

Signalne molekule i signalni mehanizmi

Svaki neuron trajno je izložen djelovanju stotina različitih signala iz svoje okoline, a na te signale odgovara odabirno i sukladno fenotipu stečenom progresivnom diferencijacijom i specijalizacijom tijekom razvoja. Općenito, neuroni su genetski i razvojno "programirani" da na jedan skup signala odgovore diferencijacijom, na drugi proliferacijom, a na treći izvođenjem neke specijalizirane funkcije. Štoviše, većina neurona tako je programirana da određen skup signala mora trajno primati da bi uopće preživjela - izostankom tih signala u neuronu se aktivira "suicidni program" i neuron samog sebe ubije. Taj proces nazivamo *programirana smrt stanica*, a iznimno je značajan tijekom normalnog razvoja središnjeg živčanog sustava. No, kako se u odraslom mozgu neuroni više ne dijele i terminalno su diferencirani, preostaje im da u odgovoru na različite skupove signala izvode različite funkcije (najčešće također signalne).

Signalne molekule općenito djeluju u kombinacijama, pa valja zaključiti da živčani sustav nekoliko stotina takvih molekula može rabiti u mnoštvu raznolikih kombinacija i time istodobno osigurati i dovoljnu preciznost i veliku prilagodljivost svojih funkcija. S druge strane, specifični odgovor neurona na podražaje iz okoline ovisi o dva glavna činitelja:

- specifičnom skupu **receptora** (molekula za prijem signala) na površini (ili u citoplazmi) dotičnog neurona i
- skupu **signalnih kaskada** malih unutarstaničnih signalnih molekula (**drugih glasnika** - engl. second messengers) i pridruženih enzimskih sustava, karakterističnom za dotični neuron.

Stoga ista vrsta signalne molekule u pravilu različito djeluje na različite ciljne neurone, bilo stoga što ti ciljni neuroni imaju različite receptore za tu signalnu molekulu, bilo stoga što imaju različite sustave drugih glasnika povezanih s istom vrstom receptora. Tako ista vrsta signalne molekule može u dva različita neurona izazvati ne samo različite nego čak i suprotne učinke (npr. ekscitaciju jednog, a inhibiciju drugog neurona). U ovom poglavlju razmotrit ćemo sedam bitnih tema o općoj naravi signalnih procesa:

- Tri glavne vrste međustanične signalizacije i njihovu ulogu u živčanom sustavu (**parakrina, endokrina i sinaptička signalizacija**).
- Dvije glavne vrste receptora na staničnoj površini neurona (**ionotropne receptore**, tj. receptore-kanale te **metabotropne receptore**, tj. receptore povezane s trimernim G-proteinima ili specifičnim enzimima).
- Ulogu **trimernih G-proteina** što posreduju učinke metabotropnih receptora na unutarstanične druge glasnike i signalne putove.
- Pet glavnih unutarstaničnih drugih glasnika** (i pridružene enzime), što sudjeluju u tri glavna signalna puta: **putu cikličkih nukleotida** (cAMP i cGMP i uloga ciklaza i fosfodiesteraza), **putu inozitolnih fosfolipida** (IP₃ i DAG i uloga fosfolipaza) i **putu kalcijevih iona** (Ca²⁺).

- Glavni učinak drugih glasnika - regulaciju procesa fosforilacije i defosforilacije (**protein kinaze i fosfataze**).
- Ključnu ulogu Ca²⁺** u integraciji svih navedenih signalnih mehanizama.
- Tri glavne vrste učinaka uzrokovanih aktivacijom receptora: kratkoročne (**promjene ekscitabilnosti**), srednjoročne (**promjene metabolizma**) i dugoročne (**promjene ekspresije gena**).

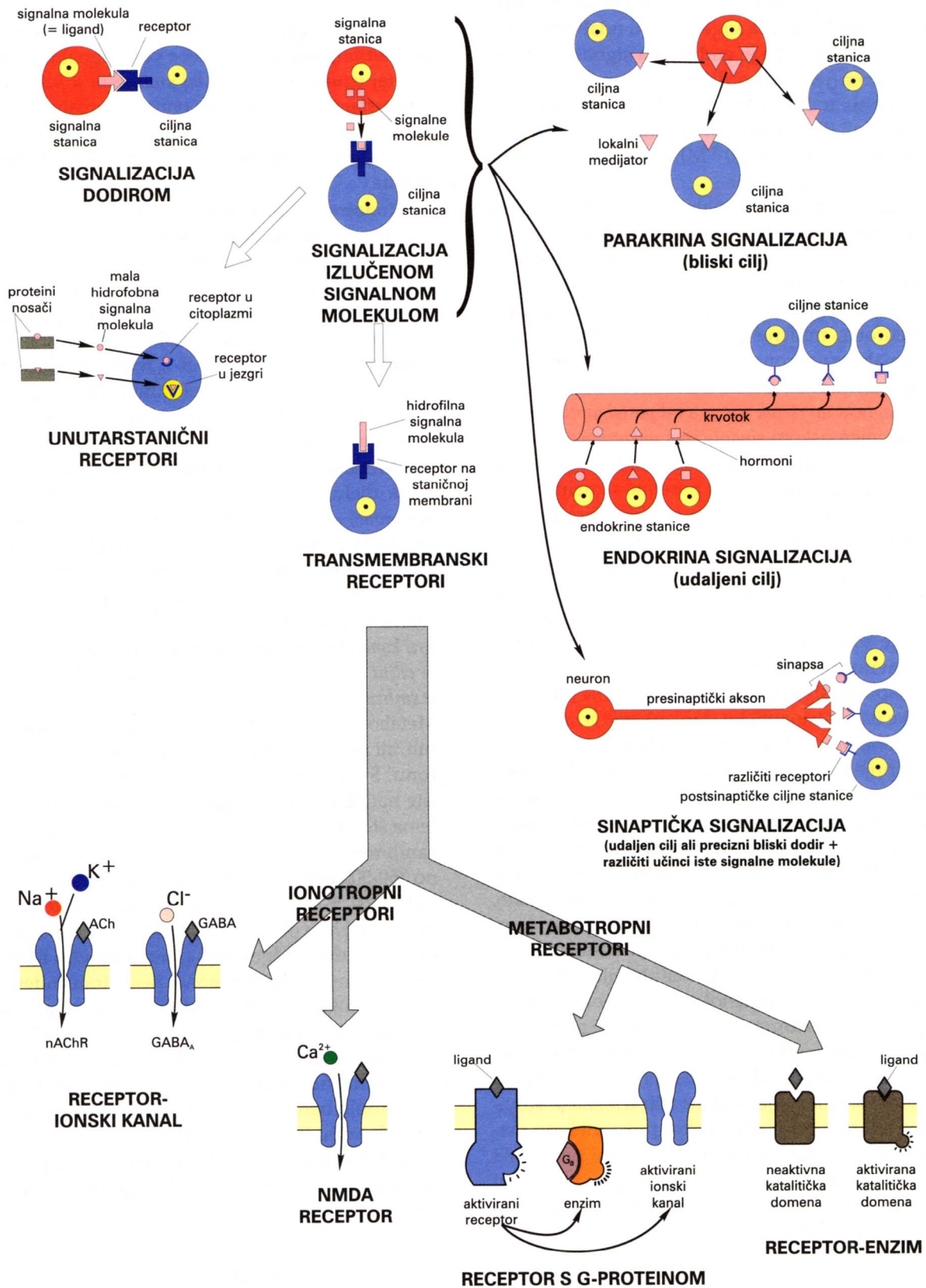
Međustanični signali prenose se izravnim dodirrom stanica ili izlučenim signalnim molekulama

Signal se može prenijeti *izravnim dodirrom* dvaju stanica. Osim u imunološkom prepoznavanju, ovakva vrsta signalizacije ima važnu ulogu u histogenezi središnjeg živčanog sustava. Mnogo češće, signalna stanica izluči u svoju okolinu **signalnu molekulu**, što se potom (nakon kraćeg ili duljeg putovanja) veže za **receptor** (molekulu za prijem signala) na ciljnoj stanici (sl. 9-1). Ponekad je receptor smješten unutar ciljne stanice, pa do njega dopijevaju samo male i hidrofobne signalne molekule što mogu difundirati kroz staničnu membranu. Tako primjerice djeluju **steroidni hormoni**. U ranom fetalnom razdoblju, muški i ženski spolni hormoni prodiru u neurone, mijenjaju ekspresiju njihovih gena i tako određuju budući spol mozga. Mnogo češće, receptor je **transmembranski protein**, a signalna molekula se veže na **vezno mjesto** takvog proteina, izloženo na staničnoj površini.

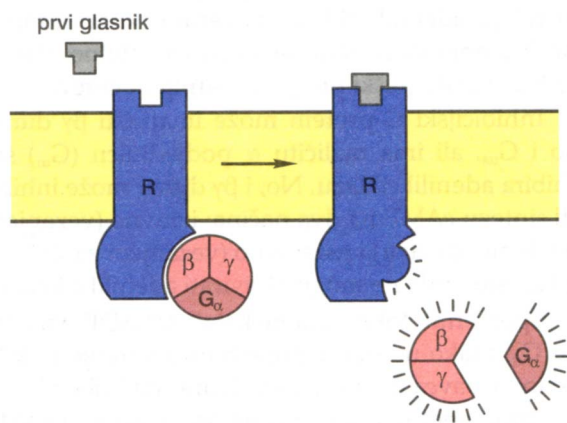
Obzirom na udaljenost i smještaj ciljnih stanica, signalne molekule mogu djelovati na nekoliko temeljnih načina (sl. 9-1). **Lokalni medijatori** ("mjesni posrednici") su signalne molekule što djeluju samo na ciljne stanice smještene u izravnoj okolini signalne stanice; tu je riječ o **parakrinoj signalizaciji**. Specifičnost parakrine signalizacije omogućena je ograničavanjem difuzije signalnih molekula na sljedeće načine: a) brzim upijanjem u okolne ciljne stanice, b) nazočnošću izvanstaničnih enzima što razgrađuju signalne molekule i c) imobilizacijom signalnih molekula vezanjem uz molekule izvanstaničnog matriksa. Uloga parakrine signalizacije u središnjem živčanom sustavu slabo je poznata; no, u 44. poglavlju prikazat ćemo kako jednostavni plin dušični monoksid (NO) parakrino djeluje u malom volumenu živčanog tkiva.

