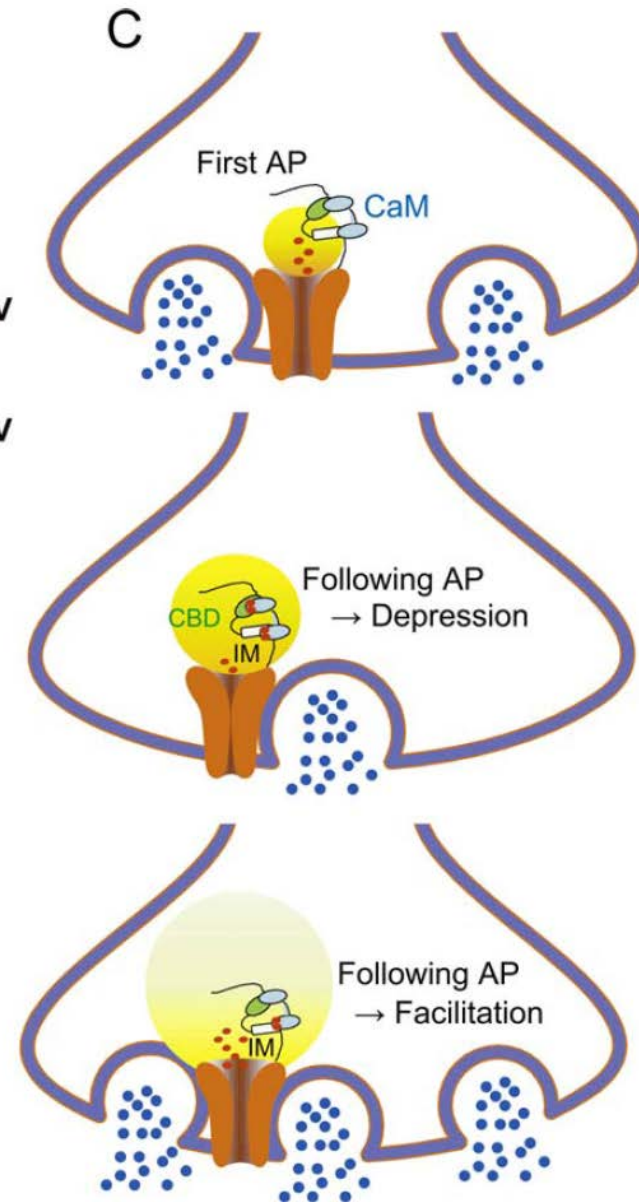
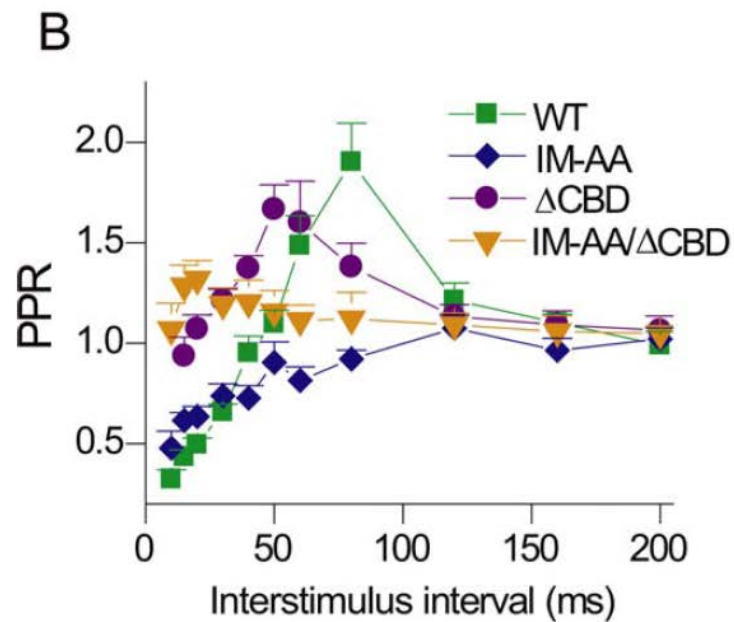
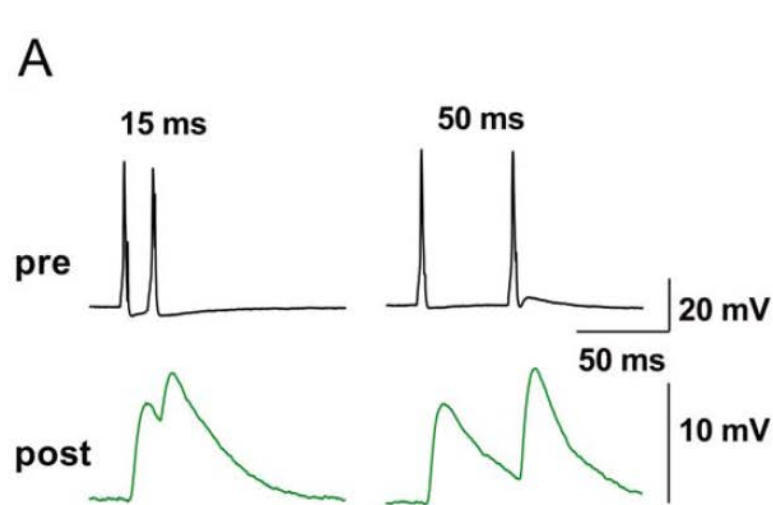
Presynaptická deprese – opakovaná stimulace presynaptického neuronu vede k přechodnému vyčerpání synaptických váčků. Pokles amplitudy EPSC.

Postsynaptická deprese – desenzitizace receptorů

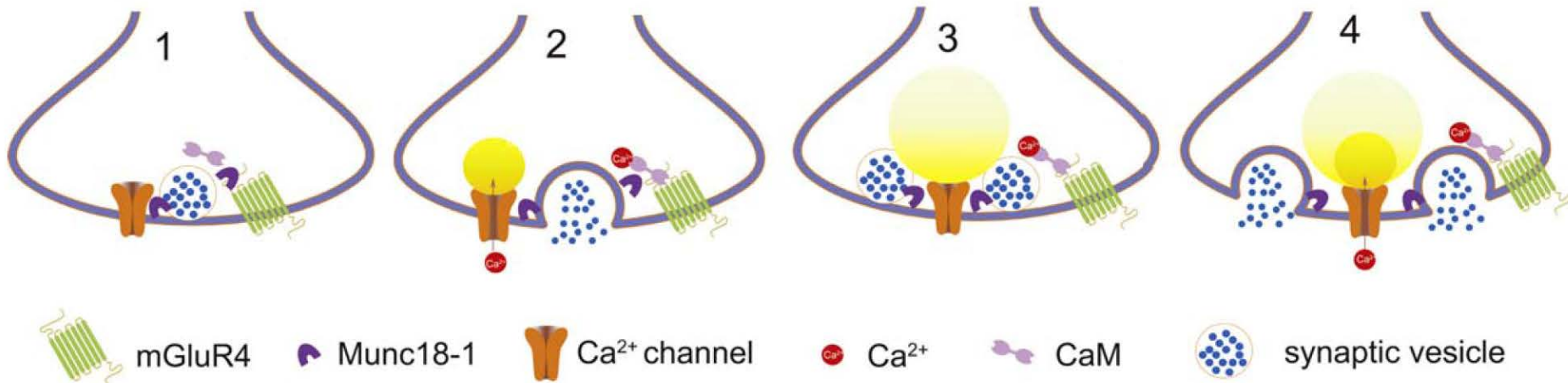
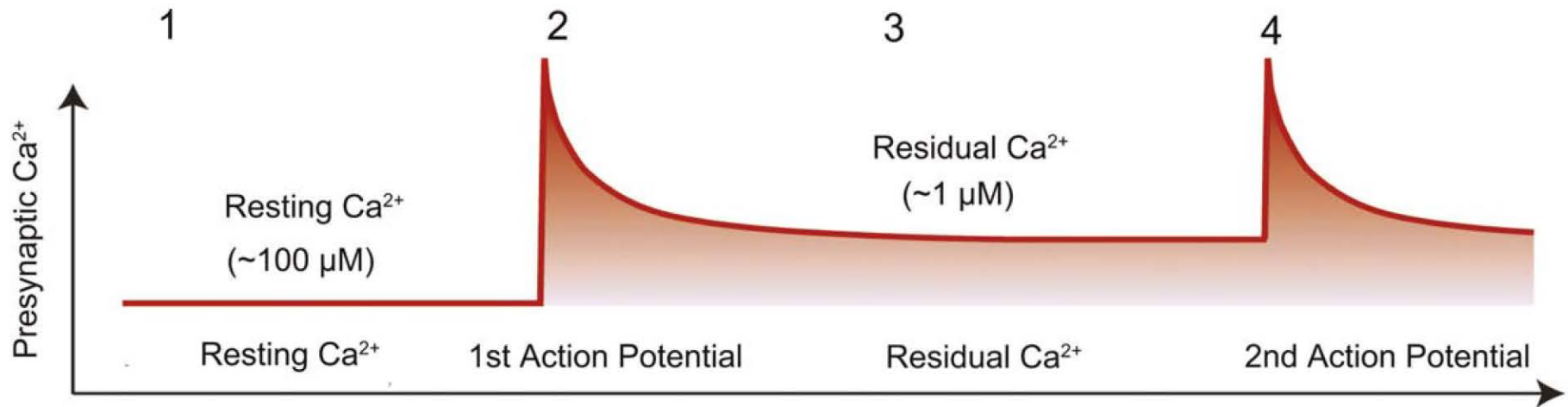


Facilitace – při vysokofrekvenční stimulaci dochází k nahromadění Ca v presynaptickém neuronu, což vede ke zvýšení pravděpodobnosti uvolnění synaptických váčků.

