

# Principi neurotransmisije biogenim aminima

---

Miočić-Stošić, Fran

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:229303>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

Fran Miočić-Stošić

Student 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

# **Principi neurotransmisije biogenim aminima**

## **Završni rad**

Rad je izrađen na Zavodu za biokemiju

Mentor rada: Doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Zagreb, 2019. godina.



Datum predaje prve verzije Završnog rada:

9. kolovoza 2019.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita:

20. rujan 2019.

Mentor rada: Doc. dr. sc. Aleksandra Maršavelski

Potpis:



## Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII-VIII
§ 1. UVOD .....	1
1.1. Vrste: biogeni amini i ostali neurotransmiteri .....	1
1.1.1. Neurotransmiteri i njihove vrste .....	1
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME .....	3
2.1. Sinteza i struktura biogenih amina .....	3
2.1.1. Podjele biogenih amina .....	3
2.1.2. Sinteza kateholamina .....	4
2.1.3. Sinteza inidolamina.....	6
2.1.4. Sinteza imidazolamina .....	7
2.2. Pakiranje sintetiziranih neurotransmitera u vezikule.....	87
2.2.1. Uloga vezikula u prenošenju signala .....	8
2.2.2. Uloga i mehanizam VMAT prijenosnika .....	8
2.3. Egzocitoza neurotransmitera pod utjecajem Ca <sup>2+</sup> .....	10
2.3.1. Uloga kalcijevih iona u procesu egzocitoze.....	10
2.3.2. Ciklus sinteze i razgradnje vezikula.....	11
2.4. Vežanje neurotransmitera na receptor te stanični odgovor na signal.....	13
2.4.1. Vežanje i vrste receptora biogenih amina.....	13
2.4.2. Podjela i podvrste receptora pojedinih neurotransmitera .....	14
2.5. Deaktivacija neuroprijenosnika.....	16
2.5.1. Uklanjanje neurotransmitera iz sinaptičke pukotine pomoću reuptake mehanizma.....	16
2.6. Recikliranje i razgradnja neurotransmitera nakon prijenosa signala.....	1819
2.6.1. Alternativni načini uklanjanja neurotransmitera te njihova kataboliza .....	1819
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	2021



## § Sažetak

Pregled procesa neurotransmisije u neuronskim putevima koji koriste biogene amine kao primarne glasnike, uz posebnu pozornost danu monoaminskim neurotransmiterima koji se nalaze najčešće u živčanom sustavu: dopamin, norepinefrin, epinefrin, histamin, serotonin. Signal na početku neurotransmisije predstavlja električni podražaj koji dolazi na terminalni dio presinaptičkog neurona, nakon čega slijedi depolarizacija membrane te otvaranje  $\text{Ca}^{2+}$  kanala. Povećanje intracelularne koncentracije kalcijevih iona potiče fuziju vezikula, koje sadrže spremljene neurotransmitere, s membranom neurona na području sinapse. Izlučeni neurotransmiter se zatim veže na receptore na postsinaptičkom neuronu koji su specifični za pojedinu vrstu neurotransmitera i za signalni put unutar kojeg djeluje signalna kaskada. Vežanje na receptor uzrokuje odgovor postsinaptičkog neurona ovisno o vrsti receptora na koji je vezan. Nakon aktivacije receptora signalna molekula difundira nazad u sinaptičku pukotinu, gdje može biti i) hidrolitički razgrađena, ii) unesena u glijalne stanice preko pripadnih prijenosnika te katabolizirane u metabolički otpad iii) unesena nazad u presinaptički neuron pomoću membranskih transportnih proteina te se sprema u vezikule reciklirane u ciklusu sinaptičkih vezikula, gdje se akumulira za novu egzocitozu nakon dolaska električnog signala.