Hormoni su signalne molekule stvorene u **endokrinim** stanicama; **neurohormoni** su signalne molekule stvorene u **neuroendokrinim neuronima hipotalamusa**. Hormoni krvotokom dopijevaju do ciljnih stanica smještenih u udaljenim dijelovima organizma, pa je **endokrina signalizacija** relativno *spora* (jer ovisi o difuziji i krvnom optoku). Hormoni su u krvi i izvanstaničnoj tekućini jako razrijeđeni, ali djeluju već pri *vrlo malim koncentracijama* (tipično manjim od 10⁻⁸ M), a za svoje receptore vežu se *visokim afinitetom*.

Neuroni prenose signale na veće udaljenosti tako što živčani impuls do ciljne stanice putuje duž aksona (u plavetnog kita,



Slika 9-1. Signalne molekule omogućuju parakrinu, endokrinu i sinaptičku signalizaciju, a djeluju na dvije glavne vrste receptora na staničnoj površini (ionotropne i metabotropne). Za pojedinosti vidi tekst.



Slika 9-3. Kad se izvanstanični ligand (prvi glasnik) veže na metabotropni receptor (R) i time ga aktivira, G-protein se podijeli na aktiviranu α -podjedinicu (G_{α}) što sad umjesto GDP veže (i postupno hidrolizira!) GTP, te na aktivirani $\beta\gamma$ -dimer.

najduži aksoni dugi su oko 10 metara!), a završetak aksona je u posebnom tijesnom dodiru s djelićem membrane ciljane stanice (drugog neurona, mišićne ili žljezdane stanice). Takav spoj signalnog neurona i ciljane stanice je **sinapsa**. No, u sinapsi dvije stanice nisu u izravnom dodiru, nego je presinaptički završetak aksona od postsinaptičke membrane odvojen uskom sinaptičkom pukotinom. Kad akcijski potencijal dosegne presinaptički završetak aksona, on potakne egzocitozu posebne signalne molekule, **neurotransmitera**, što brzo difundira kroz sinaptičku pukotinu i veže se za *specifični receptor na postsinaptičkoj membrani ciljane stanice*. Dakle, prijenos signala odvija se posredstvom specifične signalne molekule, pa je riječ o **kemijskoj sinapsi**, a cijeli proces je **sinaptička signalizacija, neurotransmisija**, ili jednostavno **prijenos kroz sinapsu** (sl. 9-1).

Sinaptička signalizacija je *jednosmjerna* (od presinaptičke na postsinaptičku stanicu), *vrlo brza* (impuls duž aksona putuje brzinom i do 120 m/s) i *vrlo kratkotrajna* (prijenos kroz sinapsu traje manje od 1 milisekunde), a uz to *vrlo specifična i precizna* - "od točke na točku". Stoga je to glavni način brze i točne daljinske signalizacije u svakom organizmu s razvijenim živčanim sustavom. Neurotransmiteri u sinaptičkoj pukotini dosežu *veliku lokalnu koncentraciju* (npr. koncentracija izlučenog acetilkolina u neuromišićnoj sinapsi je otprilike 5×10^{-4} M). Sukladno tome, neurotransmiteri se za svoje receptore vežu *relativno niskim afinitetom*, pa se neurotransmiter ubrzo nakon vezanja opet odvoji od receptora i prestane djelovati na ciljnu stanicu. Štoviše, neurotransmiter u sinaptičkoj pukotini brzo razgrađuju hidrolitički enzimi ili ga posebni proteinski nosači brzo prebacuju natrag u presinaptički završetak. Sve to bitno pridonosi kratkoći i preciznosti djelovanja neurotransmitera.

Membrana odraslih neurona sadrži dvije glavne vrste receptora: ionotropne i metabotropne

Membranski receptori djeluju kao **pretvarači**, tj. **prevoditelji signala** - na sebe vežu signalnu molekulu i taj *izvanstanični događaj pretvaraju u jedan ili više unutarstaničnih signala* što onda mijenjaju aktivnost ciljane stanice. Membrane odraslih neurona sadrže dvije glavne vrste receptora: ionotropne i metabotropne.

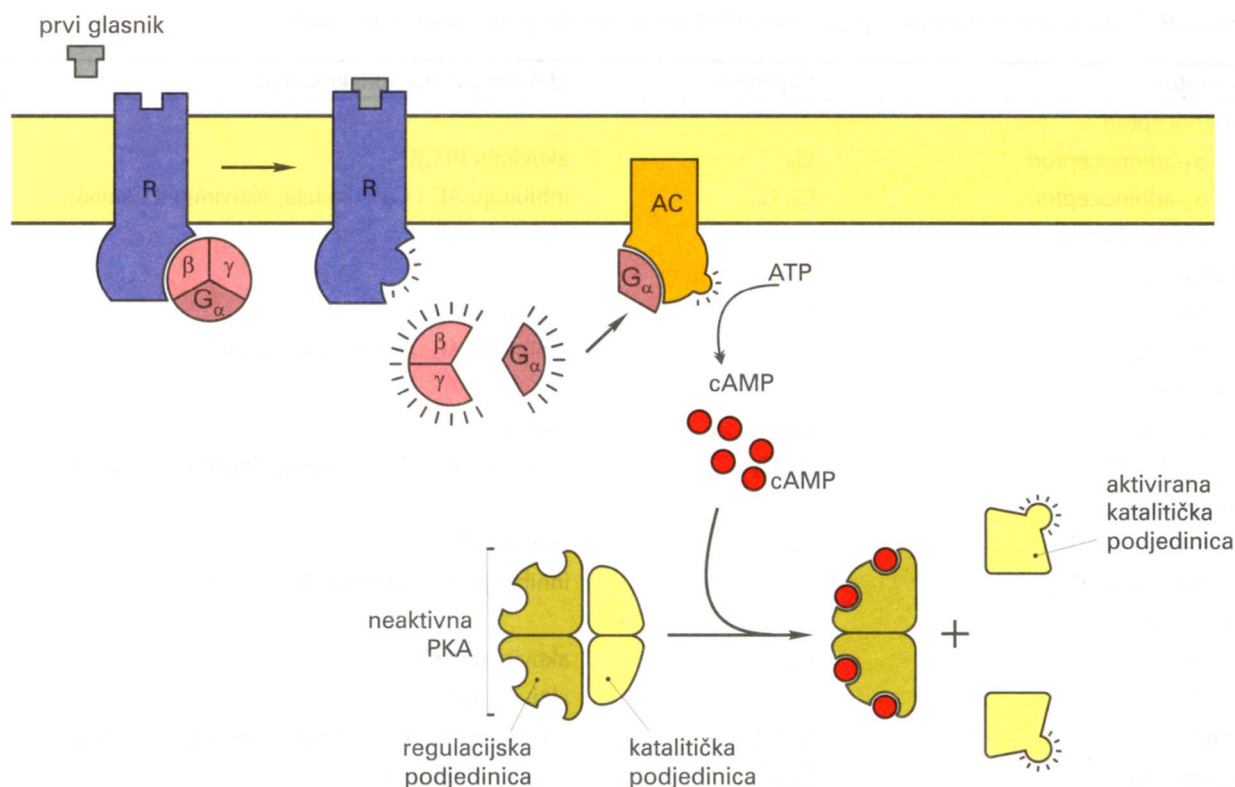
Ionotropni receptori zapravo su **ionski kanali regulirani neurotransmiterom**, a uključeni su u *brzu sinaptičku signalizaciju* između neurona i drugih neurona ili ciljnih stanica. Tri glavna primjera takvih receptora su: nAChR, tj. nikotinski receptor za acetilkolin (neurotransmitter neuromišićne sinapse), GABA_A receptor i glutamatni receptori (GABA je glavni inhibicijski, a glutamat glavni ekscitacijski neurotransmitter u središnjem živčanom sustavu).

Metabotropni receptori vezani su uz **G-proteine**, a djeluju na signalne funkcije ciljnih neurona *neizravno, regulirajući aktivnost zasebnih ciljnih proteina* (enzima ili ionskih kanala) vezanih uz staničnu membranu. Naime, u tom slučaju u reakciju između receptora i ciljnog proteina uključeni su posrednici - **trimerni G-proteini**. *Aktivacija ciljnog proteina ili promijeni koncentraciju jednog ili više drugih glasnika (ako je ciljni protein enzim) ili promijeni ionsku propusnost membrane (ako je ciljni protein ionski kanal)*. Metabotropni receptori djeluju sporije od ionotropnih, ali moćno djeluju na biokemijske procese u neuronu. Svi receptori vezani uz G-proteine članovi su iste nadobitjelji homolognih transmembranskih proteina što imaju **sedam transmembranskih domena povezanih unutarstaničnim i izvanstaničnim petljama**, obično 350-500 aminokiselina i molekulsku težinu od 40-55 kDa. Receptori vezani uz G-proteine ujedno su i najveća obitelj receptora stanične membrane. Oni posreduju odgovore neurona na vrlo raznolike signalne molekule (hormone, neurotransmitere i lokalne medijatore); pritom ista vrsta signalne molekule može aktivirati različite vrste metabotropnih receptora.

