

ARTYKUŁ POGLĄDOWY/REVIEW PAPER

Wpłynęło/Submitted: 25.02.2009 • Zaakceptowano/Accepted: 01.06.2009

© Akademia Medycyny

Anatomy and physiology of neuromuscular transmission - part I

Anatomia i fizjologia przewodnictwa nerwowo-mięśniowego - część I

Leo H.D.J. Booi¹, Leon Drobnik²

¹ Department of Anesthesiology, Radboud University Nijmegen, Netherlands

² Department of Anaesthesiology and Intensive Therapy, Poznan University of Medical Sciences, Poland



Summary

Transformation of the voluntary act of the mind into movements in human, have been subject of discussion among ancient philosophers. Development of natural sciences, especially in last decades, enabled detailed studies and rapid accumulation of information on structure and function of the neuromuscular junction. Molecular changes of the acetylcholine receptors or other nanostructures of the motor nerve endplate induce muscular dysfunctions of clinical significance, demanding searching for best therapeutic solutions and adequate approach to general anaesthesia. *Anestezjologia i Ratownictwo 2010; 4: 49-80.*

Keywords: receptor, muscarin-acetylcholine receptor, nicotin-acetylcholine receptor, acetylcholine, acetylcholinesterase, neuro-muscular junction, motor endplate, ion channel, motoric nerve, synapse, synaptic vesicle, muscle, muscle fiber, actin-myosin, action potential, rest potential, depolarization, activation

Streszczenie

Sposób przenoszenia aktu woli na wykonywanie ruchów przez człowieka był przedmiotem rozważań starożytnych filozofów. Rozwój nauk przyrodniczych, zwłaszcza w ostatnich dziesięcioleciach, pozwolił na dokładne poznanie struktury i funkcji złącza nerwowo-mięśniowego w najdrobniejszych szczegółach. Zmiany molekularne, jakie zachodzą w receptorach acetylochliny i innych strukturach motorycznej płytki końcowej powodują zaburzenia funkcjonowania mięśni o znaczeniu klinicznym, wymagającym poszukiwanie najlepszych sposobów leczenia tych zaburzeń oraz właściwego podejścia w czasie stosowania znieczulenia. *Anestezjologia i Ratownictwo 2010; 4: 49-80.*

Słowa kluczowe: receptory muskarynowe, receptory nikotynowe, acetylocholina, esteraza acetylochliny, złącze nerwo-mięśniowe, końcowa płytka motoryczna, kanał jonowy, nerwy ruchowe, synapsa, pęcherzyki synaptyczne, mięśnie, włókna mięśniowe, aktyna-miozyna, potencjał czynnościowy, potencjał spoczynkowy, depolaryzacja, pobudzenie

Introduction

Neuromuscular transmission (NMT) takes place at the NMJ, the most investigated synapse. Many of the investigations on the NMJ have been performed in both vertebrate and invertebrate animals. The information obtained from these animal studies is extrapolated to human. It has been demonstrated that in the evolution the NMJ remained with the same mechanisms. Furthermore, it is striking that neurotransmitter release, vesicle trafficking and synapse formation are similar throughout the nervous system and independent from the type of neurotransmitter. For example in a freshwater snail is a acetylcholine binding protein found which consists of five overlapping subunits homologous to the N-terminal extracellular halves of the subunits of the ionotropic receptors for Ach. It is most similar to the vertebrate neuronal acetylcholine receptors (AchR) composed of five α_7 subunits. The neurotransmitter-gated nicotinic AchR in the neuromuscular junction is a pentameric cationic ion channel, present in all animal species. The five subunits have an N-terminal extracellular domain bearing the ligand binding site, four trans-membrane regions (M1-M4), and a short extracellular C-terminus.