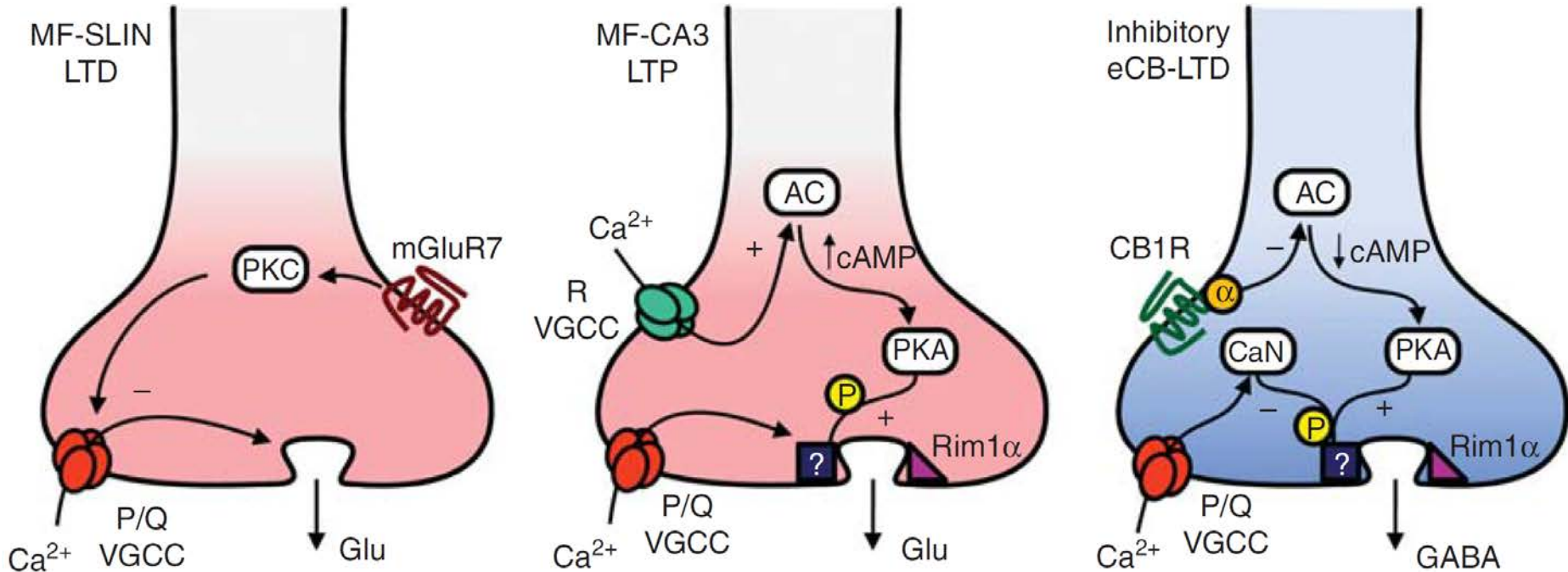
Presynaptická facilitace a deprese



Mechanisms utilizing residual Ca^{2+}



Presynaptická LTP a LTD

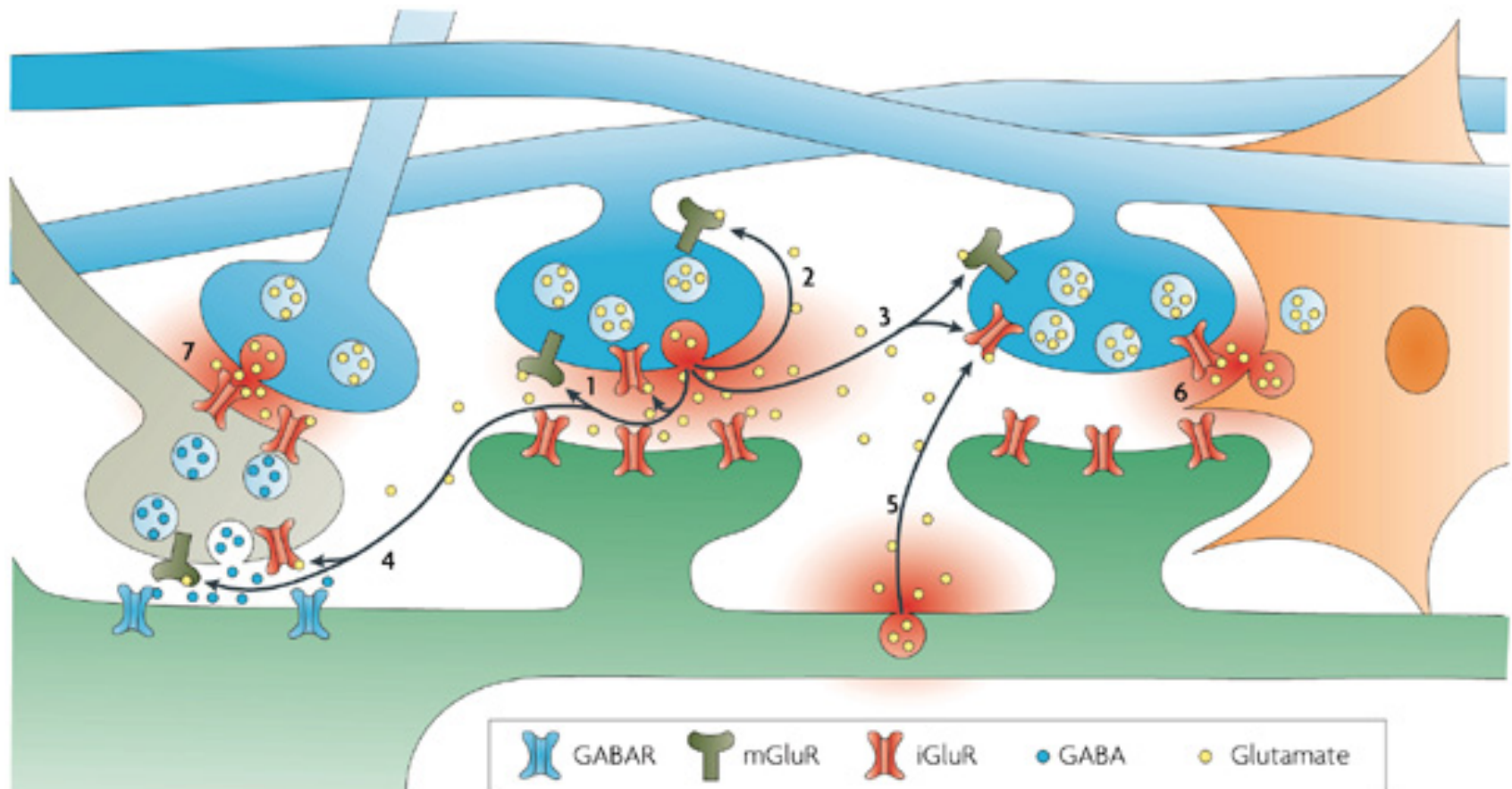


Změna aktivity presynaptických Ca²⁺ kanálů

Změna sekrečního aparátu

Homosynaptická a heterosynaptická modulace