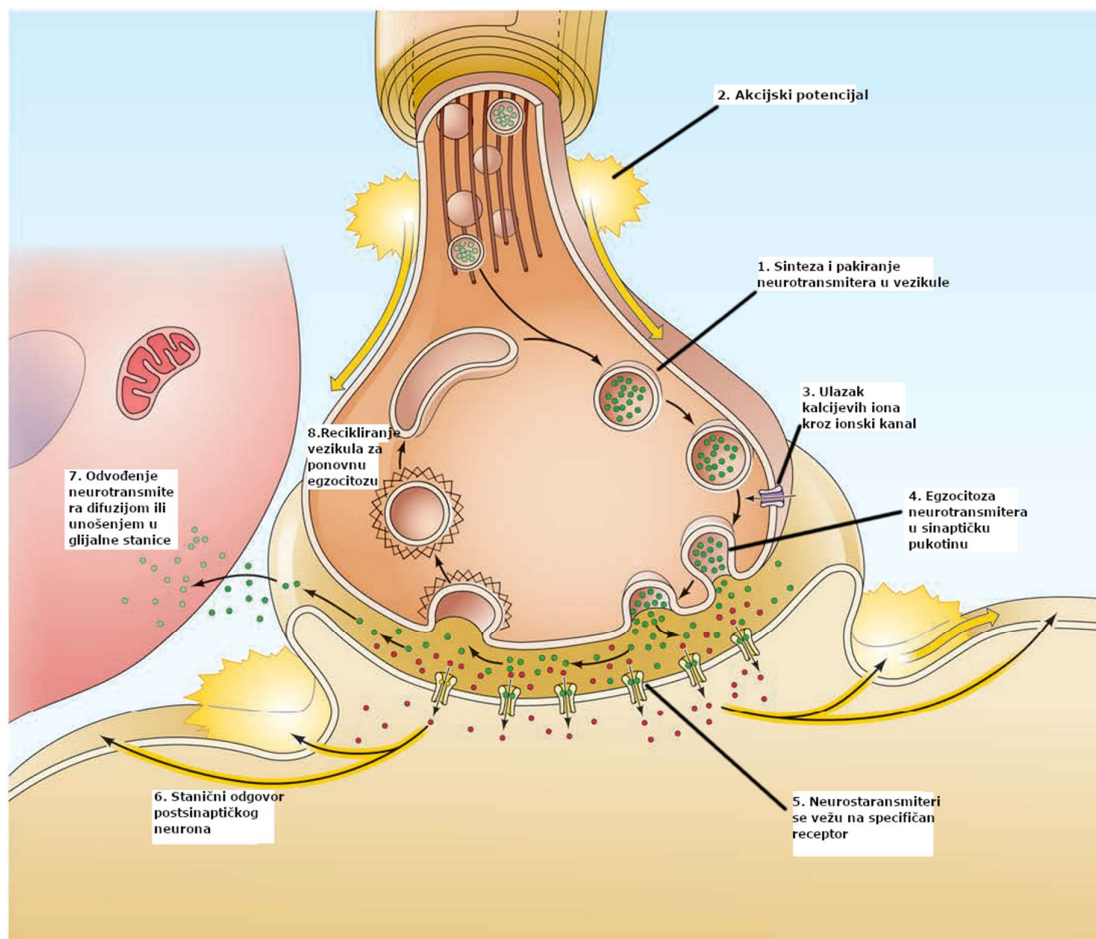
## § 1. UVOD

### 1.1. Vrste: biogeni amini i ostali neurotransmiteri

#### 1.1.1. *Neurotransmiteri i njihove vrste*

Neurotransmiteri su široka skupina kemijskih glasnika koji prenose živčani signal preko sinapse, prostora između aksona živčane stanice koja prenosi podražaj te dendrita ciljane živčane stanice koja prima podražaj. Da bi kemijski spoj bio klasificiran kao neurotransmiter mora zadovoljavati četiri osnovna uvjeta: i) neurotransmiter mora biti sintetiziran u predsinaptičkom neuronu, ii) sintetizirani neurotransmiteri se pohranjuju u sinaptičke vezikule te njihovo otpuštanje mora biti regulirano, iii) postojanje specifičnih receptora za neurotransmiter na membrani postsinaptičkog neurona te, iv) mora postojati mehanizam za uklanjanje neurotransmitera s aktivnog mjesta i sinaptičke pukotine. Vezanje neurotransmitera na receptor postsinaptičkog neurona uzrokuje aktivaciju unutarstaničnog odgovora. Najučestaliji rezultat vezanja je depolarizacija membrane postsinaptičkog neurona te nastavak gibanja električnog signala duž postsinaptičkog neurona.<sup>1,2</sup>

Kemijski glasnici pokazuju široki spektar kemijske raznolikosti te srodni spojevi pokazuju sličnosti u principu djelovanja. Postoji preko 200 identificiranih neurotransmitera. Osnovna podjela se temelji na veličini neurotransmitera, neuropeptidi su veće molekule od 3 do 40 aminokiselina dok su ostali, učestaliji, kategorizirani kao mali glasnici.<sup>2</sup> Mali glasnici su relativno mali kemijski spojevi, koji često imaju jednostavne puteve sinteze iz metaboličkih međuprodukata. Najpoznatiji predstavnik je acetilkolin, koji djeluje kao prijenosnik živčanog signala na mišić te uzrokuje kontrakcije. Aminokiselinski neurotransmiteri raznovrsni su u kemijskoj strukturi, a među najistaknutijima su glutamat, aspartat,  $\gamma$ -aminomaslačna kiselina (GABA) i glicin. Purinski prijenosnici poput ATP-a služe kao integralni dio metabolizma te predstavljaju lako dostupne spojeve za prijenos signala bez velikog utroška staničnih resursa. Kod ostalih neurotransmitera se nalaze plinovite molekule otopljene u staničnoj plazmi (dušikov monoksid, NO) te transmisija pomoću solvatiranih iona (transmisija pomoću  $Zn^{2+}$ ).<sup>1</sup> Skupina neurotransmitera koja će biti opisana u ovom radu su biogeni amini. Najpoznatiji predstavnici ove skupine su dopamin (DA), epinefrin, norepinefrin, serotonin (5-HT) i histidin, a o njihovim podjelama i svojstvima će biti više govora u nastavku rada. Pojednostavljeni prikaz sveukupnog procesa neurotransmisije prikazan je na slici 1.



Slika 1. Pojednostavljeni prikaz neurotransmisije pomoću malih glasnika.<sup>2</sup>

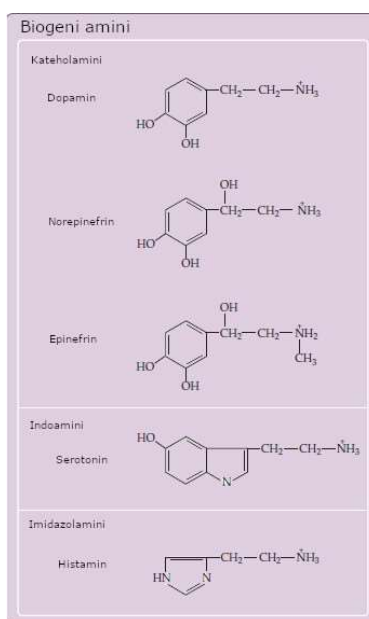
## § 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

### 2.1. Sinteza i struktura biogenih amina

#### 2.1.1. Podjele biogenih amina

Biogeni amini se dijele na podskupine: i) monoamini i, ii) amini nađeni u tragovima. Spojevi koji će se proučavati pripadaju podskupini monoamina, čiji prekursori su aromatske aminokiseline. Svi monoamini (Slika 2.) sadrže strukturni motiv aromatskog prstena za koji je vezana amino skupina preko dva ugljikova atoma (broj supstituenata i oblik aromatskog prstena se razlikuje, ali svi posjeduju rezonanciju). Amini nađeni u tragovima su strukturno slični spojevi monoaminima te najčešće predstavljaju međuprodukte sinteze pojedinih monoamina ili produkte alternativnih biosintetskih puteva. Tijekom neurotransmisije moduliraju aktivnost ostalih neurotransmitera, zbog čega se pretpostavlja da posjeduju receptore na postsinaptičkoj membrani te potenciraju signal prenesen pomoću neurotransmitera.<sup>3</sup>

Monoamini se dijele na katecholamine (dopamin, epinefrin, norepinefrin), imidazolamine (histamin) i indolamine (serotonin). Sinteza monoaminskih neurotransmitera događa se u citosolu terminalnog dijela predsinaptičkog neurona, a prekursori su aromatske aminokiseline (fenilalanin, tirozin, triptofan, histidin) kojih ima u izobilju na terminalnom dijelu predsinaptičkog neurona.<sup>4</sup>