Trimerni G-proteini združuju metabotropni receptor s ciljnim enzimima ili ionskim kanalima

U stanicama su nazočne dvije vrste G-proteina tj. proteina što na sebe vežu GTP: a) **monomerni G-proteini** ili **monomerni GTPaze**, što imaju jednu podjedinicu i b) **trimerni G-proteini**, što imaju tri podjedinice (α , β , γ). I monomerni i trimerni G-proteini su GTPaze i djeluju kao molekularne sklopke što osciliraju između dva konformacijska stanja. U *aktivnom* stanju na njih je vezan GTP, a u *inaktivnom* stanju vezan je GDP. "Aktivno" ovdje znači da G-protein djeluje kao signalna molekula što mijenja aktivnost drugih ciljnih molekula u stanici. Svi trimerni G-proteini su sastavljeni od tri različite podjedinice - α , β , γ . Aktivacija uzrokuje razdvajanje heterotrimernog G-proteina na α podjedinicu i $\beta\gamma$ dimer. Alfa podjedinica ima vezno mjesto za GTP/GDP. U neaktivnom stanju, sve tri podjedinice su spojene i usidrene (preko $\beta\gamma$ dimera) u membranu uz odgovarajući receptor; pritom je na α podjedinicu vezan GDP. U aktiviranom stanju, α podjedinica na sebe veže GTP, odvoji se od $\beta\gamma$ dimera i djeluje na ciljne proteine (sl. 9-3 i 9-4). Prema tome, a podjedinica određuje i receptornu i efektornu specifičnost dotičnog G-proteina.

Kad se **izvanstanična signalna molekula (izvanstanični ligand ili prvi glasnik)** veže za svoj receptor, promijeni se konformacija tog receptora i aktivira pridruženi G-protein (sl. 9-3 i 9-4). Time se G-proteinska sklopka "uključiti", što znači da dotad vezani GDP zamijeni s GTP. Kad potom G-protein hidrolizira vlastiti vezani GTP natrag u GDP, sklopka se "isključiti". No, prije toga, aktivirani G-protein uspije promijeniti aktivnost druge unutarstanične signalne



Slika 9-4. Aktivirani metabotropni receptori mijenjaju aktivnost adenilil ciklaze (AC) i koncentraciju cAMP u neuronu. Kad se aktivirana $G_{\alpha s}$ podjedinica G-proteina veže na AC, ta počne pretvarati ATP u cAMP. cAMP se veže na protein kinazu A (PKA) i time je aktivira (PKA je jedini unutarstanični ciljni protein za koji se veže cAMP!). Aktivirana PKA potom može fosforilirati niz ciljnih proteina. Nadalje, kad se na AC veže aktivirana $G_{\alpha i}$ podjedinica G-proteina, AC prestaje stvarati cAMP. Tako metabotropni receptori, ovisno o vrsti pridruženog G-proteina, mogu i povećati i smanjiti koncentraciju cAMP u neuronu. Nacrtno, uz izmjene, prema Alberts i sur. (1994).

molekule. Pritom je poglavito riječ o promjeni koncentracije nekog od drugih glasnika (cAMP, cGMP, Ca^{2+} , IP_3 , DAG), a G-proteini prenose i pozitivne i negativne (stimulacijske i inhibicijske) signale - dakle, mogu ili pojačati ili smanjiti aktivnost ciljne molekule.

G-proteini izravno djeluju na niz ciljnih proteina, a te dijelimo u dvije skupine: enzime (npr. adenilil ciklaza, fosfodiesteraza aktivirana cGMPom, fosfolipaza C β i fosfolipaza A $_2$) i ionske kanale (za K^+ , Na^+ i Ca^{2+}).

Djelujući na adenilil ciklazu, G-proteini mijenjaju koncentraciju cAMP u neuronu

Normalna koncentracija cAMP u neuronu je oko 10^{-7} M.

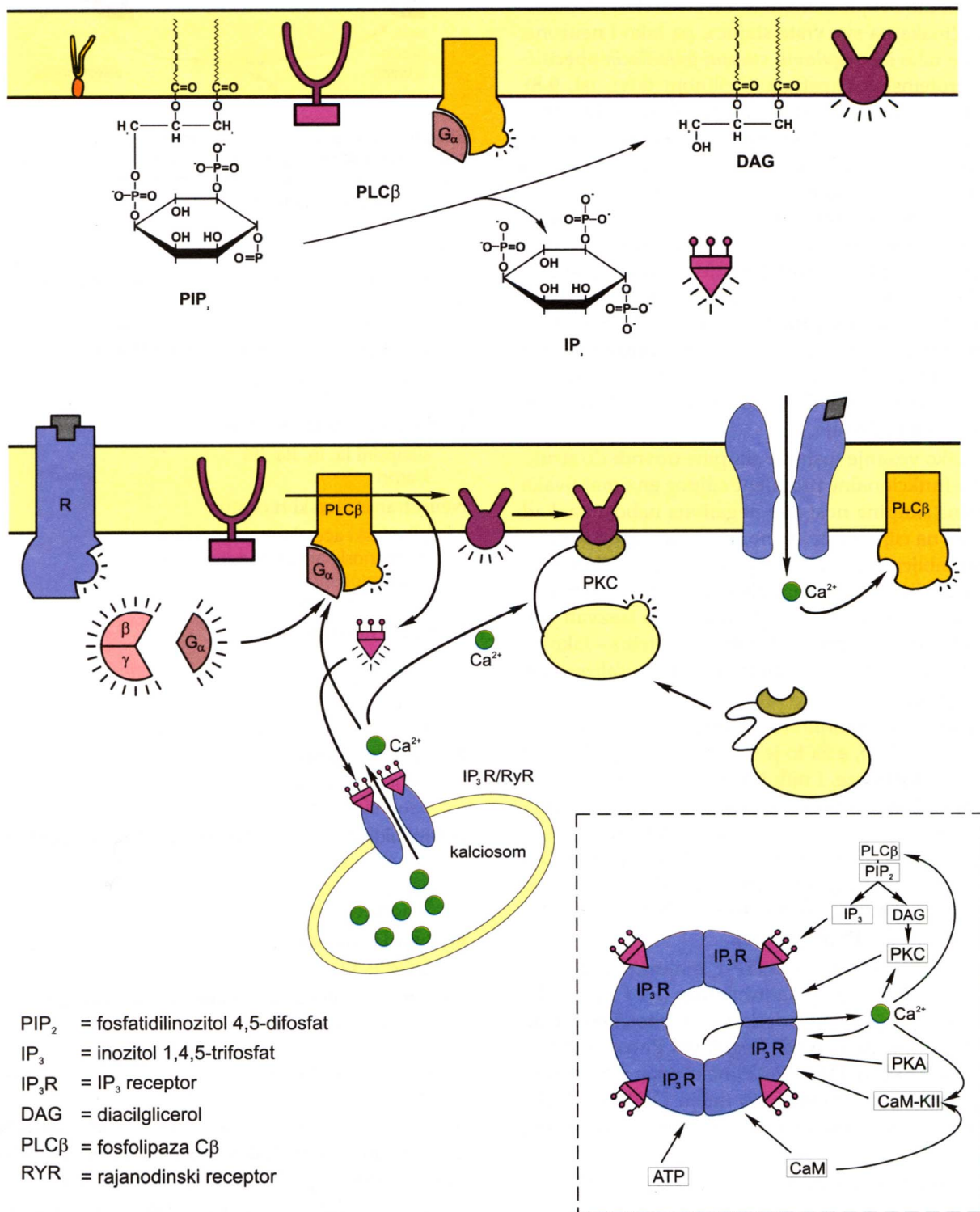
Adenilil ciklaza je enzim vezan uz staničnu membranu, što sintetizira cAMP iz ATP; **cAMP fosfodiesteraza** brzo i kontinuirano hidrolizira cAMP u 5'-AMP. Mnoge izvanstanične signalne molekule preko G-proteinskih receptora mijenjaju aktivnost adenilil ciklaze i time nadziru koncentraciju cAMP u neuronu (sl. 9-4). Stimulacijski G-protein ($G_{\alpha s}$) aktivira adenilil ciklazu, a inhibicijski G-protein ($G_{\alpha i}$) je inhibira.

Inhibicijski G-protein može imati isti bg dimer kao i $G_{\alpha s}$, ali ima različitu a podjedinicu ($G_{\alpha i}$) što inhibira adenilil ciklazu.

No, i $\beta\gamma$ dimer može inhibirati sintezu cAMP na dva načina: izravno (vezanjem na adenilil ciklazu) i neizravno (vezanjem za slobodne $G_{\alpha s}$, što onda ne mogu aktivirati adenilil ciklazu).

Mijenjajući koncentraciju cAMP u njušnim receptorima, posebni G-proteini omogućuju prijenos "njušnih" signala u mozak

Posebni njušni neuroni u sluznici nosa omogućuju nam razlikovanje više od 10.000 različitih mirisa. Receptori na površini tih neurona, za koje se vežu molekule mirisnih tvari, združene su s "njušnim" G-proteinima (G_{olf}) što aktiviraju adenilil ciklazu. Nastali cAMP aktivira Na^+ -kanale, pa Na^+ utječu u stanicu, depolariziraju membranu njušnih neurona i uzrokuju nastanak "njušnih" akcijskih potencijala što duž aksona njušnih neurona putuju u mozak. Njušni receptori imaju i druge, slabije proučene, biokemijske mehanizme za stvaranje signala; no svi su njušni receptori vezani uz G-proteine, a tako je po svemu sudeći i kod okusnih receptora.



Slika 9-7. Fosfolipaza C β (PLC β) cijepa fosfatidilinozitol difosfat (PIP_2) na inozitol trifosfat (IP_3) i diacilglicerol (DAG). I IP_3 i DAG su važni drugi glasnici: IP_3 sudjeluje u oslobađanju Ca^{2+} iz unutarstaničnih skladišta, a DAG aktivira protein kinazu C (PKC). IP_3 -receptor (IP_3R) smješten je u membrani unutarstaničnih skladišta kalcija i zapravo je »kanal za oslobađanje Ca^{2+} « (kao i r-ajanodinski receptor – vidi niže i Dodatni okvir 9-3). **Umetak:** Aktivnost IP_3R mogu mijenjati brojne molekule: protein kinaze (PKA, PKC, CaM-K II), ATP, Ca^{2+} /kalmodulin (CaM) i sami Ca^{2+} . Nacrtao, uz izmjene i dopune, prema Alberts i sur. (1994).