1. Short history of the research on neuromuscular transmission

Originally muscle contraction was thought to occur from gas being pumped into the muscles. Claudius Galen (129-200) considered that the blood pneumatised in the heart flowed up to the rete mirabile of the brain, giving rise in the lateral ventricles, to the delicate substance called “*psychic pneuma*” or “*spiritus animalis*”. Galen proposed that this “*pneuma*” then passed to the spinal cord and to the nerves (considered to be hollow) as the inducer of dynamis psychiké, from which muscular action would result. Galen stated: “*The nerves which in consequence enjoy the role of conduits, carry to the muscles the forces that they draw from the brain as from a source*” [1]. He thus considered the brain as a sort of pump that distributed the psychic pneuma coming from the sensory nerves, from the lateral ventricles toward the fourth ventricle, and then propels them via the motor nerves toward the muscles. In this model of muscle function was there supposed to be an increase in the volume of the muscle at contraction.

Wstęp

Przewodnictwo nerwowo-mięśniowe (*neuromuscular transmission* - NMT) ma miejsce w złączu nerwowo-mięśniowym (*neuromuscular junction* - NMJ), najczęściej badanym połączeniu synaptycznym. Dokonano wielu badań NMJ, tak u zwierząt kręgowych, jak i bezkręgowców. Informacje uzyskane w badaniach na zwierzętach odnoszono do ludzi. Wykazano, że mimo ewolucji w NMJ pozostały te same mechanizmy. Uderzającym jest także to, że uwalnianie neuroprzebieżników, przepływ pęcherzyków i tworzenie połączeń synaptycznych są podobne w całym układzie nerwowym i nie zależy to od rodzaju neuroprzebieżnika. U ślimaka słodkowodnego znaleziono na przykład białko wiążące acetylcholinę, złożone z pięciu nakładających się podjednostek, homologicznych z zewnątrzkomórkowymi połówkami N-końcowymi inotropowych receptorów dla acetylcholiny (Ach). Jest ono najbardziej podobne do złożonych z pięciu podjednostek α_2 receptorów acetylcholiny (AchR) u kręgowców. Kontrolowany przez neuroprzebieżnik AchR nikotynowy jest pentamerycznym kanałem kationowym, występującym u wszystkich gatunków zwierząt. Pięć podjednostek ma N-terminalne zakończenia, zawierające miejsca wiązania ligandów, cztery przezbłonowe regiony (M1-M4) i krótkie pozakomórkowe zakończenie C.

1. Krótka historia badań przewodnictwa nerwowo-mięśniowego

Początkowo uważano, że skurcz mięśni jest powodowany przez gaz, który jest pompowany do mięśni. Klaudiusz Galen (129-200) uważał, że wysycona gazem w sercu krew, płynęła do sieci dziwnej mózgu, powodując rozrastanie się w komorach bocznych delikatnej substancji, nazywanej “*psychiczną pneumą*” lub “*duszą zwierzęcą*” (“*spiritus animalis*”). Galen sądził, że “*pneuma*” przechodziła dalej do rdzenia kręgowego i nerwów (przypominających rurki) jako rozruszników dynamiki psychiké, odpowiedzialnej za pracę mięśni. Galen stwierdził: “*Nerwy, które ostatecznie odgrywają rolę przewodników, prowadzą do mięśni siły, które czerpią z mózgu, jak ze źródła*” [1]. Uważał więc on mózg za rodzaj pompy, rozprowadzającej psychiczną pneumą, przychodzącą z nerwów czuciowych, z komór bocznych do komory czwartej, a dalej rozprowadzanej przez nerwy ruchowe do mięśni. Założeniem tego