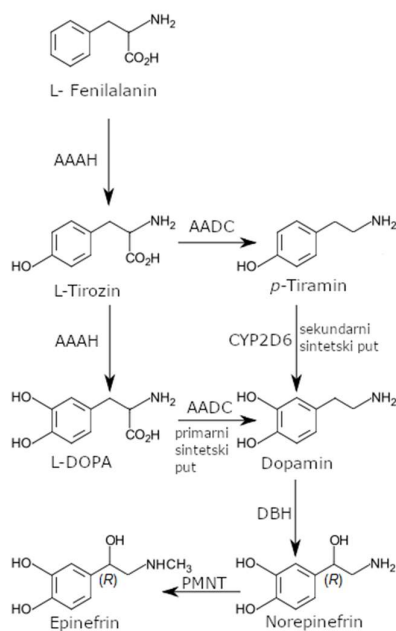


Slika 2. Prikaz struktura klasičnih monoamina.<sup>1</sup>

### 2.1.2. Sinteza kateholamina

Sinteza kateholamina je obuhvaćena jednim sintetskim putem za sva tri spoja koja djeluju kao neurotransmiteri. Naziv su dobili prema njihovoj sličnosti prema spoju kateholu, a zajednički im je strukturni motiv benzenskog prstena, supstituiranog na pozicijama 1 i 2 s alkoholnim skupinama. Dodatno su supstituirani na poziciji 4 s ugljikovodičnim lancem od 2 ugljikova atoma, s amino skupinom vezanom na  $\beta$ -C atom. Sinteza kateholamina najčešće započinje tirozinom, fenilalanin također može služiti kao ishodišni spoj za sintezu. Fenilalanin se može prevesti u tirozin pomoću jedne jednostavne oksidacijske reakcije na poziciji 3 aromatskog prstena pri čemu je reakcija katalizirana enzimom fenilalanin-hidroksilaza. Indikacija važnosti ovog biosintetskog puta je bolest fenilketonurija, koja nastaje kao posljedica mutacija na genu koji kodira enzim fenilalanin-hidroksilazu. Produkt takvog gena je enzim nižeg afiniteta za supstrat fenilalanin, a rezultat je smanjena količina sintetiziranog tirozina, što uzrokuje deficijenciju kateholamina i probleme s mentalnim zdravljem. Prvi korak specifičan za biosintetski put je hidroksilacija benzenskog prstena tirozina, katalizirana je enzimom tirozin-hidroksilaza (TH), kao produkt se dobiva L-DOPA (L-3,4-dihidroksifenilalanin), spoj koji služi kao dodatak prehrani kod deficijencije kateholamina. Prvi je korak u sintetskom putu te upravo ova reakcija određuje brzinu cijelog puta, zato je pomno regulirana na mjestu transkripcije. Nakon sinteze, aktivnost je regulirana pomoću cAMP ovisnih protein kinaza, a o važnosti ovog koraka nam svjedoči činjenica da su mutacije na genima za ekspresiju proteinskih kinaza letalne za embrij. Kofaktori za ovu redukcijско-oksidacijsku reakciju su molekularni kisik i tetrahidrobiopterin, pri čemu svaka od 4 podjedinica enzima TH ima željezov ion vezan na reakcijskom mjestu. Tijekom reakcije se oksidiraju iz oksidacijskog stanja  $2+$  u oksidacijsko stanje  $3+$ , a za regeneraciju kofaktora je potrebno željezo ponovno reducirati što se radi indirektno pomoću NADPH. Nastala L-DOPA se dekarboksilira uz pomoć enzima dekarboksilaze aromatskih aminokiselina (engl. *aromatic L-amino acid decarboxylase*, AAAD) te se dobiva dopamin. AAAD je dimerni protein koji osim dekarboksilacije kateholamina katalizira i niz drugih reakcija dekarboksilacije, između ostaloga sudjeluje u sintezi drugih biogenih amina te amina nađenih u tragovima. Važnost enzima AAAD za druge metaboličke puteve objašnjava strogu regulaciju ekspresije enzima na razini translacije. Ako neuron koristi dopamin kao signalnu molekulu za neurotransmisiju, sintetski put kateholamina ovdje staje zbog nedostatka enzima za katalizu daljnje reakcije te se sintetizirani dopamin sprema u sinaptičke vezikule na presinaptičkom neuronu.

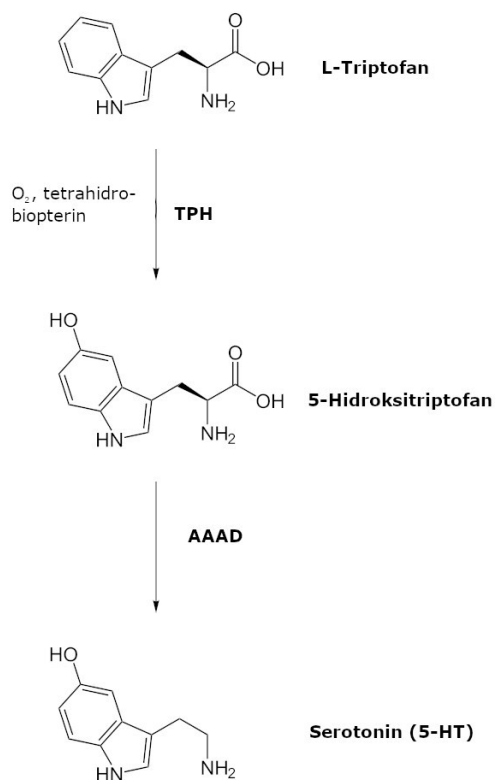
U noradrenergičnim i adrenergičnim neuronima sintetizirani dopamin prevodi se u norepinefrin uz pomoć enzima dopamin- $\beta$ -hidroksilaza (DBH). Posebnost ovog enzima i reakcije jest da za razliku od ostalih koraka u sintezi kateholamina koje se događaju u citosolu ova reakcija se odvija u sinaptičkim vezikulama. Strukturno DBH je glikoprotein veličine 290 kDa, u okviru aktivnog mjesta nalaze se dva  $\text{Cu}^{2+}$  iona koji sudjeluju u reakciji oksidacije. Iako može postojati u solvatiranom obliku enzim je uglavnom vezan u okviru membrana vezikula prema unutrašnjoj strani vezikula. Kofaktori potrebni za reakciju su askorbinska kiselina i molekularni kisik, pri čemu u okviru reakcije nastaje i dehidroaskorbinska kiselina koja se regenerira djelovanjem membranskog citokroma b-561. Na ovom koraku završava sintetski put noradrenergičnih neurona, međutim put sinteze neurotransmitera kod adrenergičnih neurona završava nakon reakcije katalizirane feniletanolamin-N-metiltransferazom (PMNT) te se iz norepinefrina dobiva epinefrin, reakcija koja se događa u citosolu te se dobiveni produkt ponovno pakira u vezikule. Osim navedenog puta sinteze kateholamina postoje i alternativni „minorni“ putevi sinteze, koji koriste većinom iste enzime ili izozime te uglavnom imaju promijenjen redoslijed reakcija. Prikaz glavnog i sporednog puta sinteze kateholamina nalazi se na slici 3.<sup>1,2,3</sup>



Slika 3. Shema sintetskog puta kateholamina.<sup>5</sup>

### 2.1.3. Sinteza inidolamina

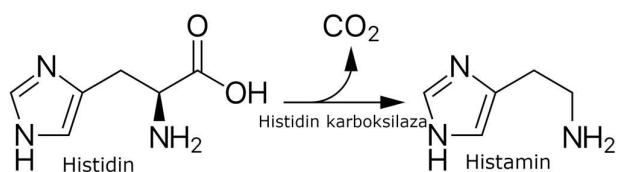
Za razliku od kateholamina serotonin ima relativno kratak put sinteze (Slika 4.) koji se sastoji od dva koraka. Prekursor je esencijalna aminokiselina triptofan. Prvu reakciju katalizira enzim triptofan-hidroksilaza (TPH) uz kofaktore tetrahidrobioptin i molekulski kisik, a kao produkt nastaje 5-hidroksitriptofan (5-HTP) te je to korak koji određuje brzinu sintetskog puta. Reakcija sintetskog puta serotonina ima puno analogija s prvom reakcijom sinteze kateholamina, sukladno tome zajedno s fenilalanin-hidroksilazom svrstava ih se u obitelj enzima pod imenom hidroksilaze aromatskih aminokiselina. Postoje dva izozima pod nazivom TPH1 i TPH2, TPH1 oblik je nađen uglavnom u perifernom živčanom sustavu, dok se TPH2 nalazi isključivo u centralnom živčanom sustavu. Sljedeću reakciju katalizira prije spomenuta karboksilaza aromatskih aminokiselina (AAAD) te daje serotonin kao završni produkt. Osim u živim organizmima, serotonin je moguće sintetizirati u laboratoriju uz pomoć gljivica *Aspergillus niger* i *Psilocybe coprophila*.<sup>1,3</sup>