Mijenjajući koncentraciju cGMP u fotoreceptorima mrežnice, posebni G-proteini započinju prijenos "vidnih" signala u mozak

Kad svjetlost aktivira molekule **rodopsina** u fotoreceptorima (štapčićima i čunjićima) mrežnice, zatvore se Na⁺-kanali stanične membrane, nastaje hiperpolarizacija membrane i prekida se sinaptička signalizacija. Građa rodopsina nalikuje građi G-proteinskih receptora (7 transmembranskih domena u oba slučaja), a i rodopsin je združen s posebnim G-proteinima - **transducinima** (G_t). Svaka molekula rodopsina sadrži kovalentno vezanu kromoforu, 11-*cis* retinal, što se gotovo trenutno izomerizira u sve-*trans* retinal nakon apsorpcije jednog fotona. To promijeni konformaciju retinala, ali i pridruženog proteina **opsina**. Aktivirani protein tad se veže za G_{αt}, što potom aktivira **cGMP fosfodiesterazu**. Taj enzim hidrolizira cGMP i smanjuje njegovu koncentraciju u citosolu fotoreceptora. Molekule cGMP su inače u mraku vezane uz Na⁺-kanale i održavaju ih otvorenim, a sad se od njih odvoje, pa se kanali zatvore.

Neki G-proteini izravno nadziru ionske kanale i tako mijenjaju ekscitabilnost membrane

G-proteini mogu izravno aktivirati ili inaktivirati ionske kanale i tako promijeniti ionsku propusnost odnosno ekscitabilnost membrane neurona i drugih ekscitabilnih stanica. Naprimjer, neurotransmiter acetilkolin usporava i oslabljuje kontrakciju srčanog mišića. Acetilkolin se veže za svoje muskarinske receptore (alkaloid muskarin je specifični agonist tih receptora) i tako aktivira G_{αi} podjedinicu pridruženog G-proteina. Aktivirana G_{αi} inhibira adenilil ciklazu, no istodobno izravno otvara K⁺ kanale u membrani srčanih mišićnih stanica. To oteža depolarizaciju mišićne stanice i tako pridonosi inhibicijskom učinku acetilkolina.

G-proteini aktiviraju fosfolipazu Cβ i tako pokreću signalni put inozitolnih fosfolipida

Inozitolni fosfolipidi vezani su jedino uz citosolnu stranu lipidnog dvosloja stanične membrane. Najzanimljivije takve molekule su **fosfatidilinozitol** (PI) i njegov fosforilirani derivat **fosfatidilinozitol bifosfat** (PIP₂) (sl. 9-7). Signalni put inozitolnih fosfolipida započinje enzimskim cijepanjem PIP₂, a barem 25 različitih metabotropnih receptora djeluje na taj sustav. Kad se izvanstanična signalna molekula veže za svoj receptor, aktivira se posebni G-protein (Gp) što potom aktivira **fosfolipazu Cβ** (PLCβ). Za manje od jedne sekunde, taj enzim rascijepi PIP₂ na dva druga glasnika, **inozitol trifosfat** (IP₃) i **diacilglicerol** (DAG) (sl. 9-7). Tu se signalni put razdvoji na dva funkcionalna ogranka: IP₃ sudjeluje u oslobađanju Ca²⁺ iz unutarstaničnih skladišta, a DAG aktivira **protein kinazu C** (PKC).

G-proteini nadziru tri unutarstanična signalna puta u kojima sudjeluje pet drugih glasnika

G-proteini nadziru zbivanja na početku dva unutarstanična signalna puta (signalne kaskade) u koje su uključena četiri druga glasnika, kako slijedi:

- put cikličkih nukleotida** (drugi glasnici su **cAMP** i **cGMP**) i
- put inozitolnih fosfolipida** (drugi glasnici su **IP₃** i **DAG**).

Treći bitni signalni put (i peti drugi glasnik) su **slobodni ioni Ca²⁺ u citosolu**, uključeni u različite signalne procese. Ca²⁺ imaju ključnu ulogu u integraciji svih signalnih procesa u neuronu. Na ulogu Ca²⁺ G-proteini mogu utjecati izravno (regulacijom Ca²⁺-kanala u staničnoj membrani), no mnogo češće utječu neizravno, nadzirući djelovanje preostala četiri druga glasnika. Jedan od glavnih učinaka svih pet spomenutih drugih glasnika u neuronu je regulacija unutarstaničnih procesa **fosforilacije i defosforilacije različitih ciljnih proteina** - točnije, regulacija aktivnosti dvije velike skupine enzima uključenih u te procese: **protein kinaza i fosfataza**.

Procesi fosforilacije i defosforilacije ciljnih proteina imaju ključnu ulogu u signalnim funkcijama neurona

Silno mnoštvo izvanstaničnih signalnih molekula velik dio svojih raznolikih metaboličkih i fizioloških učinaka na sve vrste stanica, pa tako i neurone, izvode tako što reguliraju stupanj fosforilacije specifičnih proteinskih supstrata u ciljnom tkivu. Naime, za dugotrajnije promjene vlastite aktivnosti (što traju minutama ili satima) stanice uglavnom rabe mehanizme *reverzibilne kovalentne modifikacije enzima*. Te se modifikacije obično (no ne uvijek!) ostvaruju *dodavanjem fosfatne skupine na specifični serinski, treoninski ili tirozinski ostatak aminokiselinskog lanca ciljnog enzima*. Fosfatnu skupinu daje ATP, a njezino prenošenje na aminokiselinski ostatak kataliziraju **protein kinaze**. Njih dijelimo u dvije glavne skupine: **serin/treonin kinaze** i **tirozin kinaze**.

Kako vezanje fosfatne skupine dovodi do strukturno-funkcionalne promjene ciljnog enzima? Svaka fosfatna skupina nosi dva negativna naboja pa, kad se veže na ciljni protein, može privući "grozd" pozitivno nabijenih bočnih lanaca aminokiselinskih ostataka (npr. lizina, arginina i histidina). Takve promjene u jednom dijelu ciljnog proteina mogu izazvati promjene konformacije preostalog dijela proteina - tako se, primjerice, alosterički modulira aktivnost udaljenog veznog mjesta.

Naravno, fosforilirani protein gotovo uvijek treba i *defosforilirati*, a za to je zadužena druga skupina enzima - **fosfataze**. Neke su vrlo specifične i odstranjuju fosfatne skupine samo s jedne vrste proteina, dok su druge relativno nespecifične i djeluju na brojne različite ciljne proteine. Dosad su opisane tri glavne vrste neutralnih serin/treonin fosfataza: PrP-1, PrP-2A i PrP-2B (PrP je skraćena za engl. Protein Phosphatase).

U mozgu ima mnogo PrP-1, a njezinu aktivnost reguliraju dva endogena inhibitora (I-1 i I-2). Neka područja mozga imaju i dodatni inhibitor, DARPP-32 (= Dopamine and cAMP Regulated PhosphoProtein, mase 32 kDa). DARPP-32 ima mnogo u bazalnim ganglijima, u neuronima što imaju D₁-dopaminske receptore i u Purkinjeovim stanicama kore malog mozga.

PrP-2B (= **kalcineurin**) također je obilno nazočna u mozgu, ali je usko specifična. Ta fosfataza je heterodimer sastavljen od dva polipeptida, kalcineurina-A i kalcineurina-B. Kalcineurin-A ima katalitičku domenu i vezno mjesto za kalmodulin, a kalcineurin-B ima vezna mjesta za Ca²⁺.

Prema tome, aktivator kalcineurina je Ca²⁺/kalmodulin i to je jedina fosfataza što ju aktiviraju Ca²⁺. Kalcineurin može defosforilirati naponske Ca²⁺-kanale L-tipa (koje fosforilira PKA). Kalcineurin djeluje bilo izravno, bilo tako što defosforilira endogeni inhibicijski protein (npr. DARPP-32). **Kalpains** su vrsta proteaza aktiviranih kalcijevim ionima, a

moгу ireverzibilno aktivirati kalcineurin tako što izvedu ograničenu proteolizu veznog mjesta za kalmmodulin. Sve to ukazuje na tijesnu povezanost procesa fosforilacije i defosforilacije s homeostazom Ca^{2+} , što je od ključnog značenja za signalne funkcije neurona.

Fosforilacija proteina je "zajednički završni put" mnogih signalnih sustava i stoga je ključna za funkcioniranje svake stanice, pa tako i neurona. Pored tog sustava fosforilacije (u kojem sudjeluju kinaze, fosfataze i ATP), postoji još jedan, u koji su uključeni GTP i G-proteini. Drugim riječima, neuroni usporedno rabe dva velika fosforilacijska sustava.

Fosforilacija proteina ima ključnu ulogu u nizu vitalnih funkcija neurona: biosintezi i egzocitozi neurotransmitera, aksonskom prenošenju, zatvaranju i otvaranju ionskih kanala, stvaranju postsinaptičkih potencijala, migraciji neurona tijekom razvoja mozga, te razvoju i održavanju neuronskog fenotipa. Štoviše, fosforilacija proteina ima važnu ulogu u staničnim mehanizmima učenja, pamćenja i sinaptičke plastičnosti.

Opći slijed zbivanja u fosforilacijskim procesima je ovakav: izvanstanična signalna molekula (**prvi glasnik**) vezanjem za receptor promijeni aktivnost **drugog glasnika**. Taj potom mijenja aktivnost određene protein kinaze, a ona djeluje na specifični **ciljni protein** u stanici. Posljedica cjelokupnog zbivanja u takvom signalnom putu je **specifična promjena aktivnosti ciljne stanice**.