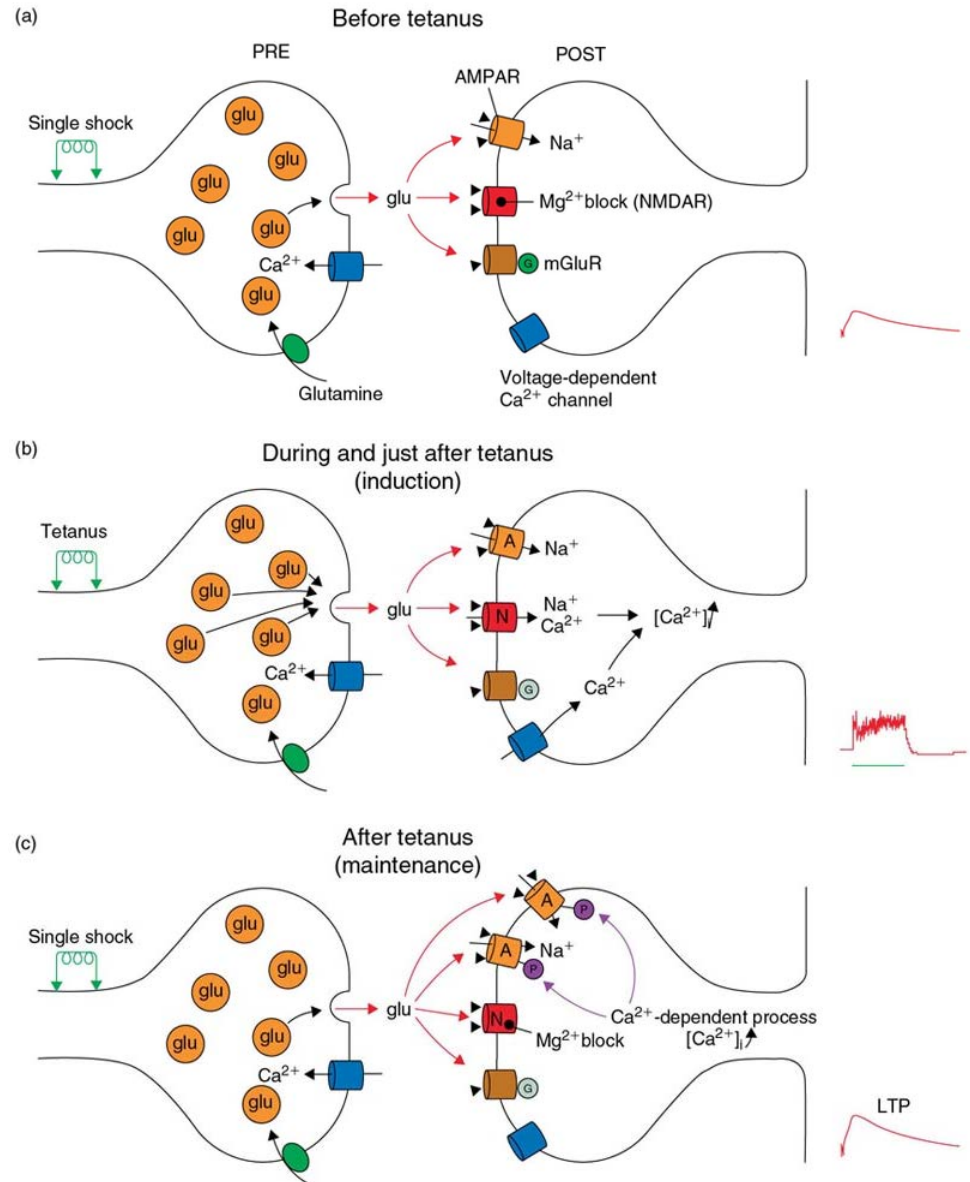
Presynaptické autoreceptory a heteroreceptory



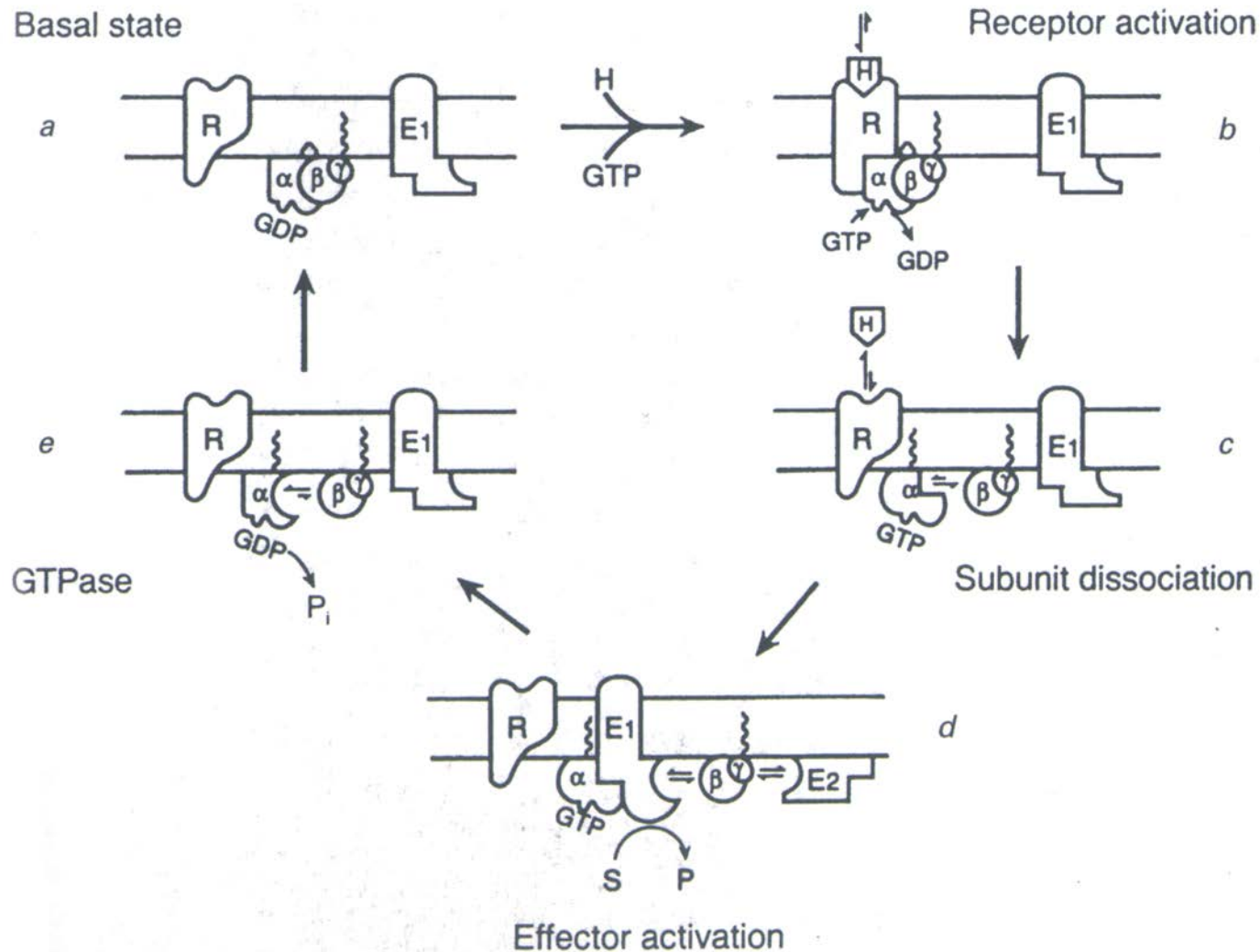
Postsynaptická LTP a LTD

Silent synapses

NMDAR – Ca²⁺ signál –
-> CaMKII – inserce nových
AMPA receptorů. Vysoko-
frekvenční stimulace – LTP
Nízkofrekvenční - LTD