The theory of pneuma flow was widely accepted. Even Augustine of Hippo (St. Augustine) (354-430), in his neuropsychological writings, accepts the structure of the nervous system postulated by Erasistratus (De Genesi ad Litteram, 401-415) stating: "... and the air which is infused into the nerves obeys the will and moves the members without itself being the will". Later this theory changed from flowing gas to flowing fluid. Felice Fontana (1730-1805) proposed in his work "*De irritabilitatis legibers nunc primus sancitis et de spiritum animalium in movendis musculis inefficacia*" in 1767, that the nerves are constituted by thin cylinders containing a transparent and gelatinous fluid, whose mechanical alteration was responsible for movement in animals. The air or fluid theory was challenged by Jan Swammerdam (1637-16890), who found that muscle contraction was not accompanied by an increase in volume. He also demonstrated that he could cause contraction by contacting nerve or muscle with a metal forcaps. Nevertheless the theory of muscle contraction was accepted as appropriate until the seventeenth century, when Luigi Galvani (1737-1798) proposed the flow of electricity through the nerves. Until than it was thought that there is continuity from brain to nerve to muscle. Josef von Gerlach (1820-1896) proposed, in 1871, a "*reticular theory*", according to which the central nerve endings would not end freely, but would have protoplasmic prolongations that constitute a fine nerve fibre network ("*Nervenfasernetz*") [2]. This network was proposed to proceed into the innervated organ. Camillo Golgi (1843-1926) ascribes to the prolongations of the nerve cells purely trophic or nutritive functions, and never functions related to the phenomenon of conduction of the nervous impulse [3]. Luigi Galvani (1737-1798) was the first to propose that signal transfer was electrical. Galvani, in 1791 claimed that electricity "*...flows from muscles to nerves, or rather from the latter to the former, and that it traverses there either an arc or a series of men or any other conducting bodies ...*" [4]. Carlo Matteucci (1811-1868) initiated research which was continued by Emil du Bois-Reymond (1818-1896) who discovered the action potentials. Du Bois-Reymond suggested in 1848 that the transmission between nerve and muscle either was chemical or electrical [5]. Von Helmholtz in 1850 measured the nerve conduction velocity using Galvani's galvanometer [6]. The time had then come to recognize a gap between the nerve and the muscle. In 1836 Gabriel Valentin (1810-1883) and

modelu czynności mięśnia było zwiększenie objętości mięśnia podczas skurczu. Teoria przepływu pneumy była powszechnie akceptowana. Nawet Św. Augustyn z Hippony (354-430), w swoich pismach neuropsychologicznych, akceptuje strukturę układu nerwowego, proponowaną przez Erasistratusa (De Genesis ad Litteram, 401-415), stwierdzając: "...I powietrze, które wpływa do nerwów, słucha woli i porusza członki, samo nie będąc wolą". Później teoria ta zmieniła się z przepływu gazu na przepływ płynu. Felice Fontana (1730-1805) proponował w swojej pracy *De irritabilitatis legiberis nunc primus sancitis et de spiritum animalium in movendis musculis inefficacia* w 1767, że nerwy składają się z cienkich cylindrów, zawierających przezrystą i galaretowatą substancję, których mechaniczne zmiany są odpowiedzialne za poruszanie się zwierząt. Teorie powietrza i płynu odrzucił Jan Swammerdam (1637-16890), który stwierdził, że skurczowi mięśnia nie towarzyszy przyrost objętości. Wykazał także, że mógł wywołać skurcz dotykając nerwów mięśnia metalowym zaciskiem. Pomimo to teoria skurczu mięśnia przyjęła się jako słuszna, dopiero w siedemnastym wieku, kiedy Luigi Galvani (1737-1798) odkrył przepływ prądu elektrycznego przez nerwy, uległa zmianie. Do tamtego czasu uważano, że istnieje ciągłość przepływu z mózgu do nerwów i mięśni. Josef von Gerlach (1820-1896) zaproponował w r. 1871, "teorię retikularną", zgodnie z którą zakończenia nerwów odśrodkowych nie kończą się swobodnie, lecz mają protoplazmatyczne zakończenia, spletające się w delikatną siateczkę ("*Nervenfasernetz*") [2]. Uważano, że siateczka ta wnika do narządów unerwionych. Camillo Golgi (1843-1926) opisuje wypustki komórek nerwowych o czysto troficznej, odżywczej funkcji oraz funkcje nerwowe, związane z przewodzeniem bodźca [3]. Luigi Galvani (1737-1798) pierwszy wysunął przypuszczenie, że bodziec przemieszcza się elektrycznie. Galvani, w 1791 sprostował, że prąd elektryczny "*...nie płynie z mięśni do nerwów, a raczej z tych drugich do tych pierwszych, i że przechodzi albo przez mostek albo szereg bramek lub innych struktur przewodzących*" [4]. Carlo Matteucci (1811-1868) rozpoczął badania, które były dalej prowadzone przez Emila du Bois-Reymond (1818-1896), który odkrył potencjał czynnościowy. Du Bois-Reymond zasugerował w 1848, że przewodzenie między nerwem a mięśniem odbywa się chemicznie lub elektrycznie [5]. Von Helmholtz w 1850 mierzył szybkość przewodzenia w nerwach, używając galwanometru Galwaniego [6]. Czas więc dojrzał do poznania miejsca styku nerwu z mięśniem. W 1836 Gabriel Valentin