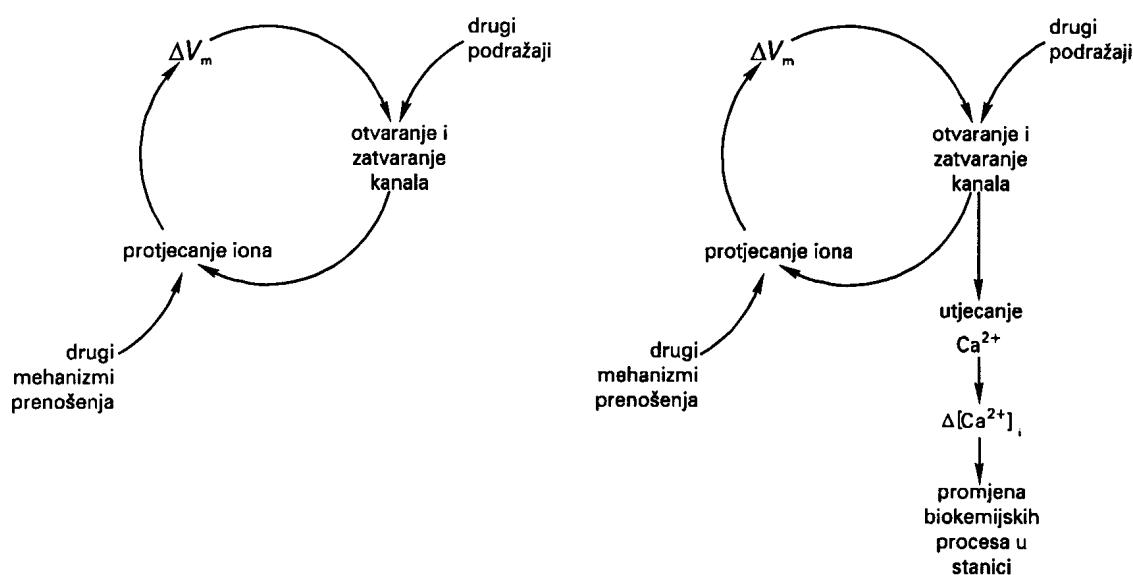
cAMP aktivira protein kinazu A (PKA)

Protein kinaze A (PKA) su serin/treonin kinaze ovisne o cAMP. U gotovo svim neuronima, glavna uloga cAMP je nadziranje aktivnosti PKA. Jedino u njušnim receptornim neuronima cAMP regulira posebnu skupinu ionskih kanala (inače, cAMP može aktivirati i transkripciju gena). Međutim, ciljni proteini na koje potom djeluju PKA različiti su u različitim neuronima, što objašnjava različite učinke cAMP na ciljne stanice.

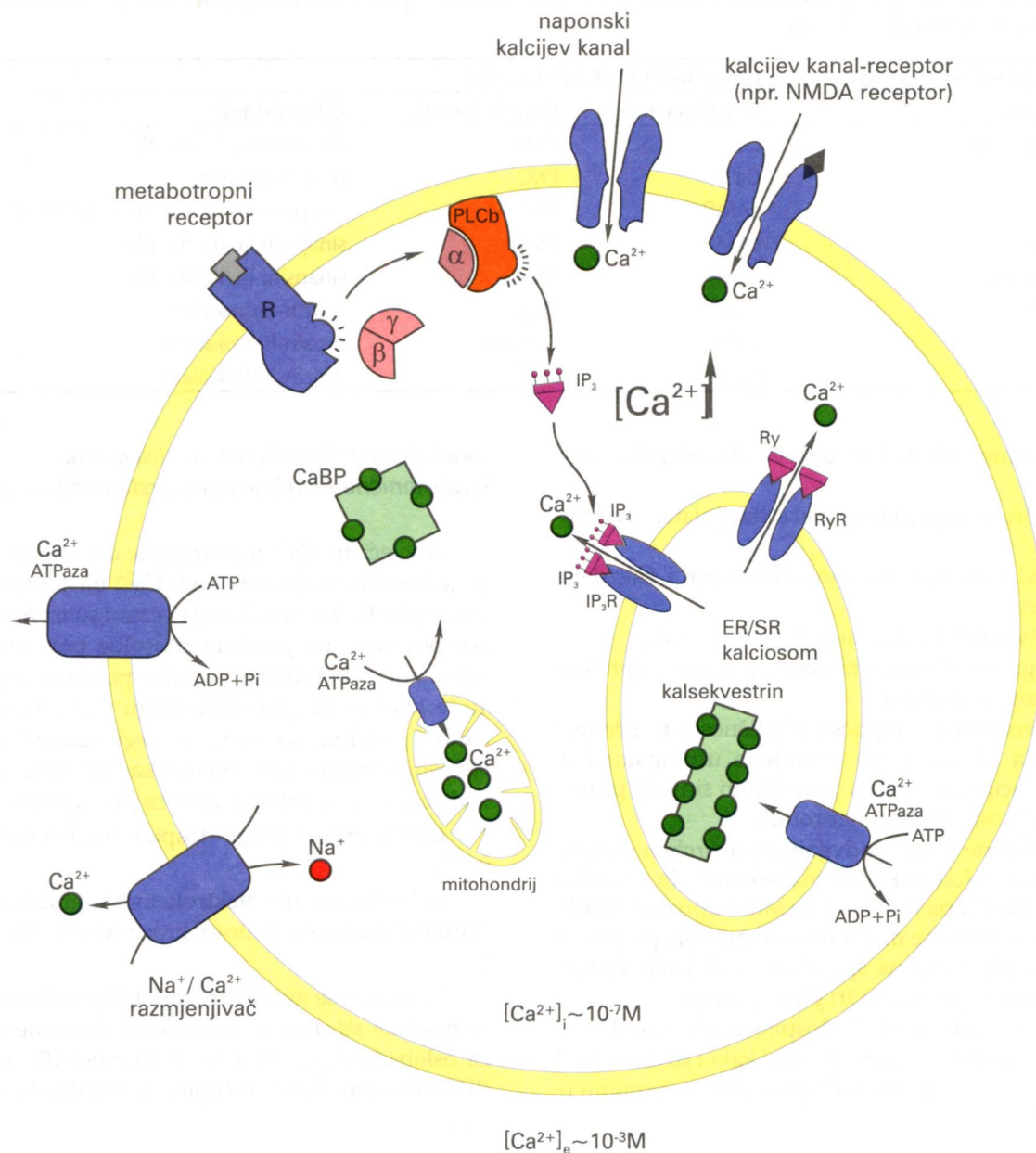
Neaktivna PKA je tetramer sastavljen od dvije katalitičke i dvije regulacijske podjedinice. Kad se na svaku regulacijsku podjedinicu vežu po dvije molekule cAMP, PKA se aktivira i regulacijske podjedinice se odvoje od katalitičkih; slobodne katalitičke podjedinice postaju aktivne i fosforiliraju različite ciljne proteine (sl. 9-4). Dvije molekule cAMP vežu se na jednu regulacijsku podjedinicu kooperativno, što znači da već male promjene koncentracije cAMP mogu dovesti do velikog porasta aktivnosti PKA.

DAG aktivira protein kinazu C (PKC)

Fosfolipaza C β (PLC β) rascijepi PIP₂ na IP₃ i DAG. DAG potom aktivira **protein kinazu C (PKC)**. PKC su cijela obitelj serin/treonin kinaza sastavljenih od jednog polipeptidnog lanca s katalitičkom domenom (na C-kraju) i regulacijskom domenom (na N-kraju). Glavni fiziološki aktivator PKC je DAG, no za punu aktivnost PKC potrebna su još dva aktivacijska kofaktora: Ca^{2+} i fosfatidilserin. Kad nema tih kofaktora, regulacijska domena inhibira aktivnost katalitičke tako što se tzv. pseudosupstratno mjesto veže na džep za vezanje supstrata u katalitičkoj domeni i time potiskuje aktivnost kinaze. Aktivirana PKC premješta se iz citosola prema membrani, uz koju se čvrsto usidri. PKC fosforilira niz ciljnih proteina - npr. ionske kanale i neurotransmitterske receptore - a najveću aktivnost ima upravo u mozgu. PKC fosforilira i



Slika 9-9. Ca^{2+} su jedini prevoditelji električnih signala u biokemijske procese u neuronu (desno); sam Hodgkinov ciklus prikazan je lijevo.



Slika 9-10. Homeostaza Ca²⁺ u neuronu. Iz izvanstanične tekućine, Ca²⁺ u neuron ulaze kroz aktivirane naponske Ca²⁺-kanale ili kroz aktivirane ionotropne glutamatne NMDA-receptore. Nadalje, metabotropni receptori što aktiviraju fosfolipazu Cβ (PLCβ) i time potiču stvaranje IP₃, također dovode do oslobađanja Ca²⁺ iz unutarstaničnih skladišta. Na oba načina, privremeno se povećava koncentracija slobodnih Ca²⁺ u citosolu; ti Ca²⁺ potom izravno ili u spoju s kalmodulinom djeluju na niz ciljnih proteina i tako mijenjaju biokemijske procese. Ca²⁺ se brzo odstranjuju iz citosola na nekoliko načina: a) Na⁺/Ca²⁺ razmjenjivač ih izbacuje iz stanice; b) Ca²⁺-ATPaza ih izbacuje iz stanice ili ih prenosi natrag u unutarstanična skladišta, tj. u posebne dijelove endoplazmine (ER) ili sarkoplazmine (SR) mrežice (tzv. »kalciosomi«), ili pak u mitohondrije; c) posebni puferski proteini (CaBP) također na sebe vežu dio Ca²⁺; d) dio Ca²⁺ se veže i na ciljne proteine (npr. kalmodulin). Ca²⁺ iz unutarstaničnih skladišta u citosol prolaze kroz posebne »kanale za oslobađanje Ca²⁺« a to su zapravo IP₃ receptori (IP₃R) ili rajanodinski receptori (RyR).

posebni protein specifičan za neurone: **neuromodulin** (= **GAP-43**), a taj je poglavito vezan uz presinaptičke membrane aksonskih završetaka. Produljena aktivacija PKC ovisi o drugom valu stvaranja DAG, što ga kataliziraju posebne fosfolipaze (**fosfolipaza D - PLD**) čija je zadaća da cijepaju glavni membranski fosfolipid fosfatidilkolin. Tako nastaje fosfatidna kiselina što se potom defosforilira u DAG.

Bitno je da različiti neuroni u različitim područjima mozga sadrže različite izooblike PKC, vezane uz specifične signalne funkcije dotičnih neurona. PKC poglavito djeluje na proteine uključene u sinaptičku signalizaciju.