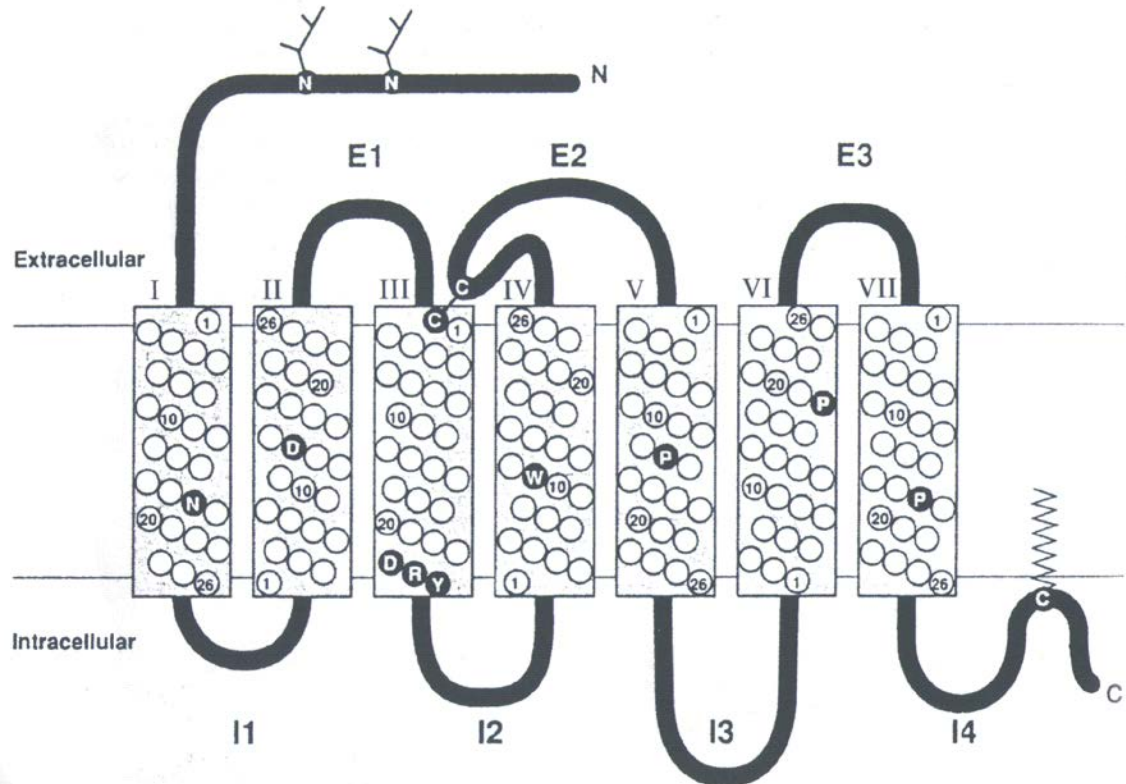
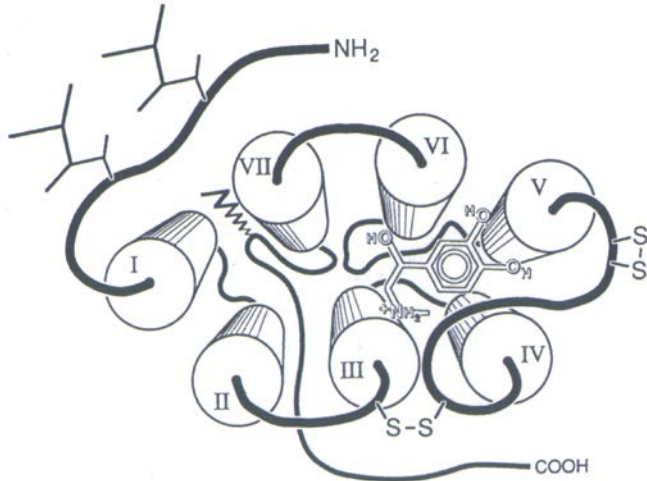


Pomalý synaptický přenos – receptory spřažené s G-proteiny (GPCR)



Topologie GPCR (heptahelikální)

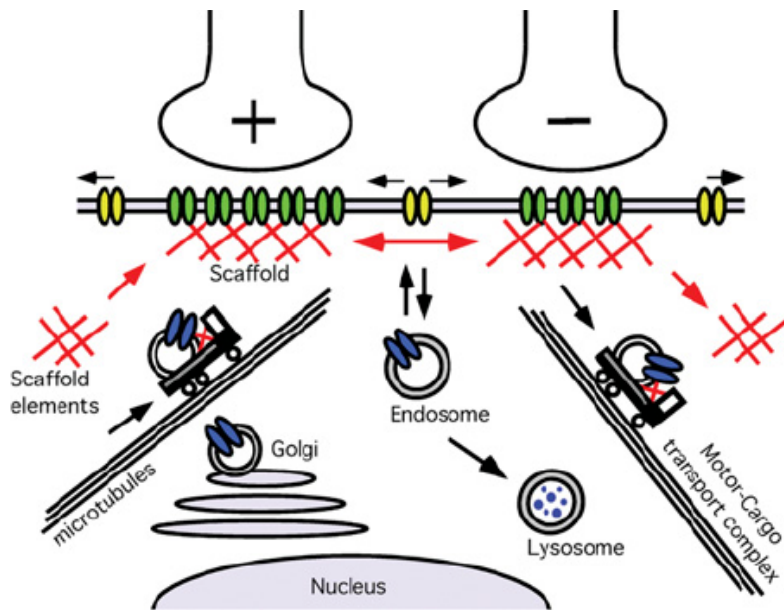
7 TM oblastí, 3 extracelulární a 3-4 intracelulární smyčky, vazebné místo pro agonisty s malou MW je v membráně mezi TM oblastmi, receptory pro peptidy – vazebné místo na prodlouženém N-konci, I2 – I4 (C-konec palmitován) jsou zapojeny v interakcích s G-proteiny.



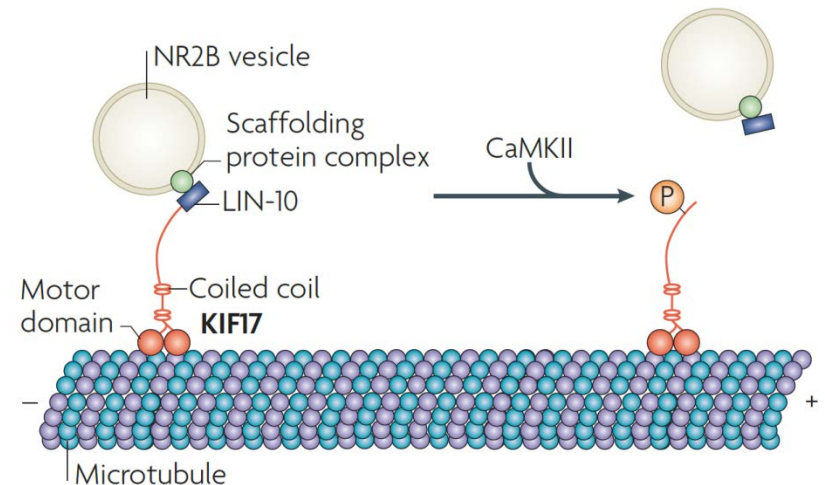
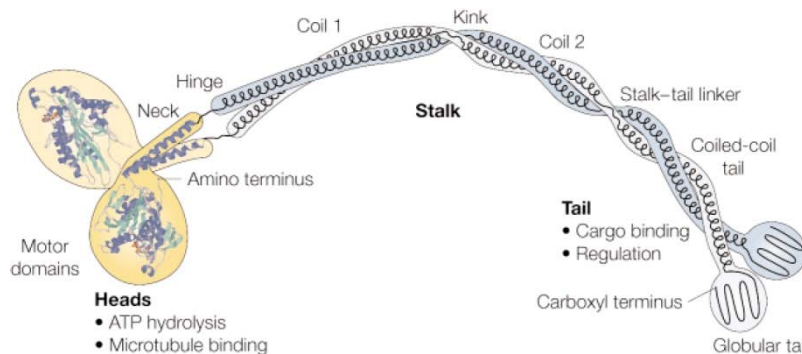
Třídění GPCR:

- A (rhodopsin-like) (acetylcholine, amines, peptides)
- B (secretin receptor family) (peptides, hormones)
- C (mGluR/pheromone) (glutamate, GABA)
- D (pheromone)
- E (cAMP receptors)
- Frizzled

Trafficking, targeting



Anterográdní a retrográdní transport. Mikrotubuly. Myosinové motorické proteiny, kinesin, dynein. Na aktivitě-závislé cílení. Ca – CaMKII – fosforylace motor. proteinů – odpojení váčků. Fosforylace mikrotubulů – přesměrování.