Slika 4. Biosintetski put serotonina.<sup>6</sup>

### 2.1.4. Sinteza imidazolamina

Sinteza histamina (Slika 5.) je najjednostavnija od svih biogenih amina koji će se razmatrati, jer sadrži samo jedan korak prevođenja histidina u histamin koji katalizira histidin-dekarboksilaza. Taj enzim je iznimno sličan već spomenutim karboksilazama i predstavlja jedini način sinteze histamina. Kofaktor uključen u reakciju je pirodoksal-fosfat (PLP). Reakcija ide preko međuprodukta sa Schiffovom bazom, što je karakteristično za enzime koji koriste kofaktor PLP u reakcijskom mehanizmu.<sup>1,3</sup>



Slika 5. Shema sinteze histidina.<sup>7</sup>

## 2.2. Pakiranje sintetiziranih neurotransmitera u vezikule

### 2.2.1. Uloga vezikula u prenošenju signala

Nakon sinteze neurotransmiteri se pohranjuju u vezikule u predsinaptičkom neuronu, spremni za izbacivanje u sinaptičku pukotinu nakon prolaska električnog podražaja. Brzinu i efikasnost neurotransmisije osigurava prostorni raspored elemenata koji sudjeluju u procesu egzocitoze. Vezikule se i prije prolaska signala ugrađuju, odnosno „sidre“, na mjesto u blizini membrane na predsinaptičkom neuronu, što osigurava spremnost vezikula na egzocitozu neurotransmitera i prijenos podražaja na postsinaptički neuron.

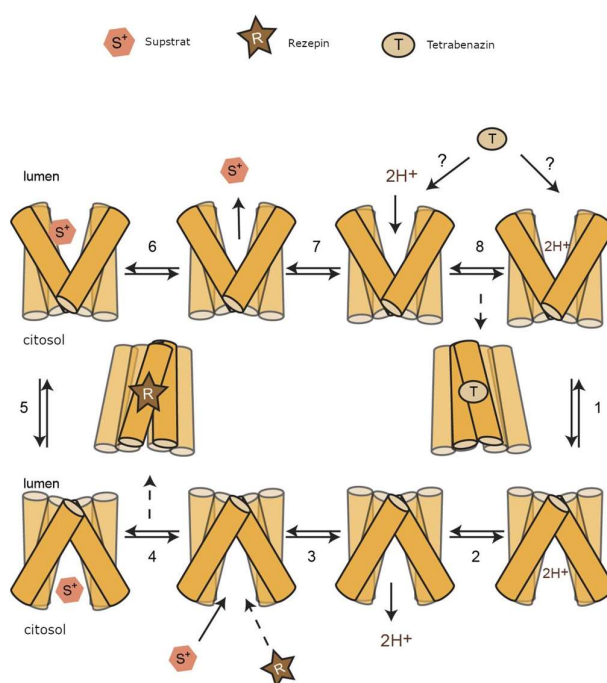
Neuroni prenose podražaje veoma brzo i učestalo. Da bi se omogućilo ponovno prenošenje podražaja zaslužne su reciklirane vezikule, nastale ponovnim preuzimanjem (engl. *reuptake*) neurotransmitera prenesenih iz sinaptičke pukotine te rezervne vezikule, koje sadrže sintetizirane neurotransmitere. Većina neurotransmitera se pakira u male prozirne vezikule promjera od 40-60 nm, a kod kateholamina nalazimo još velike granularne vezikule promjera 70-120 nm i kromafinska zrnca promjera 280 nm. Serotonin i histamin za pohranu koriste velike granularne vezikule, a to je i jedini skladišni oblik kod navedenih neurotransmitera. Vezikule osim biogenih amina sadrže ATP,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  te druge kemijske spojeve koje sudjeluju u procesu pripreme ili samom procesu egzocitoze.<sup>1,8</sup>

### 2.2.2. Uloga i mehanizam VMAT prijenosnika

Prijenos iz citosola u sinaptičke vezikule je kataliziran od strane skupine membranskih glikoproteinskih transportera pod nazivom vezikularni monoaminski transporteri (VMAT). Transporteri prenose kateholamine u suprotnom smjeru od koncentracijskog gradijenta, što je energetski nepovoljno. Da bi dobili potrebnu energiju za prijenos tvari VMAT ostvaruje interakcije s vezikularnom  $\text{H}^+$ -ATPazom. Unutrašnjost vezikula je pri nižem pH, a pri unošenju jedne molekule monoamina transporter izbacuje 2  $\text{H}^+$  iona iz matriksa vezikule (slika 6.). Identificirana su dva oblika VMAT: i) oblik VMAT1 nalazi se većinom u stanicama koje koriste kateholamine za hormonsku signalizaciju i ii) VMAT2 koji se nalazi u centralnom živčanom sustavu. Prema analizi hidrofobnog modela prijenosnik VMAT2 sadrži 12 transmembranskih domena, prepoznatih prema većem udjelu hidrofobnih aminokiselina. Učestala je meta lijekova poput rezepina i tetrabenazina, koji služe kao inhibitori transporta te onemogućavaju egzocitozu neurotransmitera sukladno tome i signalizaciju pomoću tog neurona. U živčanim stanicama *in vitro* primijećena je spontana difuzija kateholamina iz vezikula. Vrijeme difuzije služi kao



dobar indikator stupnja aktivnosti transportera VMAT2 u centralnom živčanom sustavu. Oba kraja polipeptidnog lanca ovog glikoproteina se nalaze na citosolnoj strani transmembranskog proteina te se smatra da su mjesta regulacije fosforilacijom. Velika razlika između dva izomera transportera VMAT je indicirana većim afinitetom transportera VMAT2 prema biogenim aminima. Glikoproteini VMAT su mjesta djelovanja mnogih neuroaktivnih supstanci (npr. amfetamini). Serija radova povezuje promjenu koncentracije dopamina na terminalnom djelu presinaptičkog neurona u pojedinim regijama mozga, direktnom modulacijom aktivnosti VMAT2 transportera.<sup>9</sup> Bilo kakve smetnje u aktivnosti transportera mogu dovesti do toksičnosti za neurone.<sup>2,10,11</sup>