Posebna uloga i homeostaza Ca^{2+} u neuronima

Ioni kalcija imaju ključnu ulogu u najvažnijim funkcijama živčanog sustava i djeluju kao univerzalni drugi glasnik

Slobodni ioni kalcija u citosolu svake stanice, pa tako i neurona, imaju brojne značajne funkcije. Istaknimo odmah vjerojatno najvažniju funkciju Ca^{2+} u neuronu: **Ca^{2+} su jedina veza ("prevoditelj" signala) između promjena membranske ekscitabilnosti i promjena biokemijskih procesa u neuronu** (sl. 9-9). Bez Ca^{2+} , živčani sustav ne bi imao izlaznih funkcija! Naime, promjene membranskog potencijala reguliraju ionske kanale, a ionski kanali reguliraju promjene membranskog potencijala (Hodgkinov ciklus - sl. 9-9). No, živčani sustav nije električna naprava; većina ekscitabilnih stanica napokon promjene električne ekscitabilnosti membrane "prevodi" u *neki drugi oblik aktivnosti*. Promjene električne ekscitabilnosti moduliraju utjecanje Ca^{2+} u neuron kroz Ca^{2+} -kanale. Time se zapravo fino podešava koncentracija slobodnih Ca^{2+} u citosolu - $[\text{Ca}^{2+}]_i$, što djeluje na niz bioloških procesa; no neurobiologa najviše zanima uloga Ca^{2+} u pet bitnih funkcija živčanog sustava:

- zduživanju neuralne ekscitacije i mišićne kontrakcije;
- zduživanju neuralne ekscitacije i žljezdane sekrecije;
- otvaranju i zatvaranju ionskih kanala;
- egzocitozi neurotransmitera iz presinaptičkog aksonskog završetka i
- procesima sinaptičke plastičnosti, tj. učenja i pamćenja (dugoročnije promjene unutarstanične koncentracije Ca^{2+} mogu promijeniti sintezu proteina ili ekspresiju gena u neuronu!).

Navedene pojave odvijaju se u *širokom vremenskom rasponu* (od nekoliko milisekundi do nekoliko dana ili duže!), pa je stoga vrlo bitno upoznati kratkoročne i dugoročne mehanizme regulacije promjena $[\text{Ca}^{2+}]_i$ u odgovoru na specifične podražaje. Pritom nastojimo odgovoriti na tri glavna pitanja:

- Kako slobodni Ca^{2+} dopijevaju u citosol?
- Kako dugo u njemu ostaju i kakvi su im učinci?
- Kako se slobodni Ca^{2+} ponovno odstranjuju iz citosola?

Ioni kalcija u citosol ulaze iz dva izvora: izvanstanične tekućine i unutarstaničnih skladišta

Najveći dio Ca^{2+} u neuronu je u vezanom obliku, pa je koncentracija slobodnih Ca^{2+} u citoplazmi vrlo mala (oko 10^{-7} M). Ioni kalcija vezani su uz membranske površine, uz posebne citosolne proteine, ili su izdvojeni (sekvestrirani) unutar posebnih organela. To je ključno za glasničku ulogu Ca^{2+} , jer *već male lokalne promjene koncentracije mogu izazvati značajne biokemijske učinke*. Ca^{2+} djeluje kao drugi glasnik tek kad se $[\text{Ca}^{2+}]_i$ višestruko poveća (na otprilike 10^{-5} M). Ca^{2+} u citosol mogu dospjeti na dva načina (sl. 9-10):

- krećući se niz elektrokemijski gradijent iz *izvanstanične tekućine* u citosol kroz otvorene Ca^{2+} -kanale,
- krećući se niz elektrokemijski gradijent iz *unutarstaničnih skladišta* u citosol kroz otvorene "kanale za oslobađanje Ca^{2+} " - a to su zapravo IP_3 receptori (IP_3R) ili rajanodinski receptori (RyR).

Ca^{2+} kanali neuronske membrane regulirani su ili naponom ili signalnom molekulom

Ca^{2+} -kanali stanične membrane omogućuju odabirno kretanje iona kalcija niz njihov elektrokemijski gradijent. Postoje brojne vrste Ca^{2+} kanala, no sve ih dijelimo u dvije temeljne skupine: regulirane naponom (naponski Ca^{2+} -kanali) i regulirane signalnim molekulama (kanali-receptori). Pritom, različiti neuroni često imaju različite Ca^{2+} kanale.

IP_3 oslobađa ione kalcija iz unutarstaničnih skladišta

U neuronima, ioni kalcija pohranjeni su u nekoliko **unutarstaničnih skladišta**: mitohondrijima, sinaptičkim mjehurićima, neurosekretnim mjehurićima, glatkoj endoplazminoj mrežici, u posebnim organelama dendritičkih trnova, a također su vezani uz posebne puferske proteine što vežu Ca^{2+} .

U mitohondrijima se može nakupiti velika količina Ca^{2+} . No, to se ne zbiva dok se $[\text{Ca}^{2+}]_i$ održava unutar normalnog dinamičkog fiziološkog raspona ($0,1 - 1,0$ mM), nego tek kad se prijeđe vrijednost od oko 5 mM (tj. u patološkim stanjima preopterećenja kalcijevim ionima - npr. tijekom ishemijsko/hipoksijskih ili ekscitotoksičnih stanja). Sinaptički mjehurići također ne pridonose bitno homeostazi Ca^{2+} u neuronu (u njima Ca^{2+} očigledno ima neke posebne funkcije).

Glatka endoplazmina mrežica neurona i sarkoplazmina mrežica mišićnih stanica su glavna unutarstanična skladišta kalcijevih iona. Ca^{2+} su posebno koncentrirani u mjehurićima tijesno vezanim uz glatku endoplazminu mrežicu, pa su te organele nazvane **kalciosomi**. Ioni kalcija u tim organelama uglavnom su vezani uz posebni protein, **kalsekvestrin** (sl. 9-10). Membrane tih organela sadrže posebne **kanale za otpuštanje kalcija**. Neki od tih kanala su **IP_3 receptori** (sl. 9-10). IP_3 nastaje cijepanjem PIP_2 uz membranu, brzo difundira kroz citosol, veže se na IP_3R na kanalu za oslobađanje kalcija i time ga otvori; Ca^{2+} tad iz unutarstaničnog skladišta utječu u citosol. Oslobođeni Ca^{2+} mogu se također vezati na IP_3 receptor i time još više pojačati oslobađanje kalcijevih iona iz skladišta (sl. 9-7, umetak). Taj dodatni mehanizam omogućuje da se Ca^{2+} često oslobode naglo, sve-ili-ništa načinom.

Taj se proces prekida na dva načina:

- specifične fosfataze naglo defosforiliraju IP_3 i tako ga inaktiviraju i
- Ca^{2+} što prodiru u citosol odmah se izbacuju iz stanice (ili vraćaju natrag u unutarstanično skladište).

Ca^{2+} se brzo odstranjuju iz citosola na više načina

Dok difundiraju kroz citosol, ioni kalcija susreću različite proteine uz koje se vežu visokim afinitetom (engl. CaBP - Calcium-Binding Proteins). Neki od tih proteina (npr. *kalmomodulin*) imaju druge glasničke funkcije (vidi niže), dok drugi (npr. *parvalbumin*, *kalbindin*, *kalretinin*) djeluju kao **primarni citosolni puffer za ione kalcija** (tzv. **puferski proteini**). Koncentracija tih puferskih proteina vrlo je različita u različitim neuronima. Primjerice, inhibicijski interneuroni što odašilju akcijske potencijale velikom učestalošću, ali *ne* i oni što odašilju akcijske potencijale malom učestalošću, sadrže *parvalbumin*. Vjeruje se da u takvim interneuronima parvalbumin brzo pufferira Ca^{2+} i

tako spriječi aktivaciju posebne skupine K^+ kanala ovisnih o Ca^{2+} (aktivacija tih kanala bi smanjila ekscitabilnost i produljila refrakturno razdoblje).

Kalmodulin je u mozgu vrlo koncentriran (30-50 mM) i nazočan u tijelima i dendritima većine neurona, ali *ne* i u aksonima i presinaptičkim završecima. **Kalbindina** ima u nekim vrstama neurona što su vrlo zanimljive neurolozima i neuropatolozima - npr. u Purkinjeovim stanicama kore malog mozga, dopaminskim neuronima nigrostrijatalnog puta, krupnim acetilkolinским neuronima bazalnog telencefalona, piramidnim neuronima CA1 sektora hipokampusa i zrnatim stanicama girusa dentatusa. Danas mnogi misle da su disfunkcija i/ili degeneracija tih neurona (npr. u Alzheimerovoj demenciji) povezane s promjenama njihove sposobnosti reguliranja $[Ca^{2+}]_i$.

Općenito, svaka vrsta neurona ima svoju "osobnost" obzirom na puferiranje Ca^{2+} , što odražava prevladavajuću komponentu procesa regulacije $[Ca^{2+}]_i$, a vezana je uz funkciju dotičnog neurona. S fiziološkog gledišta, puferiranje i odstranjivanje iona kalcija iz citosola ima ključnu ulogu u određivanju intenziteta i prostorno-vremenskih obilježja unutarstaničnih kalcijevih signala. S patofiziološkog gledišta, poremećaji homeostaze iona kalcija u neuronu (ili procesa ovisnih o tim ionima) uključeni su u degenerativne bolesti, starenje i ekscitotoksičnost, te ishemijsku i hipoglikemijsku što oštećuju mozak. Stoga je poznavanje homeostaze i uloge Ca^{2+} u mozgu vrlo značajno za kliničku medicinu.