Woehlke, *Nat. Rev. MCB*, 2000
Hirokawa, *Nat. Rev. MCB*, 2009

Přehled mediátorů

- 1) Acetylcholin
- 2) Glutamát a aspartát
- 3) GABA a glycin
- 4) Biogenní aminy
- 5) Purinergní systémy
- 6) Peptidy
- 7) Kannabinoidy
- 8) Plynné mediátory

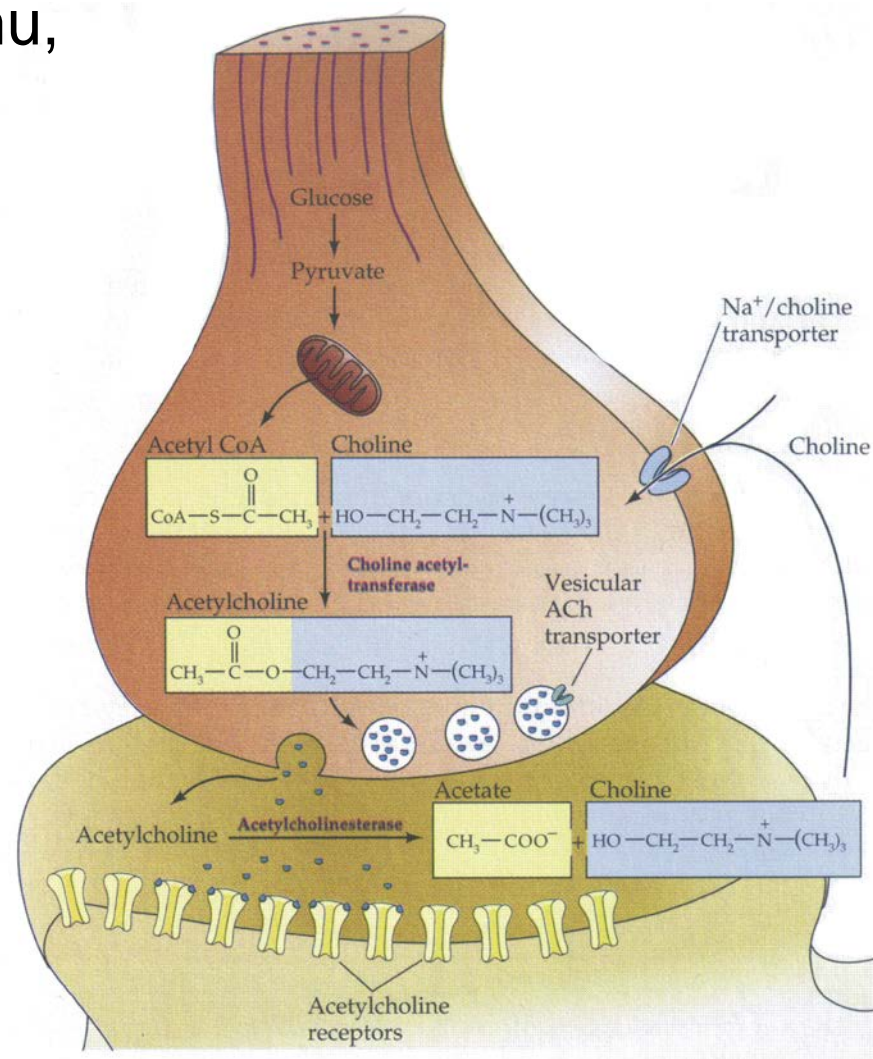
Acetylcholin

Výskyt: nervosvalové spojení, ganglia viscerálního motorického systému, CNS

Efekt: hl. excitační

Prekurzory: Cholin + acetyl CoA

Inaktivace: AChesteráza



Acetylcholinové receptory

- 1) Nikotinové, nAChR (ionotropní)
agonista: nikotin (listy *Nicotinia tabacum*)
antagonista: tubocurarine (kůra *Chondrodendron tomentosum*)

- 2) Muskarinové, mAChR
(metabotropní)
Heptahelikální, GPCR
agonista: muskarin (plodnice *Amanita muscaria*)
antagonista: atropin (*Atropa belladonna*)



Acetylcholinové receptory

- 1) Nikotinové, nAChR (ionotropní)
agonista: nikotin (listy *Nicotinia tabacum*)
antagonista: tubocurarine (kůra *Chondrodendron tomentosum*)



- 2) Muskarinové, mAChR
(metabotropní)
Heptahelikální, GPCR
agonista: muskarin (plodnice *Amanita muscaria*)
antagonista: atropin (*Atropa belladonna*)



nAChR:

Podjednotky:

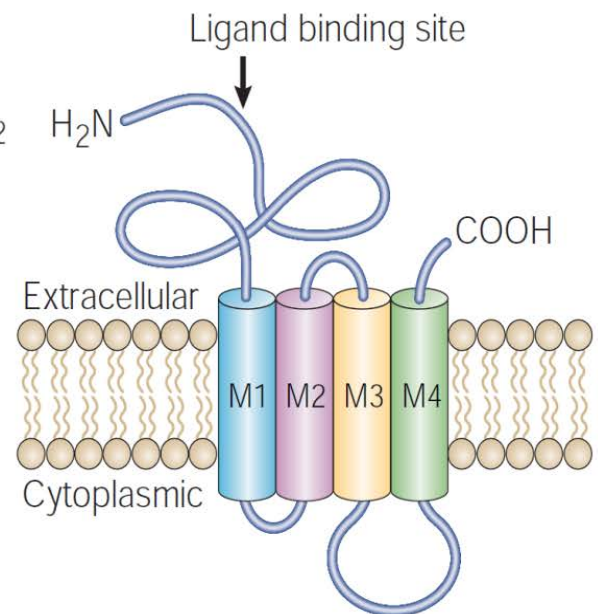
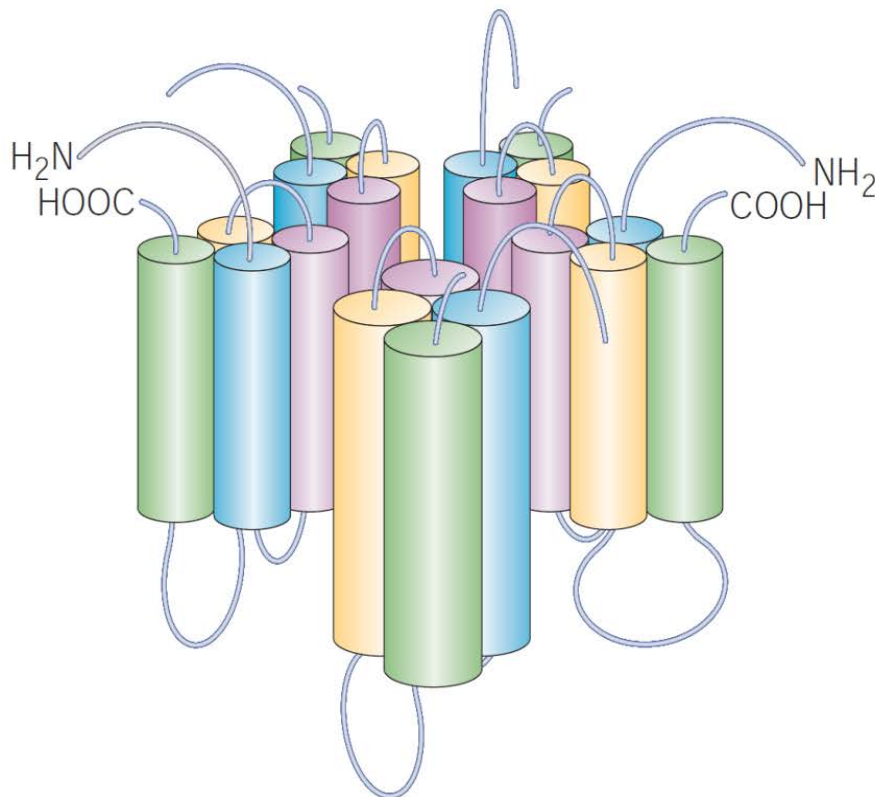
- α 1-10 (vazba ligandu)

- β 1-4

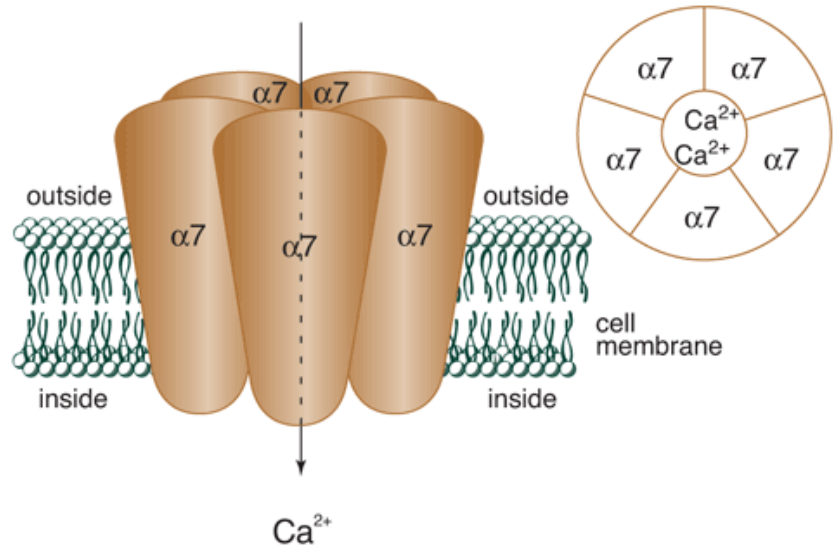
- γ

- δ

- ϵ



Five $\alpha 7$ subunits form an $\alpha 7$ homo-oligomeric nAChR



nAChR:

Podjednotky:

- $\alpha 1-10$ (vazba ligandu)

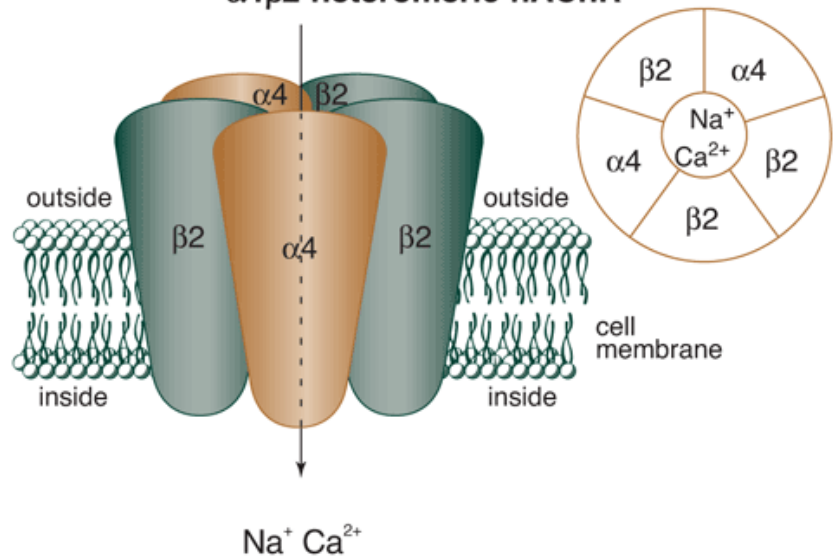
- $\beta 1-4$

- γ

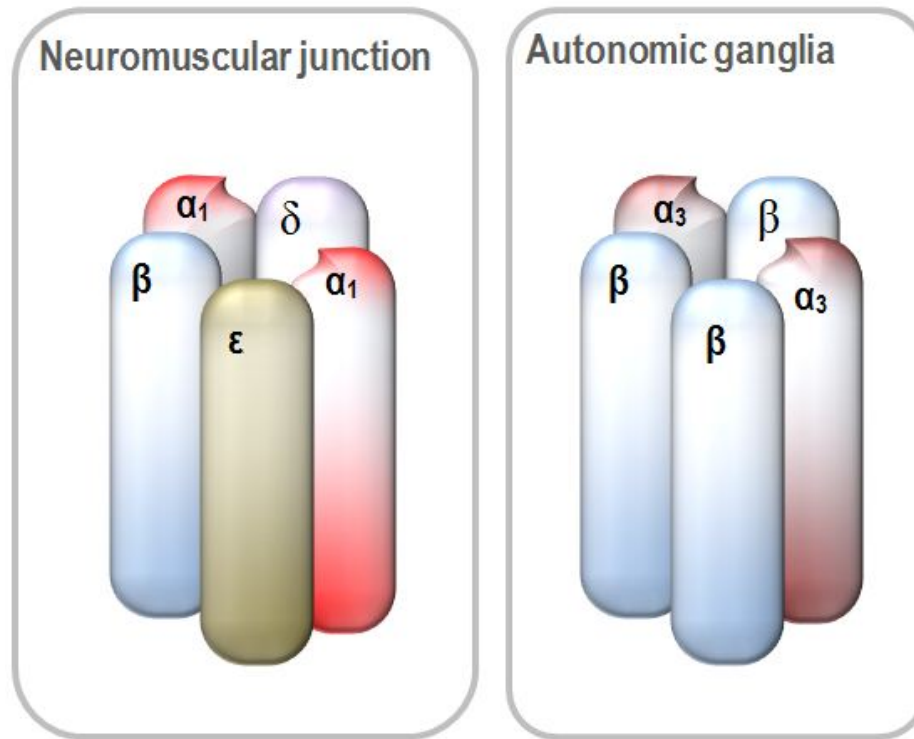
- δ

- ϵ

Two $\alpha 4$ and three $\beta 2$ subunits form an $\alpha 4\beta 2$ heteromeric nAChR



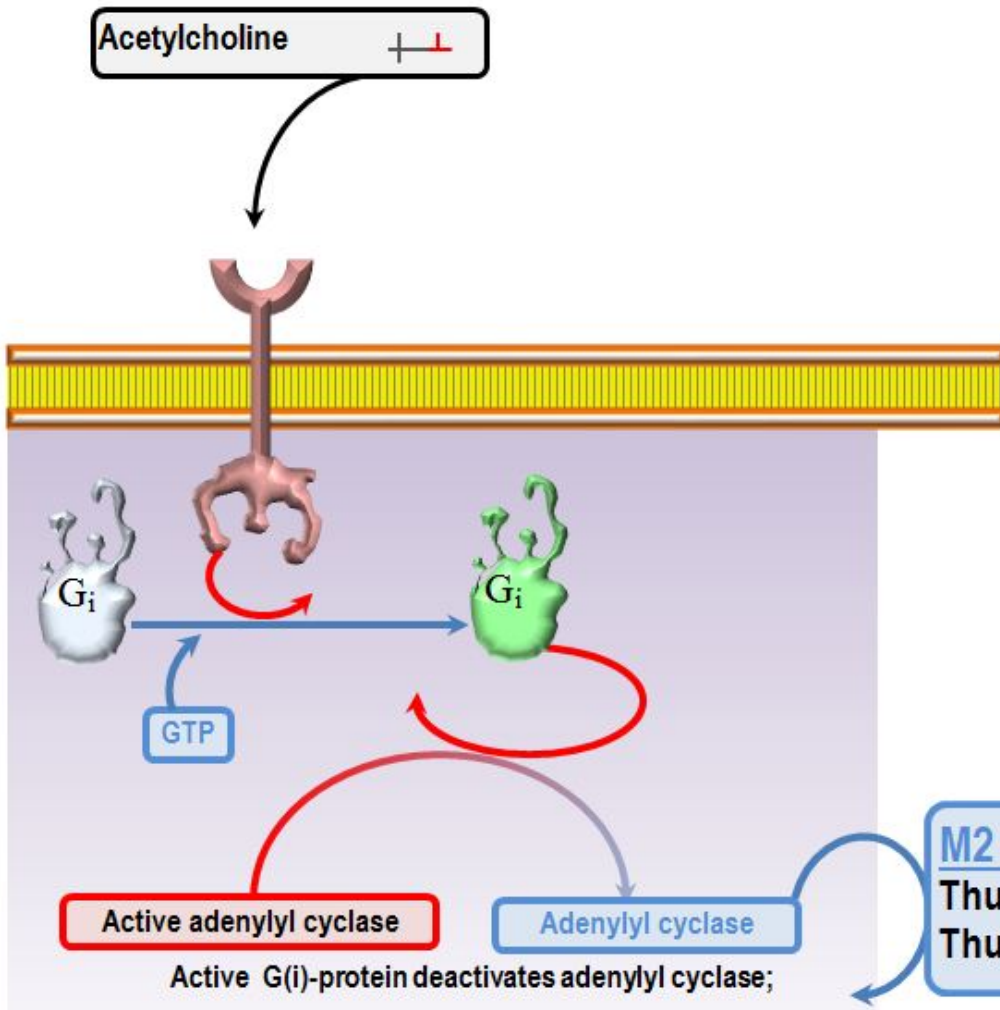
nAChR:



Různé kombinace podjednotek v nativních receptorech:

- Homopentamery α_7 , α_8 , α_9 - CNS
- Heteropentamery, např. $\alpha_1\beta_1\epsilon(\gamma)\delta$ – nervosvalové sp.
Embryonální (γ) vs dospělé (ϵ)
- α_2 -10, β_2 -4 neuronální typy receptorů

Mechanismy působení mAChR



1. inhibice adenylylát
cyklázy

(α : M2, M4)

2. stimulace fosfolipázy C

(M1, M3, M5)