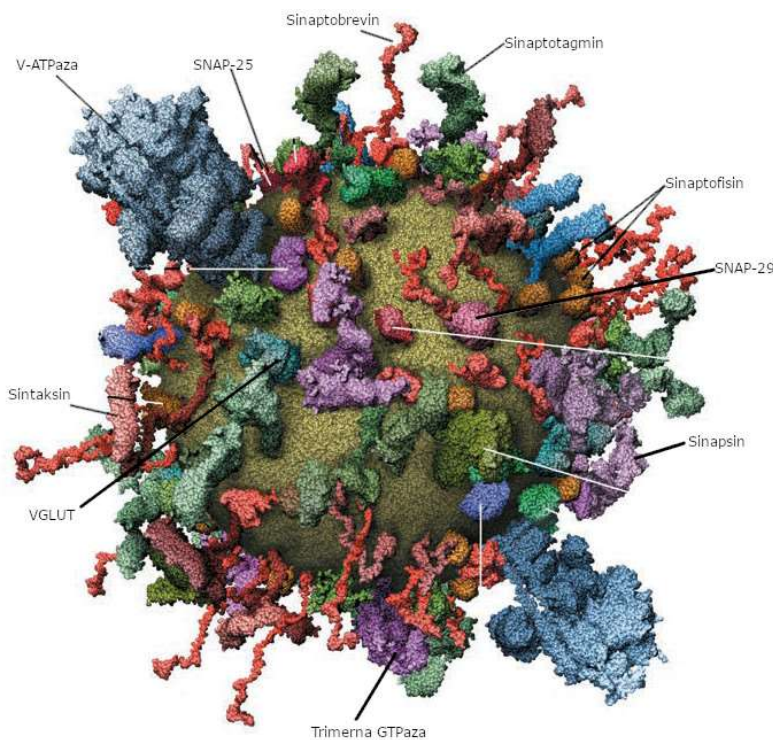
Slika 6. Shematski prikaz transporta membranskog VMAT proteina s djelovanjem inhibitora rezepina i tetrabenazina.<sup>12</sup>

### 2.3. Egzocitoza neurotransmitera pod utjecajem $\text{Ca}^{2+}$

#### 2.3.1. Uloga kalcijevih iona u procesu egzocitoze

Neurotransmisija je strogo kontroliran proces. Prvi korak neurotransmisije počinje prolaskom električnog signala preko  $\text{Ca}^{2+}$  ionskih kanala reguliranih naponom (engl. *voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  channel*). Na membrani predsinaptičkog neurona nalaze se  $\text{Ca}^{2+}$  ionski kanali regulirani naponom, sastoje se od šest transmembranskih regija te jedne  $\alpha$ -zavojnice osjetljive na promjenu napona koja promjenom svoje konformacije zatvara odnosno otvara prolaz za kalcijeve ione. Prolaskom električnog signala preko kalcijevog ionskog kanala se otvara te se propuštaju ioni kalcija niz gradijent koncentracije iz izvanstanične tekućine ( $c(\text{Ca}^{2+}) \approx 10^{-3}$  mol/L) u citosol neurona ( $c(\text{Ca}^{2+}) \approx 10^{-7}$  mol/L). Povećanje koncentracije kalcijevih iona signalizira spajanje sinaptičke vezikule s membranom. Spajanje membrana uzrokuje egzocitozu biogenih amina sadržanih u predsinaptičkim vezikulama, no da bi došlo do egzocitoze dva uvjeta moraju biti ispunjena: i) lokalna koncentracija kalcijevih iona mora biti dovoljno velika; ii) sinaptičke vezikule moraju biti usidrene u blizini membrane na sinaptičkom dijelu neurona.<sup>2,13,14</sup>

Niz proteina na membrani predsinaptičkog neurona i na membrani vezikula koje prenose neurotransmitere su bitni i uključeni u proces egzocitoze (Slika 7.). Cijeli proces nije razjašnjen do kraja, stoga će se u daljnjem tekstu navesti grubi opis procesa fuzije. Proces se zasniva na interakciji proteina sintaksina, koji se nalazi na staničnoj membrani (poznati kao proteini t-SNARE) sa SNAP-25 i sinaptobravinom koji se nalaze na membrani vezikula (pod nazivom v-SNARE), ova tri proteina formiraju SNARE kompleks. Dobiveni kompleks mora proći dorade koje zahtijevaju ATP, ovaj korak priprema vezikulu za fuziju. Posebno važan dio mehanizma odnosi se na interakcije s vezikularnim membranskim proteinom sinaptotagminom koji služi kao senzor za koncentraciju kalcijevih iona u citosolu, pri čemu u nedostatku kalcijevih iona svojom konformacijom ometa vezanje za predsinaptičke membranske proteine te tako sprječava spontanu egzocitozu. Vezanjem  $\text{Ca}^{2+}$  na sinaptotagmin, protein mijenja konformaciju te omogućuje promjenu konformacije SNARE kompleksa, spajanje membrana te egzocitozu.<sup>1-2,13,15,16</sup>



Slika 7. Prikaz površine vezikule s pripadnim membranskim proteinima prikaz s citosolne strane.<sup>8</sup>

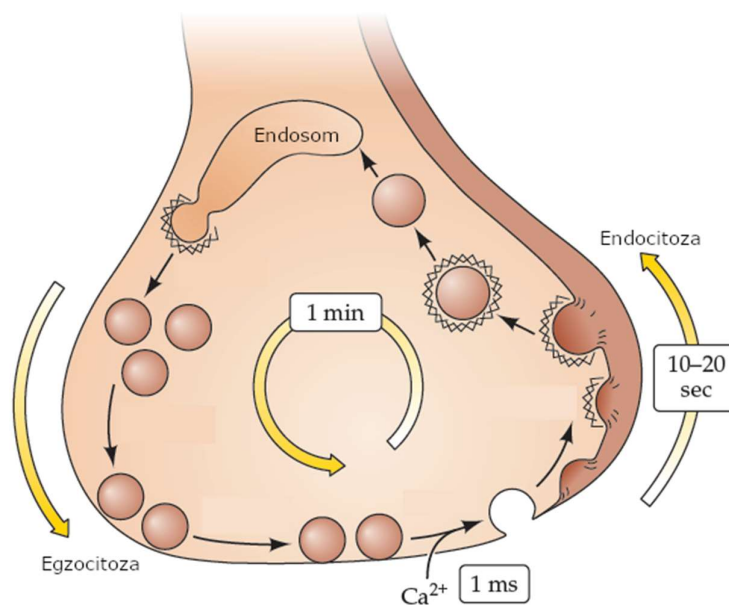
### 2.3.2. Ciklus sinteze i razgradnje vezikula

Vezikule se nakon spajanja s membranom moraju regenerirati, a regeneracija se događa na terminalnom djelu neurona jer transport iz tijela neurona ne bi bio dovoljno brz za veliku frekvenciju egzocitoze. Nakon prvog prenošenja signala neuron može biti spreman za nekoliko sekundi, dok ciklus jedne sinaptičke vezikule može trajati oko 1 – 2 minute.

Cijeli ciklus sinaptičkih vezikula se sastoji od šest koraka: i) prvo se sintetizirana vezikula prenosi s mjesta pupanja, ii) slijedi punjenje vezikule s neurotransmiterima, iii) nakon toga dolazi do sidrenja vezikule na mjesto za egzocitozu, nakon čega slijedi iv) pripremanje kompleksa za egzocitozu (engl. *priming*), to jest stvaranje kompleksa koji će omogućiti egzocitozu, zatim dolazi do v) fuzije vezikule i membrane, i na kraju se događa vi) endocitoza vezikule koje se stopila s membranom. Ukupan proces je prikazan na slici 8.