Citosolni puferijski proteini djeluju brzo, ali im je kapacitet ograničen. Stoga oni mogu izdvojiti samo *manji dio* iona kalcija prispijelih u citosol (i to tijekom prvih nekoliko milisekundi tog procesa). Glatka endoplazmina mrežica sadrži **Ca^{2+} ATPazu** što Ca^{2+} prebacuje natrag u skladište; ta crpka djeluje sporije, ali je kapacitet skladišta mnogo veći. Napokon, stanična membrana sadrži **Ca^{2+} ATPazu** i **Na^+ / Ca^{2+} razmjenjivač**, što kontinuirano izbacuju ione kalcija iz stanice u izvanstaničnu tekućinu (sl. 9-10). Ca^{2+} ATPaza ima velik afinitet za Ca^{2+} , no mali kapacitet; Na^+ / Ca^{2+} razmjenjivač ima nešto manji afinitet za Ca^{2+} , no mnogo veći kapacitet - *taj sustav zapravo ima ključnu ulogu u izbacivanju Ca^{2+} iz neurona sisavaca.*

Ukratko, nakon što Ca^{2+} prispije u citosol, citosolni puferijski proteini ga vežu i bitno smanje $[Ca^{2+}]_i$; već tijekom prve milisekunde; tijekom sljedećih desetak milisekundi, glavina Ca^{2+} se prebaci natrag u unutarstanična skladišta, a tijekom sljedećih 0,1 - 1 sekundi preostali Ca^{2+} se izbace iz stanice (poglavito djelovanjem Na^+ / Ca^{2+} razmjenjivača).

Kalmodulin je posvudašnji unutarstanični receptor za Ca^{2+}

Kalmodulina ima u svim stanicama, a posebno u neuronima. Kalmodulin (CaM) je polipeptidni lanac sastavljen od otprilike 150 aminokiselina, s četiri vezna mjesta za Ca^{2+} (sl. 9-11). Vezanje Ca^{2+} za ta mjesta alosterički aktivira kalmodulin i tako nastaje **Ca^{2+} / kalmodulinski kompleks (Ca^{2+} / CaM)**; no, sam taj kompleks nije enzim, nego se veže za druge ciljane proteine i mijenja njihovu aktivnost. Riječ je o različitim enzimima i transmembranskim proteinima - npr. Ca^{2+} ATPazi. Povećana $[Ca^{2+}]_i$ aktivira kalmodulin, kalmodulin aktivira Ca^{2+} -ATPazu, a ona izbacuje Ca^{2+} iz stanice sve dok se $[Ca^{2+}]_i$ ne vrati na "mirujuću" vrijednost (time se inaktivira

kalmodulin, pa stoga i crpka). No, većina učinaka Ca^{2+} / CaM nisu tako izravni, nego su posredovani protein kinazama ovisnim o tom kompleksu (CaM-kinazama).

CaM-kinaze posreduju većinu učinaka Ca^{2+} u neuronu

CaM-kinaza II je najobilniji protein postsinaptičkih zgusnuća i ima važnu ulogu u sinaptičkoj signalizaciji. CaM-K II je multimerni holoenzim sastavljen od nestehiometrijskih količina dvije vrlo slične glavne podjedinice, a i b, što su ipak proizvod dva različita gena. Štoviše, te podjedinice su u različitim područjima mozga nazočne u različitim omjerima.

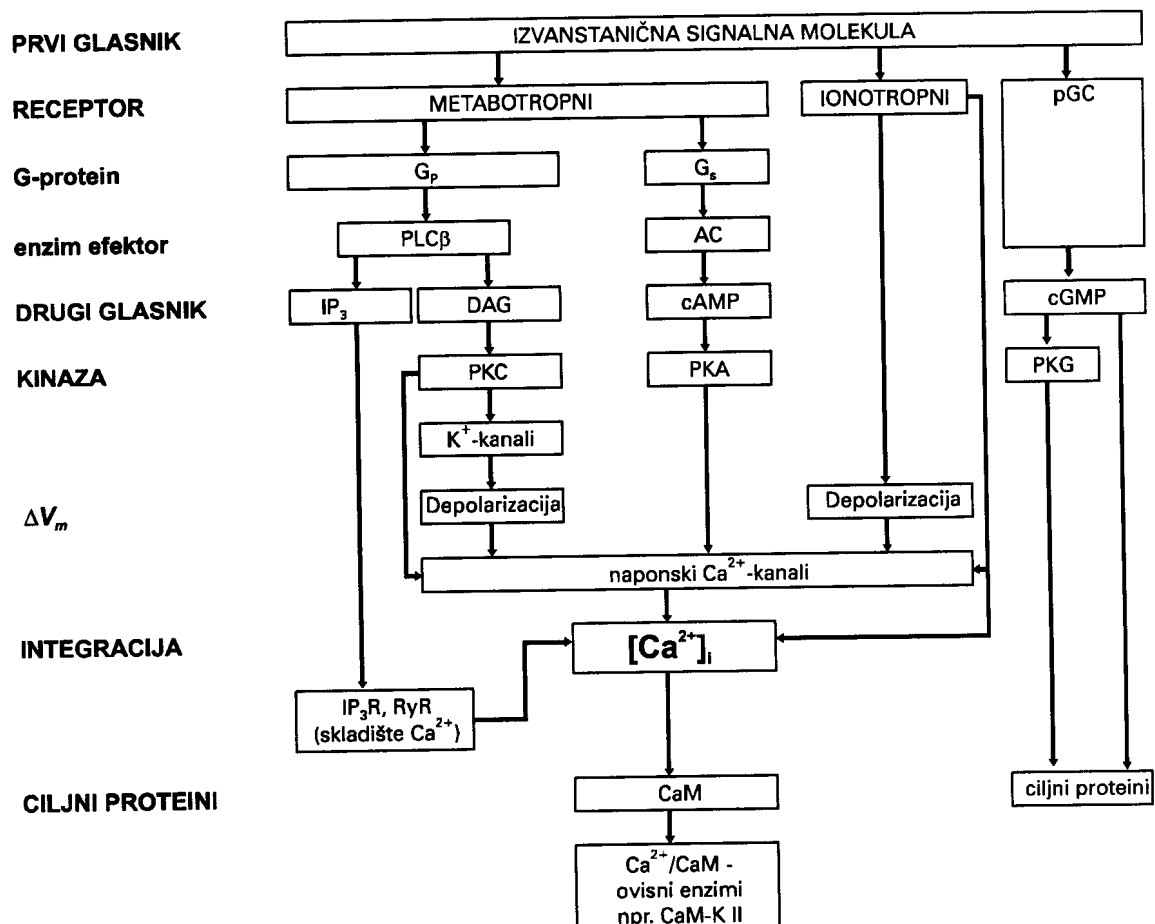
CaM-kinaza II može djelovati kao molekularni "mikročip" što se aktivira nakon izlaganja Ca^{2+} / CaM kompleksu, ali potom ostaje dugo aktivan čak i kad Ca^{2+} nestanu. To je moguće stoga što ta kinaza ima sposobnost autofosforilacije (osim što može fosforilirati druge ciljane proteine, može fosforilirati i sebe samu). U autofosforiliranom stanju, kinaza ostaje aktivna još dugo vremena nakon nestanka početnog kalcijevog signala. Stoga se vjeruje da ta kinaza, vezana uz sinapse, u procesima učenja i pamćenja služi kao "memorijski zapis" kalcijevog signala - neki čak slikovito govore o "kognitivnoj kinazi". Prema nekim pokusima, mutantni miševi, kojima nedostaje specifična podjedinica te kinaze, imaju specifične poremećaje upamćivanja položaja predmeta u svojoj okolini (tzv. deficite prostornog učenja).

Signalni putovi Ca^{2+} i cAMP su međusobno povezani

Signalni putovi Ca^{2+} i cAMP djeluju uzajamno na više hijerarhijskih razina nadzora. Prvo, koncentracija Ca^{2+} u citosolu može utjecati na koncentraciju cAMP i obrnuto. Primjerice, Ca^{2+} / CaM regulira i **cAMP fosfodiesterazu** (što razgrađuje cAMP) i **adenilil ciklazu** (što sintetizira cAMP). Obrnuto, PKA fosforilira neke Ca^{2+} kanale i crpke i tako mijenja njihovu aktivnost. Primjerice, PKA fosforilira IP_3 -receptor i (ovisno o vrsti neurona) stimulira ili inhibira oslobađanje Ca^{2+} iz unutarstaničnih skladišta. Drugo, enzimi što ih cAMP ili Ca^{2+} izravno nadziru mogu također djelovati jedni na druge (npr. PKA fosforilira neke CaM-kinaze). Treće, ti enzimi mogu zajednički djelovati na druge ciljane molekule u određenom signalnom nizu: npr. PKA i CaM-K II često fosforiliraju različita mjesta *istog* ciljnog proteina.

Ca^{2+} funkcionalno povezuje PKC i PLC β

Nakon aktivacije nekih metabotropnih receptora, PLC β stvara IP_3 , a taj potom oslobađa Ca^{2+} iz unutarstaničnih skladišta. Oslobodeni Ca^{2+} mogu izravno dodatno aktivirati PLC β i tako potaknuti *daljnje* oslobađanje Ca^{2+} iz unutarstaničnih skladišta. No, Ca^{2+} mogu biti i *prvi aktivator* fosfolipaze C β ; to se zbiva kad je prvi događaj u nizu utjecanje Ca^{2+} u citosol kroz naponske Ca^{2+} kanale. Prema tome, izravnim djelovanjem na PLC β , ioni kalcija mogu regulirati vlastitu koncentraciju u citosolu. Kad je početno povećanje $[Ca^{2+}]_i$ malo, aktivacija PLC β - IP_3 sustava djeluje kao važan *pojačivački sustav* za povećavanje $[Ca^{2+}]_i$, pa time i izazivanje *produljenjih* staničnih ili sinaptičkih promjena.



Slika 9-12. Sažeti prikaz glavnih signalnih putova u neuronu i njihovih uzajamnih veza. Prvi glasnici (neurotransmiteri) mogu aktivirati metabotropne ili ionotropne receptore. Metabotropni receptori aktiviraju niz G-proteina koji potom reguliraju aktivnost efektivnih enzima. Aktivirani efektorni enzimi (npr. PLC β , AC) stvaraju unutarstanične druge glasnike (npr. IP $_3$, DAG, cAMP). DAG aktivira PKC, a cAMP aktivira PKA; IP $_3$ oslobađa Ca $^{2+}$ iz unutarstaničnih skladišta. Protein kinaze mogu fosforilirati ciljne enzime i proteine ili izravno fosforilirati ionske kanale i time promijeniti membranski potencijal ili utjecanje Ca $^{2+}$ u neuron. Ionotropni receptori izravno dovode do promjena membranskog potencijala, pa time također mogu posredno djelovati na naponske Ca $^{2+}$ -kanale. No, neki ionotropni receptori (glutamatni NMDA-receptori) i izravno omogućuju utjecanje Ca $^{2+}$ u neuron, jer sadrže integralni kalcijski kanal. Kako vidite, većina tih procesa uključena je u nadzor nad koncentracijom slobodnih Ca $^{2+}$ u citoplazmi. Promjene koncentracije slobodnih Ca $^{2+}$ bitno utječu na biokemijske procese u neuronu, a većinu tih učinaka posreduju kalmodulin i Ca $^{2+}$ /kalmodulinom aktivirani enzimi (npr. CaM-K II).