3. regulace iontových
kanálů

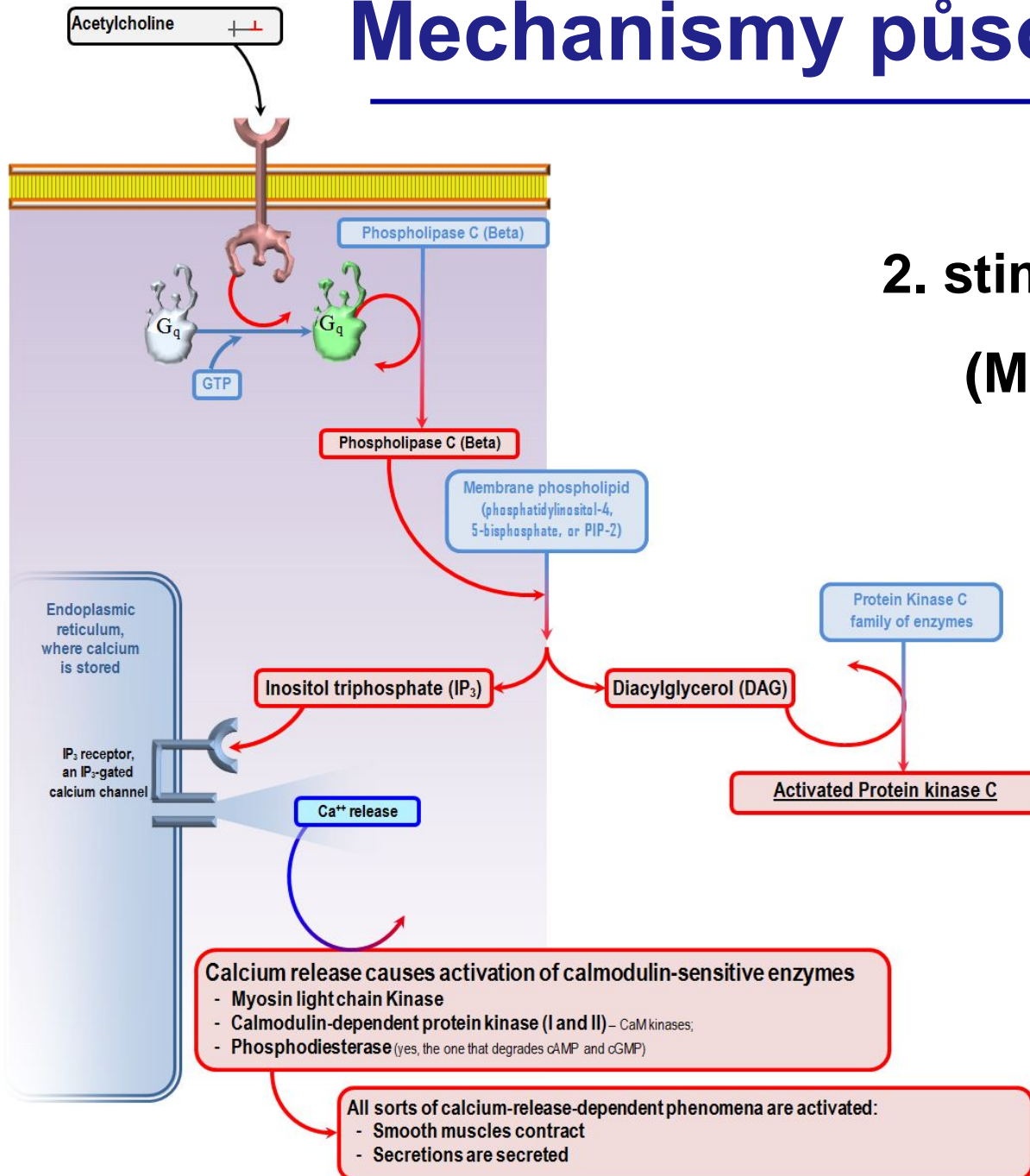
($\beta\gamma$: M2, M4)

M2 or M4 activation = A decrease in cAMP

Thus, no Protein Kinase A

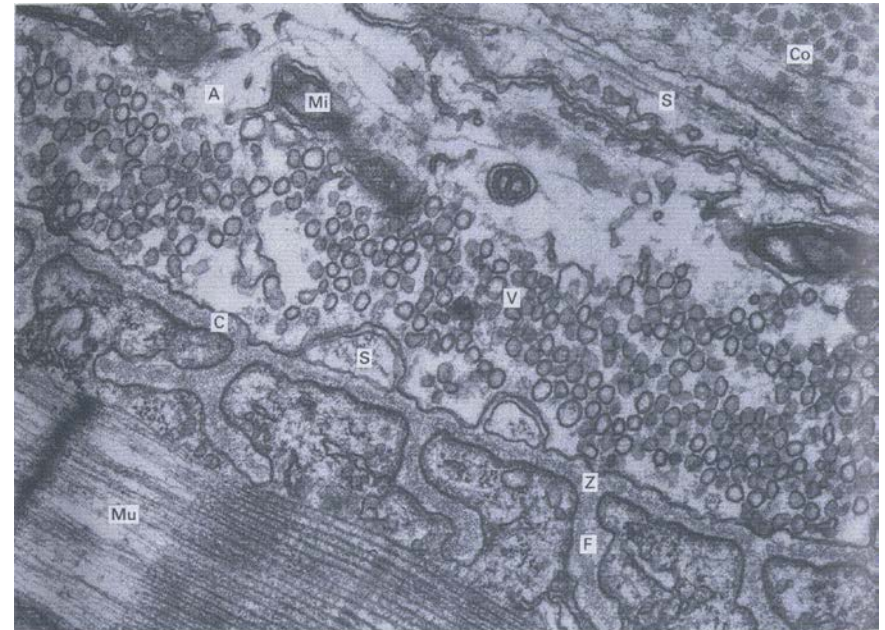
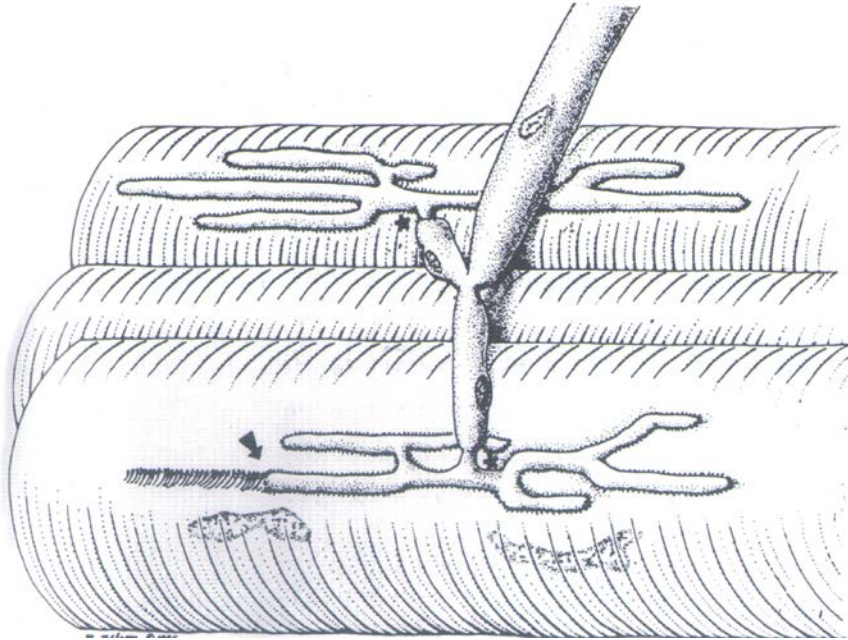
Thus, no phosphorylated Phosphorylase Kinase.