Postoji vrsta egzocitoze koji ne uključuju fuziju vezikule s membranom, taj mehanizam zovemo engl. *kiss-and-run*. U tom procesu vezikula formira poru okrenutu prema sinaptičkoj pukotini, ispusti sadržaj u sinaptičku pukotinu te nakon pražnjenja se procjep zatvara.

Najbitniju ulogu za endocitozno pupanje novih vezikula ima protein klatrin, pomoću svoje strukture s tri „noge“ te uz pomoć konektorskih enzima može stvoriti kavez oko vezikule koja pupa. Nakon što zaostane samo stapka novog mjehurića vezikule, protein dinamin se veže oko stapke te se mijenjanjem konformacije ovog proteina zatvara pora. Vezikula obuhvaćena klatrinom se translocira s mjesta pupanja pomoću aktinskih filamenata, a tijekom gibanja vezikula se rješava klatrinskog omotača te je spremna za unošenje neurotransmitera.<sup>1,14,17</sup>

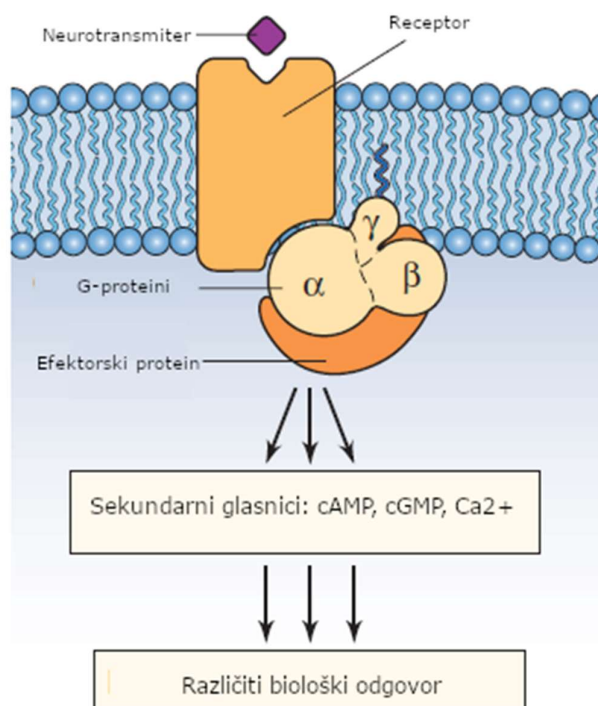


Slika 8. Prikaz jednog obrtaja u ciklusu sinaptičkih vezikula.<sup>2</sup>

## 2.4. Vežanje neurotransmitera na receptor te stanični odgovor na signal

### 2.4.1. Vežanje i vrste receptora biogenih amina

Nakon otpuštanja neurotransmitera u sinaptičku pukotinu, u prostor između dva neurona, izlučeni neurotransmiteri se vežu na receptore na postsinaptičkom neuronu, što potiče odgovor stanice na podražaj. Odgovor stanice na signal može imati više različitih mehanizama djelovanja, i dijametralno suprotne stanične učinke, na primjer umjesto amplifikacijskog učinka tipičnog za signalnu molekulu, na pojedinim postsinaptičkim neuronima može imati i utišavajući učinak. Za svaki neurotransmiter postoje specifični receptori te postoje više receptora za isti neurotransmiter koji ne moraju imati isti mehanizam ili djelovanje. Osnovna podjela receptora za biogene amine je na ionotropne receptore, membranske proteine koji vezanjem liganda, odnosno pripadnog neurotransmitera, otvaraju ionski kanal te metabotropni, koji pripadaju skupini G-proteinskih receptora, što znači da putem sekundarnih glasnika reguliraju odgovor stanice na podražaj (Slika 9.). Vrsta receptora na postsinaptičkom neuronu ovisi o funkciji kojoj služi u neurološkom putu te o vrsti neurološkog puta. Na primjer kateholamini mogu djelovati kao aktivatori jednog neurološkog puta, ili kao antagonisti drugog neurološkog puta ovisno o konformaciji proteina, što je fenomen poznat pod nazivom ligand-inducirana supstratna selektivnost.



Slika 9. Shema djelovanja receptora spregnutog s G-proteinom.<sup>2</sup>

#### 2.4.2. Podjela i podvrste receptora pojedinih neurotransmitera

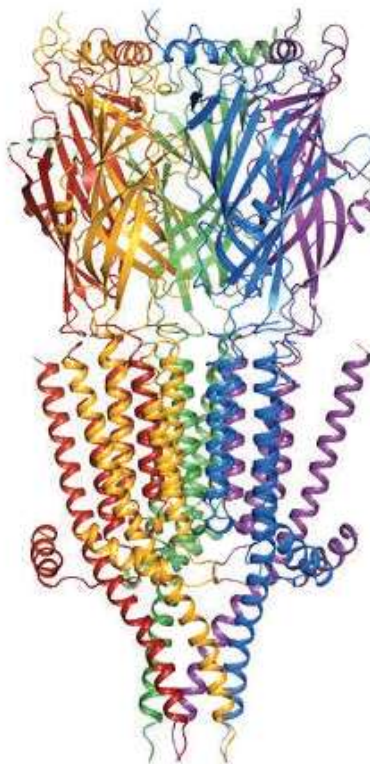
Nađeno je 5 različitih vrsta dopaminskih receptora, nazvanih od D1-D5 receptori, raspoređeni u dvije skupine: i) D1-slični receptori (D1,D5) ii) D2-slični receptori (D2,D3,D4). Raspodjela se temelji na vrsti receptora spregnutim s G-proteinom, pri čemu D1-slična grupa aktivira G<sub>s</sub> vrstu receptora koji aktiviraju proizvodnju sekundarnog glasnika cAMP, dok D2-slična grupa aktivira G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub> vrstu G-proteina te smanjuje proizvodnju cAMP-a. D1 receptori su agonisti zbog konačnog rezultata koji je pojačavanje signala, dok su D2 antagonisti jer uzrokuju utišavanje signala. Osim na postsinaptičkom neuronu dopaminski receptori se nalaze i na presinaptičkom neuronu te služe kao autoreceptori za regulaciju egzocitoze. Zbog mnogih zajedničkih svojstava teško je pripremiti lijekove koji djeluju specifično na jednu od 5 vrsta dopaminskih receptora. Većina psihoaktivnih tvari koje djeluju na dopaminske puteve djeluje na D2-slične receptore poput lijekova za Parkinsonovu bolest.