Emmert published independently from each other their studies on “nerve endings” [7,8]. They both held the belief that the efferent motor nerve fibre did not really terminate, but rather formed an arc-like loop before returning to the CNS as a sensory fibre, in a way similar to the capillaries of the vascular system. This idea was, as described above, also echoed by Golgi. However, even in 1934 were there still investigators that were the opinion that there is continuity between nerves and muscles. Boeke in that year described that unmyelinated nerve endings pierced the sarcoplasm and that neurolemma and sarcolemma were fused at the nerve terminal [9].

Doyère had already in 1840 visualized the nerve terminal and muscle interfaces and demonstrated that the nerve did not directly flow into the muscle [10]. However, the implication of this discovery was not recognized. W. Krause in 1863 described the axonal terminal branches and the associated, specialized zone on the muscle fibre. Recognizing that the mammalian NMJ is a rather compact plate composed of several cells and nuclei, he called the structure “*motorische Endplatte*” [11]. Although it has been claimed that Claude Bernard (1813-1878) discovered the physiological implications of the junction between nerve and muscle during his experiments on curare, was it indeed Edmé Félix Alfred Vulpian (1826-1887) who suggested in 1866 the presence of such an actual junction in his book “*Lecons sur la Physiologie Generale et Comparee du Systeme Nerveux*” [12]. Wilhelm F. Kühne (1837-1900) described in the 1870s the way the nerve endings terminate in a formation of the muscular membrane (subsequently the motor endplate), labelling the whole structure as “*the neuromuscular junction*” [13,14]. Charles Scott Sherrington (1857-1952) introduced the name synapse in 1897 for the connection between neurons or neurons and effector organ. Already Aristotle had used the terms syndesma and synapse in his anatomy and physiology book “*Parts of animals*”, where syndesma indicated the connection between spinal cord and segments of the backbone and synapse the connection between ten liver and the great “*blood vessel*” (aorta). John N. Langley (1852-1925) suggested in 1905 that the transmission from nerve to muscle was chemical and that this substance could initiate the muscle contraction [15]. In 1906 was acetylcholine synthesized by Hunt and Taveau [16]. Henry Hallett Dale (1875-1968) described in 1914 a substance capable of cleaving choline esters [17]. Tello in 1917

(1810-1883) i Emmert opublikowali niezależne od siebie wyniki swoich badań nad “zakończeniami nerwowymi” [7,8]. Obaj byli przekonani, że eferentne włókna nerwowe w istocie nie kończą się, lecz tworzą raczej łukowate pętle, przed powrotem do OUN jako włókna czuciowe, na podobieństwo naczyń włosowatych w układzie krwionośnym. Ten wyżej opisany pomysł znalazł powtórzenie u Golgiego. Z drugiej strony, nawet w 1934 r. byli badacze, podtrzymujący opinię o ciągłości przejścia nerwów w mięśnie. Boeke napisał w tym czasie, że zakończenia niezmielinizowanych włókien nerwowych przenikają sarkoplazmę, i że neurolemma i sarkolemma zlewają się na zakończeniach nerwów [9].