Mechanismy působení mAChR

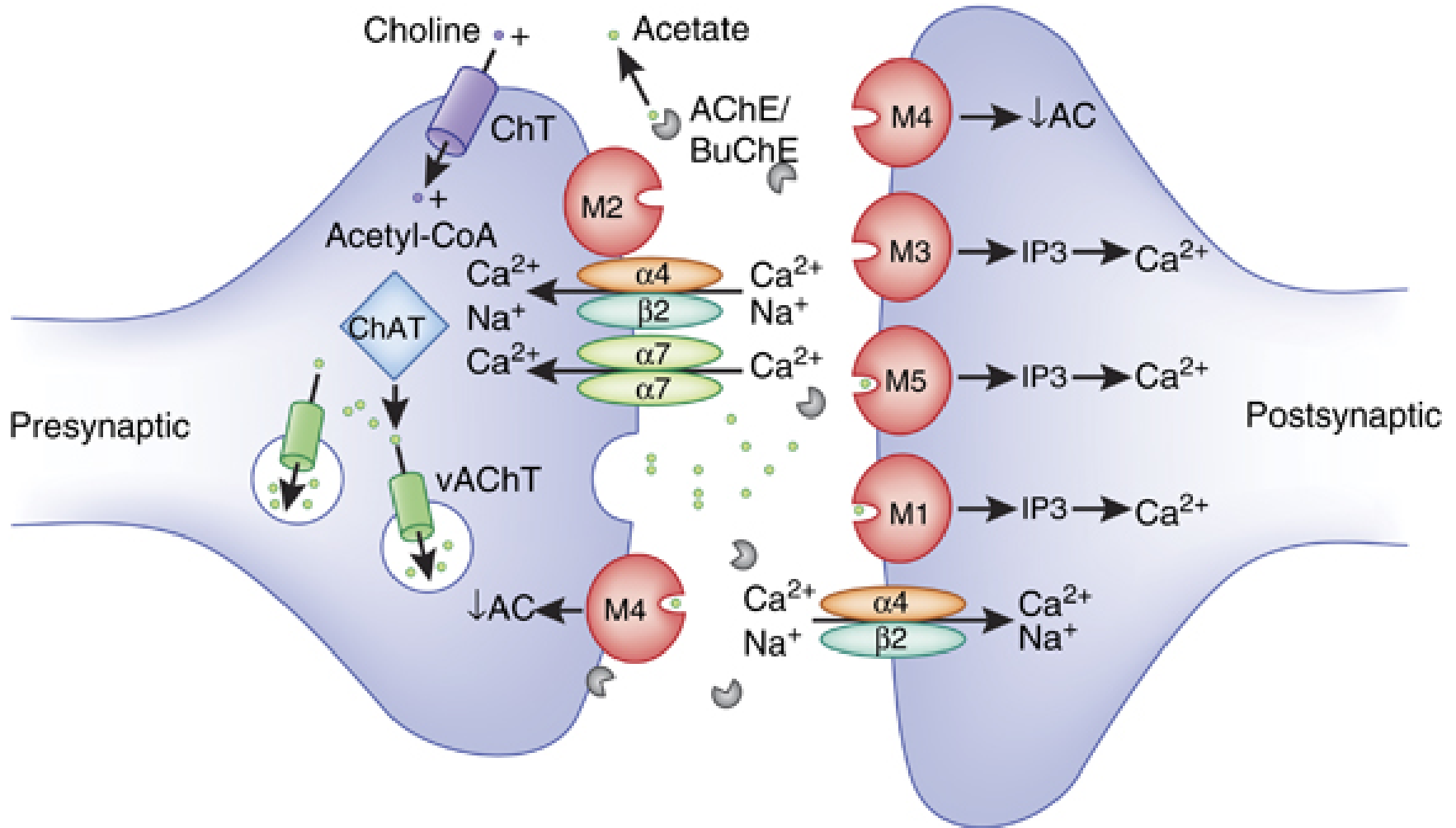


2. stimulace fosfolipázy C (M1, M3, M5)

Nervosvalová ploténka



Cholinergní synapse

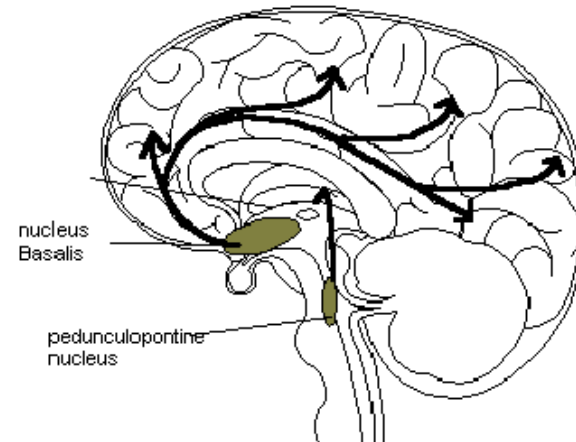


Význam cholinergních systémů

- motorika
- učení, paměť: nACh receptory se účastní LTP v hippocampu, presynaptické modulátory, inhibice muskarinových receptorů (atropin) -
- poruchy učení, zdroj cholinergních vl. v nucleus basalis – léze v nb - poruchy učení, bazální ganglia

- Alzheimerova choroba

major cholinergic projections



Nucleus basalis projects to the neocortex
PPN projects to the thalamus

Alzheimerova choroba

Neurodegenerativní onemocnění, demence, postižení kognitivních funkcí, akumulace β -amyloidních peptidů v mozku.

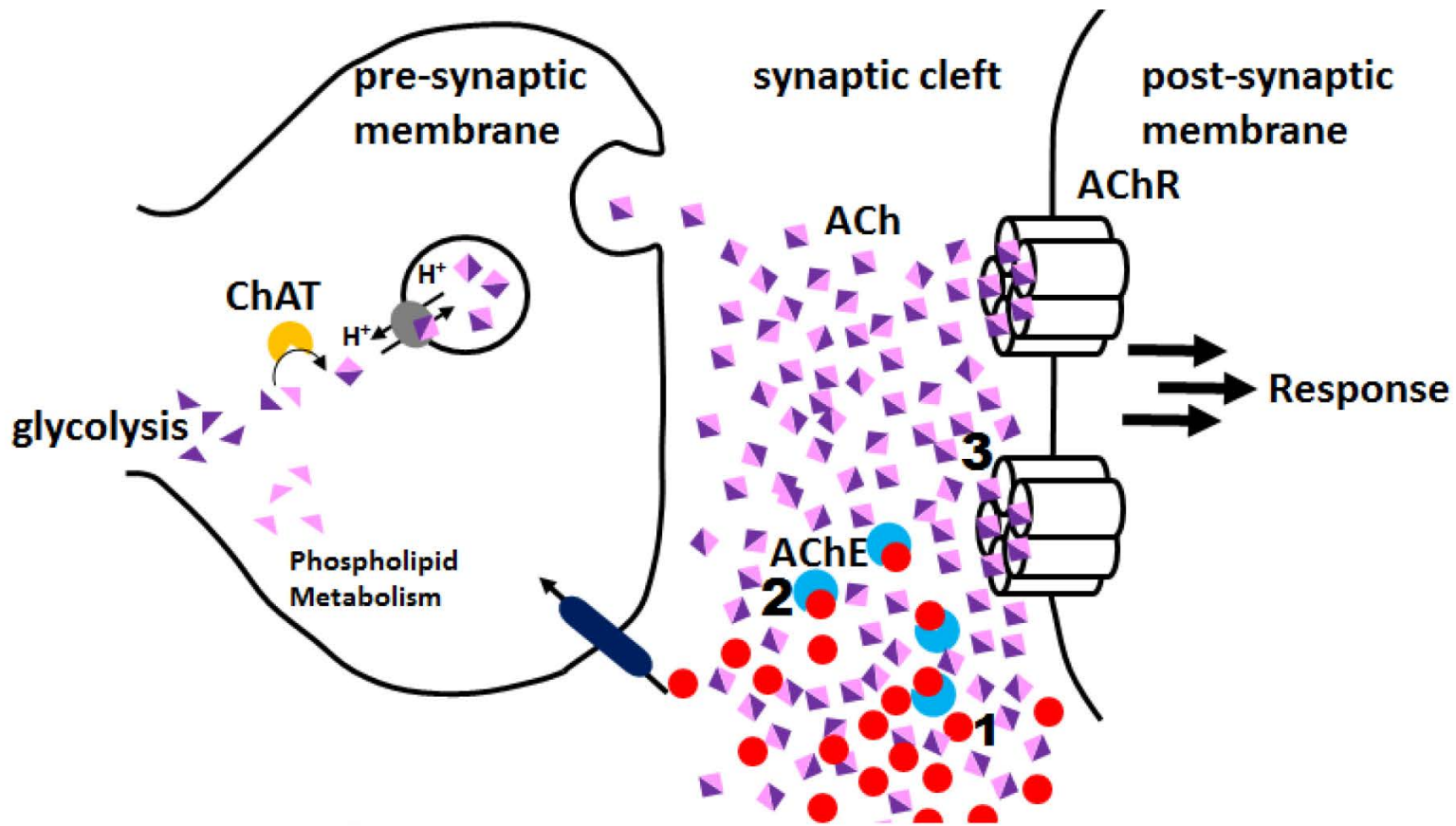
Časná ACH (5%), <60 let, dědičná, 160 mutací na chr. 21, 14, 1, které způsobují nadměrnou produkci β A -> neurotoxicita.








Pozdní ACH, >60, nejasná dědičnost, ale genetické faktory hrají úlohu, mutace genu pro apolipoprotein E (transport cholesterolu a metabolismus lipidů).

Postižení oblastí mozku důležitých pro paměť a učení a vyšší poznávací funkce. Cholinergní hypotéza AD. Cholinergní systémy předního mozku, hipokampus, kůra. Degenerace neuronů. Ztráta cholinergních neuronů v nucleus basalis, zmírnění inhibicí ACh transferázy.

Organofosfáty

pesticidy – inhibují AChE – hromadění ACh a nervo-svalová paralýza, DTT, Sarin



acetyltransferase (ChAT ) Choline (Ch ) AcetylCholine (ACh ) Acetic acid (Aa ) Acetylcholinesterase (AChE )
choline receptors (AChR ) Pesticide (P )