S druge strane, PLC β uz IP $_3$ proizvodi i DAG, a DAG aktivira PKC. Kako na PKC djeluje i Ca $^{2+}$ /CaM, dolazi do sinergističkog učinka DAG i Ca $^{2+}$ na PKC. To može imati značajne posljedice, jer je PKC uključena u reguliranje propusnosti ionskih kanala, desenzitizaciju receptora i sinaptičku plastičnost.

Ioni kalcija mogu aktivirati posebne K $^{+}$ kanale (BK i SK kanale)

Ca $^{2+}$ mogu aktivirati posebnu vrstu K $^{+}$ -kanala što združuju metabolizam Ca $^{2+}$ i membranski potencijal s protokom K $^{+}$ i ekscitabilnošću membrane. U nekim neuronima, ti kanali omogućuju i moduliraju *uzastopno odašiljanje akcijskih potencijala*, a također pridonose *regulaciji sekrecije* nekih endokrinih i egzokrinih stanica. Ioni kalcija te kanale aktiviraju s citosolne strane. Kad su ti K $^{+}$ -kanali aktivirani, K $^{+}$ istječu iz stanice, dolazi do hiperpolarizacije membrane i smanjivanja ekscitabilnosti.

Neki od tih K $^{+}$ kanala imaju *veliku* vodljivost (200-300 pS), pa su to **BK kanali** (od engl. Big conductance K $^{+}$ channels). Na kromafinim stanicama i simpatičkim neuronima žabe dokazano je da BK kanali pridonose

repolariziacijskoj fazi akcijskog potencijala, a kad se repolarizacija dovrši ti se kanali inaktiviraju. **Karibdotoksin** (protein iz otrova jedne vrste škorpijona) blokira BK kanale skeletnih mišićnih stanica.

Drugi takvi kanali imaju *malu* vodljivost (10-14 pS), pa su to **SK kanali** (od engl. Small conductance K $^{+}$ channels). Ti su kanali odgovorni za *dugotrajnu hiperpolarizaciju skeletnih mišićnih stanica*, a mogu se blokirati **apaminom** (toksinom iz otrova pčela). Tijekom razvoja, SK kanali nestaju nakon što mišić postane inerviran, no opet se u odraslom mišiću pojave nakon denervacije (npr. presjecanja motoričkog živca). SK kanali vjerojatno su tzv. **apaminski receptori**, nazočni u membranama mišićnih stanica bolesnika s **miotoničnom mišićnom distrofijom**. U toj bolesti, smanjen je potencijal mirujuće membrane i javi se dugi nizovi akcijskih potencijala. Stoga je napetost mišića trajno povećana (miotonija), a on je ipak bitno oslabljen (distrofija).

Ioni kalcija aktiviraju nespecifične kationske kanale (CAN kanale)

Nespecifične kationske kanale aktivirane kalcijem (CAN kanali, od engl. Calcium-Activated Nonspecific

channels) imaju raznovrsne stanice (npr. srčane, žljezdane), pa tako i neuroni. Riječ je o jedinstvenoj skupini ionskih kanala, što imaju važnu ulogu u određivanju obrasca okidanja akcijskih potencijala i u združivanju ekscitacije i sekrecije. CAN kanali smješteni u membrani tijela neurona pridonose depolarizirajućem naknadnom potencijalu i stvaraju **predvodničke struje** (engl. pacemaker currents) u neuronima što periodično odašilju nizove akcijskih potencijala (riječ je o tzv. "rafalnim neuronima" - engl. bursting neurons). Slično ti kanali djeluju i u Purkinjeovim vlaknima srčanog mišića. Bit je njihovog djelovanja u tome što omogućuju *produljenu depolarizacijsku struju* kroz staničnu membranu i time *ponavljano stvaranje akcijskih potencijala*.

Neki vanjski signali mijenjaju ekspresiju gena odraslih neurona

Svaka odrasla stanica ima određena trajna i prepoznatljiva obilježja, po kojima lako prepoznavamo njezin fenotip. Takva svojstva odraz su kontinuirane ekspresije specifičnih skupova gena u specifičnim vrstama stanica. No, većina specijaliziranih stanica višestaničnih organizama također može promijeniti obrazac ekspresije svojih gena u odgovoru na specifične izvanstanične signale. Tu sposobnost imaju i odrasli neuroni ljudskog mozga. Drugim riječima, odrasli neuron može funkcionalno prilagoditi (a ponekad i promijeniti!) svoj fenotip u odgovoru na neke signale primljene posredstvom svojih površinskih receptora. Kratkotrajne promjene aktivnosti unutarstaničnih drugih glasnika mogu se prevesti u dugoročne promjene neuronskog fenotipa; kratkotrajna stimulacija neurona može doživotno promijeniti njegove funkcije.

Raznoliki podražaji, vezani uz procese ekscitacije zrelih neurona, mogu potaknuti prepisivanje (transkripciju) **gena ranog odgovora**. Ta je pojava uočena u odrasloj moždanoj kori i kori malog mozga nakon aktivacije glutamatnih NMDA-receptora, dopaminskih receptora i beta-adrenoceptora. Drugim riječima, *sinaptički prijenos signala u središnjem živčanom sustavu može izravno potaknuti promjenu ekspresije neuronskih gena*. Procese aktivacije površinskih receptora i transkripcije gena ranog odgovora mogu povezati različiti unutarstanični signalni putevi, a u većini tih puteva ključnu ulogu imaju protein kinaze i Ca^{2+} .

Aktivirani metabotropni ili ionotropni receptori posredstvom drugih glasnika (npr. DAG, cAMP, Ca^{2+}) aktiviraju PKC, PKA ili CaM-K II. Te protein kinaze ponekad izravno, a ponekad preko drugih posredničkih proteina, aktiviraju **proteine što reguliraju gene** (npr. SRF ili CREB), a ti se proteini potom vežu na specifične slijedove DNA u regulacijskom području gena (npr. SRE ili CaRE/CRE). Tako dolazi **do aktivacije udaljenog gena ranog odgovora** (npr. *c-fos*) na kojem započne prepisivanje **transkripcijskog faktora** (npr. AP-1) što potom aktivira **gen kasnog odgovora**. Geni kasnog odgovora mogu biti geni što kodiraju enzime uključene u sintezu ili razgradnju neurotransmitera, ili geni što kodiraju pojediničice ionskih kanala i transmitterskih receptora, ili proteine postsinaptičkog zgusnuća. Dakle, kratkotrajna aktivacija receptora na površini neurona može uzrokovati dugoročnu promjenu signalnih funkcija neurona, pa time i neuronskih mreža. To je posebno važno u procesima učenja i pamćenja.

Sažetak poglavlja: kratkoročne, srednjoročne i dugoročne posljedice aktivacije receptora

Učinci prvih glasnika (izvanstaničnih signalnih molekula) na ciljane neurone nisu određeni kemijskom građom tih glasnika već svojstvima njihovih ionotropnih i metabotropnih receptora. Primjerice, u neuromišićnoj sinapsi acetilkolin uzrokuje postsinaptičku ekscitaciju (i time kontrakciju skeletnog mišića) djelujući preko ionotropnih nikotinskih receptora; međutim, acetilkolin također usporava rad srčanog mišića djelujući preko inhibicijskih metabotropnih muskarinskih receptora. *Receptor određuje ekscitacijsko ili inhibicijsko djelovanje prvog glasnika, jer o receptoru ovisi hoće li ionski kanal biti aktiviran izravno prvim glasnikom ili pak neizravno, posredovanjem unutarstaničnih drugih glasnika.*

Integralni sastojak ionotropnih receptora je ionski kanal, a vezanje prvog glasnika promijeni konformaciju receptora i time izravno otvara (ili zatvara) ionski kanal. Metabotropni receptori preko G-proteina djeluju na efektorne enzime što proizvode unutarstanične druge glasnike. Drugi glasnik potom može izravno djelovati na ionski kanal, no češće aktivira neku protein kinazu; ta potom modulira djelovanje kanala bilo fosforiliranjem samog kanala bilo fosforiliranjem regulacijskog proteina što djeluje na taj kanal. Ponekad i G-proteini mogu izravno djelovati na ionske kanale. Slika 9-12 sažeto prikazuje glavne signalne putove u neuronu i njihovu povezanost.

Funkcije ionotropnih i metabotropnih receptora su različite. Ionotropni receptori uzrokuju *brze sinaptičke učinke* što traju svega nekoliko milisekundi. Stoga su to tipični receptori neurona uključenih u refleksne, osjetne i motoričke putove. Metabotropni receptori uzrokuju *sporije, ali i dugotrajnije sinaptičke učinke* što traju sekundama ili čak minutama. Ti sporiji učinci često služe moduliranju (prilagođavanju) ponašanja time što mijenjaju opću razinu ekscitabilnosti neurona i "snagu" sinaptičkih veza u temeljnim neuronskim krugovima. Ukratko, učinci aktivacije receptora mogu biti **kratkoročni** (privremene promjene ekscitabilnosti) ili **srednjoročni** (trajnije promjene ekscitabilnosti, povezane s promjenama biokemijskih procesa u ciljnim neuronima). Napokon, pod određenim uvjetima, aktivacija receptora može potaknuti ekspresiju gena ranog i kasnog odgovora, i tako **dugoročno** promijeniti funkcionalnu aktivnost neurona, pa čak i njegov fenotip!