Adrenergični receptori su specifični po tome što ih aktiviraju i epinefrin i norepinefrin. Kod adrenergičnih receptora razlikujemo tri načina prijenosa signala. Prva vrsta pod nazivom  $\alpha_1$ -adrenergični receptor aktivira fosfolipazu C te uzrokuje povećanje i otpuštanje kalcijevih iona. Ovaj receptor uključen je i u put koji aktivira i seriju kinaza (MAP) aktiviranih mitogenom. Druga vrsta  $\alpha_2$ -adrenergičnih receptora koji inhibiraju adenilil-ciklazu, nalazi se na presinaptičkom neuronu u blizini mjesta otpuštanja, te služi kao autoreceptor koji regulira i zaustavlja neurotransmisiju. Treća vrsta su  $\beta$ -adrenergični receptori. Veliki problemi kod ciljanog djelovanja na pojedini receptor je nepotpuno poznavanje njihovih struktura što onemogućava ciljano djelovanje na pojedine putevi, te lokaliziranu regulaciju bez neželjenih nuspojava.

Serotoninski receptori dijele se u 7 obitelji pri čemu većina spada u receptore spregnute s G-proteinom. Jedna vrsta se istaknula kao posebna, receptor 5-HT<sub>3</sub> (slika 10.), specifičan po tome što je ligandni ionski kanal, dok su ostali receptori 5-HT<sub>(1-7, bez 3)</sub> receptori spregnuti s G-proteinom. Nadalje, navedene obitelji se također dijele na podskupine. Naime zbog velike raširenosti u živčanom sustavu, puno receptora sa specifičnim funkcijama je moralo evoluirati kako bi se spriječila interferencija signala iz drugih tkiva. Među najbitnijim obiteljima su 5-HT<sub>1</sub> koje djeluju aktivacijom G<sub>i/o</sub>-proteina te inhibiraju adenilil-ciklazu.

Postoje 4 različite vrste histaminskih receptora, a svi spadaju u receptore spregnute s G-proteinom. Receptor H<sub>1</sub> kao sekundarne glasnice koristi inozitol 1,4,5-trisfosfat i diacilglicerol, te povećavaju unutarstaničnu koncentraciju kalcijevih iona. Receptori H<sub>2</sub> s druge strane

povećavaju koncentraciju cAMP-a, te aktivacijom protein kinaze A djeluju na stanične procese. Receptori H3 se nalaze na presinaptičkom neuronu, te služe za autoinhibiciju signala te za inhibiciju sinteze i otpuštanja. Receptori H4 pokazuju brojne sličnosti u transdukciji signala i strukturi s receptorima H3, poput sprege sa  $G_{i/o}$  proteinom, aktivacije serije kinaza (MAP) aktiviranih mitogenom te daljnjeg staničnog odgovora.<sup>1,2,18</sup>



Slika 10. Struktura 5-HT<sub>3</sub> receptora, jedini predstavnik ionotropnih serotoninskih receptora.<sup>2</sup>

## 2.5. Deaktivacija neuroprijenosnika

### 2.5.1. Uklanjanje neurotransmitera iz sinaptičke pukotine pomoću reuptake mehanizma

Postoje tri načina uklanjanja neurotransmitera iz sinaptičke pukotine: i) ponovno preuzimanje (engl. *reuptake*), ii) razgradnja unutar sinaptičke pukotine te iii) transport u glijalne stanice pod nazivom astrociti te daljnja razgradnja.

Da bi došlo do zaustavljanja podražaja na postsinaptičkom neuronu, neurotransmiteri moraju biti uklonjeni s aktivnog mjesta. Da bi omogućili brzi ponovni prijenos signala, moraju biti ponovno uneseni u vezikule unutar predsinaptičkog neurona. Ponovno preuzimanje je proces reapsorpcije neurotransmitera iz sinaptičke pukotine u svrhu ponovnog korištenja za neurotransmisiju.

Kod kateholamina, proces ponovnog preuzimanja se događa primarno preko membranskih transportera, podložni su regulaciji supstratom, inhibitorima te psihoaktivnim supstancama. Osim toga imaju bitnu ulogu u održavanju normalne funkcije i homeostaze koncentracije kateholamina u predsinaptičkom prostoru. Dopaminski transporter (DAT) i norepinefrinski transporter (NET) su ovisni o koncentracijama iona  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$ . Njihov koncentracijski gradijent daje energiju za prijenos neurotransmitera u smjeru suprotnom koncentracijskog gradijenta neurotransmitera. Zanimljivo je da supstrati nisu ekskluzivni za transporter po kojemu su imenovani, oba transportera mogu prenositi oba supstrata. Kinetika reakcije ponovnog preuzimanja prati Michaelis-Menteninu kinetiku, Michaelis-Mentenine konstante nam prikazuju da NET transporter ima veći afinitet od DAT transportera prema oba supstrata. Epinefrin kao neurotransmiter nema specifičan transporter, već se ponovno preuzimanje događa preko NET membranskih proteina. Transporteri za ponovno preuzimanje su učestalo mjesto djelovanja psihoaktivnih tvari, sintetskih droga i lijekova za psihičke poremećaje. Blokada NET i DAT transportera se pokazala kao efektivna metoda za pomoć pri liječenju depresije.

Serotoninski transporteri (SERT) su jedno od najčešće ciljanih mjesta za antidepresive, sa skupinom lijekova pod nazivom SSRI (engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*). Neuron koji koristi serotonin sadrže SERT transportere visokog afiniteta te predstavljaju primaran način uklanjanja neurotransmitera iz sinaptičke pukotine. Transporter SERT, kao i ostali transporteri biogenih amina, je ovisan o koncentraciji  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  iona. Da bi transport preko membrane bio energetski povoljan transporter koristi koncentracijski gradijent natrija. Koncentracija natrija se održava visokom u izvanstaničnom prostoru, a s citosolne strane se



drži niskom. Prilikom transporta redosljed vezanja supstrata je uređen te se prvo veže ion natrija, zatim serotonin, a na kraju kloridni ioni nakon čega je kompleks spreman za okretanje na citosolnu stranu i otpuštanje vezanih jedinki u aksonski terminal. Pri završetku prijenosa transporter je okrenut prema citosolnoj strani membrane, a vezanjem jednog natrijevog iona protein je spreman za okretanje prema sinaptičkoj pukotini te novi prijenos molekule serotonina. Sekundarni način uklanjanja neurotransmitera iz sinaptičke pukotine je preko transportera na okolnim glijalnim stanicama (astrocitima), transporteri niskog afiniteta predstavljaju put preko kojeg ide razgradnja neurotransmitera. Osim uloge u ponovnom preuzimanju, SERT kontrolira koncentraciju serotonina u sinaptičkoj pukotini te tako regulira aktivnost postsinaptičkog neurona.<sup>1-3,19</sup>

## 2.6. Recikliranje i razgradnja neurotransmitera nakon prijenosa signala

### 2.6.1. Alternativni načini uklanjanja neurotransmitera te njihova kataboliza

Osim ponovnog preuzimanja postoje i drugi mehanizmi za uklanjanje neurotransmitera iz sinaptičke pukotine nakon prijenosa signala. To su proces difuzije, hidrolitička razgradnja u sinaptičkoj pukotini te endocitoza neurotransmitera u okolne glijalne stanice. Kod procesa difuzije molekule neurotransmitera oslobođene u sinaptičku pukotinu difundiraju iz pukotine u okolinu, gdje se ne mogu vezati na niti aktivirati receptore. Hidrolitička razgradnja, iako nije karakteristika biogenih amina, može se događati kod neuronskih puteva koji koriste biogene amine kao neurotransmitere.

Endocitoza neurotransmitera se događa na posebnoj vrsti glijalnih stanica pod nazivom astrociti. Ove stanice su karakteristične za centralni živčani sustav. Astrociti su nužni za pravilan rad mozga, sudjeluju i pomažu u skoro svakom aspektu rada živčanog sustava. Na membrani astrocita se mogu nalaziti transportni proteini specifični za neurotransmiter koji prenosi signal preko lokalne sinapse, te tako norepinefrinska sinapsa u blizini ima astrocite s proteinom NET. Iako u astrocitima nije nađena mRNA za SERT transporter, mogu unositi serotonin pomoću srodnih NET i DAT prijenosnika te plazma membranskog monoaminskog transportera (PMAT). Astrociti sadrže sve enzime potrebne za razgradnju pripadnih neurotransmitera te predstavljaju alternativan način uklanjanja signalnih molekula nakon izvršene funkcije. Primjer takve vrste kooperacije su serotoninergični receptori. Za histamin nije utvrđeno postojanje sustava za transport u astroglijama.<sup>2-4,13,15</sup>

Zajedno s predsinaptičkim i postsinaptičkim neuronom astrociti čine treći dio triparticijske sinapse. Naime astrociti nisu samo promatrači u procesu neurotransmisije. Oni aktivno sudjeluju pomoću prijenosa deaktiviranih neurotransmitera također pomoću receptora na svojim membranama povećavaju intracelularnu razinu kalcijevih iona. Kao dodatan stupanj regulacije ispuštaju vlastite „glijatransmitere“ (poput glutamata ili ATP-a) te tako mijenjaju aktivnost na pred- i post-sinaptičkom sustavu .

Razgradnja biogenih amina je katalizirana pomoću enzima monoamin-oksidaza (MAO) i katehol-O-metiltransferaza (COMT). Monoamin-oksidaza ima dva izooblika, MAO-A i MAO-B. MAO-A oblik enzima ima veći afinitet prema norepinefrinu i serotoninu, ovaj oblik se nalazi većinom u neuronima koji koriste kateholamine za signalizaciju. MAO-B ima veći afinitet prema aminima nađenim u tragovima poput feniletilamina, nalazi se uglavnom u serotoninergičnim sustavima i glijalnim stanicama. Afinitet oba enzima prema dopaminu je

jedanak. Oba enzima su vezani na membranu mitohondrija na pre- i postsinaptičkim i postsinaptičkim neuronima te u glijalnim stanicama. Enzimi MAO-A i MAO-B su mjesto djelovanja mnogih lijekova koji se koriste u borbi protiv depresije ili u liječenju Parkinsonove bolesti. Enzim COMT katalizira reakciju prijenosa metilne skupine sa S-adenozil-metionina na kateholamine. Kod dopamina zadnji enzim koji sudjeluje u razgradnji je aldehyd-dehidrogenaza, citosolni enzim koji katalizira oksidaciju 3-metoksitiramin (3-MT) u karboksilnu kiselinu te se dobivena homovanilinska kiselina izbacuje iz tijela.<sup>1-2,13,20,21</sup>

Razgradnja serotonina započinje oksidacijom i deaminacijom na  $\alpha$ -C atomu. Reakcija katalizirana enzimom MAO prevodi molekulu u 5-hidroksi-indolacetaldehyd. Zatim oksidacijom enzimom aldehyd-dehidrogenaza, uz prisutnost kofaktora NAD<sup>+</sup>, prelazi u 5-hidroksi-indolnu kiselinu, konačni oblik koji se izlučuje kao metabolički otpad.<sup>1</sup>

### § 3. LITERATURNI IZVORI

1. S. T. Brady, D. J. Siegel, et al., *Basic Neurochemistry Principles of molecular, cellular and medical neurobiology 8th ed.*, Elsevier inc. Oxford, 2012. str. 120-145, 235-256, 283-341.
2. D. Purves, G. J. Augustine, et al. *Neuroscience 6th ed.* Oxford University Press, New York, 2018, str. 65-145.
3. S. Burchett, T. Hicks, *Progress in Neurobiology*, **79** (2006) 223-246.
4. B. D. Sloley, A. V. Juorio, *International Review Of Neurobiology*, **38** (1995) 253-301.
5. <https://en.wikipedia.org/wiki/Catecholamine> (datum pristupa: 20. lipnja 2019.)
6. <https://en.wikipedia.org/wiki/Serotonin> (datum pristupa: 20. lipnja 2019.)
7. <https://en.wikipedia.org/wiki/Histamine> (datum pristupa: 20. lipnja 2019.)
8. H. Lodish, A. Berk, C. A. Kaiser, M. Krieger, A. Bretscher, H. Ploegh, A. Amon, K. C. Martin, *Molecular Cell Biology 8th ed.*, W.H.Freeman & co., 2016, 1025-1078.
9. D. Sulzer, M. Sonders, N. W. Poulsen, A. Galli, *Progress in Neurobiology*, **75** (2005) 406-433
10. K. Wimalasena, *Medical Research Reviews*, **4** (2010) 483-519.
11. R. Romero-Calderon, G. Uhlenbrock, J Borycz, A. F. Simon, A. Grygoruk, et al. *Public Library of Science Genetics*, **4** (2008) 1-14.
12. <https://www.pnas.org/content/113/47/E7390> (datum pristupa: 27. lipnja 2019.)
13. M. Judaš, I. Kostović, *Temelji Neuroznanosti*, udžbenik, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2015., str. 94-138.
14. M. Yamakage, A. Namiki, *Canadian J. of Anesthesia*, **2111** (2002) 151- 164.
15. Q. Zhou, P. Zhou, A.L. Wang, D. Wu, M. Zhou, T. C. Sudhof, A. T. Brunger, *Nature Publishing Group*, **548** (2017) 420-425.
16. T.C. Sudhof, *CSH Perspectives Biology*, **4** (2012) 1-15.
17. T.C. Sudhof, *Annual Review Neuroscience*, **27** (2004) 509- 548.
18. R.R. Gainetdinov, M.Caron, *Annual Rev. Pharmacological Toxicology*, **43** (2002) 261-284.
19. M. Sidoryk-Wegrzynowicz, M. Wegrzynowicz, E. Lee, A. B. Bowman, M. Aschner, *Toxicologic Pathology*, **39** (2011) 115-123

20. D. E. Edmondson, A. Mattevi, C. Binda, M. Li, F. Hubalek, *Current Medicinal Chemistry*, **11** (2004) 1983-1993
21. B.H. Schott, R. Frischknecht, G. Debska-Vielhaber, N. Jonh, et al. *Molecular Psychiatry*, **1** (2010) 1-9