Doyère już w 1840 uwidoczniał złącze zakończenia nerwowego z mięśniem i wykazał, że nerw nie wnika bezpośrednio do mięśnia [10]. Nie rozpoznano jednak znaczenia tego odkrycia. W. Krause w 1863 opisał rozgałęzienia zakończeń aksonalnych i związanych z nimi, wyspecjalizowanych stref na włóknach mięśniowych. Przekonując się, że połączenie nerwo-mięśniowe (PNM) stanowi raczej zwartą płytkę, złożoną z szeregu komórek i ich jąder, nazwał ten twór „*motorische Endplatte*” („motoryczna płytka końcowa”) [11]. Pomimo przypisywania Claude Bernard (1813-1878) odkrycia fizjologicznego znaczenia połączenia między nerwem a mięśniem, podczas badań kurary, to w rzeczywistości jest to zasługą Edmé Félix Alfreda Vulpiana (1826-1887), który zasugerował w 1866 r. obecność takiego czynnego złącza w swoim podręczniku *Lecons sur la Physiologie Generale et Comparee du Systeme Nerveux* [12]. Wilhelm F. Kühne (1837-1900) opisał w 1870 r. sposób, w jaki zakończenia nerwowe docierają do tworu w błonie mięśniowej (nazywanego później końcową płytką motoryczną), nazywając całą strukturę „połączeniem nerwo-mięśniowym” [13,14]. Charles Scott Sherrington (1857-1952) wprowadził nazwę synapsy w 1897 dla styku neuronu lub neuronów z narządem wykonawczym. Już Arystoteles używał określenia syndesma i synapsa w swoim podręczniku anatomii i fizjologii *Części zwierząt*, gdzie jako syndesma oznaczone jest połączenie rdzenia kręgowego z kręgiem kręgosłupa, a jako synapsa połączenie między wątroba a „naczyniem krwi” (aorta). John N. Langley (1852-1925) zasugerował w 1905, że przewodzenie z nerwu do mięśnia zachodzi chemicznie, i że substancja ta może rozpoczynać skurcz mięśnia [15]. W 1906 Hunt i Taveau zsyntetyzowali acetylocholinę [16]. Henry Hallett Dale (1875-1968) opisał w 1914 substancję zdolną rozkładać estry cholinowe [17]. Tello w 1917 wykazał zależność od

demonstrated the structural diversity of junctions among various species and showed the fine details of the neuromuscular junction [18]. There after much progress was made in unravelling the morphology and functioning of the neuromuscular junction. Otto Loewi (1873-1961) et al. identified in 1926 acetylcholine as the neurotransmitter of the cholinergic system, and described that acetylcholinesterase is inhibited by physostigmine [19]. Annette Marnay and David Nachmansohn (1899-1983) showed in 1938 the presence of a high concentration of acetylcholinesterase at the sites of nerve-muscle contacts [20]. John Carew Eccles (1903-1997) and O'Connor recorded for the first time action potentials as signs of transmission at the endplate [21]. The fundamental role of acetylcholinesterase in cholinergic transmission was firmly established by Eccles in 1942 [22]. René Couteaux (1907-1999) and David Nachmansohn demonstrated biochemically that acetylcholinesterase activity was concentrated in the neural zone of muscle fibres, and persisted there even after denervation [23]. Mendel et al. found in 1943 that the plasma contains two enzymes that can hydrolyse acetylcholine [24].

Jose Del Castillo (1920-2002) and Bernard Katz (1911-2003), detected in 1954 that acetylcholine was released in quanta and developed in 1956 the vesicle theory of such quantal release [25,26]. In 1955, Del Castillo and Katz also demonstrated that using electrophysiological techniques, depolarisation of frog muscle occurred only when acetylcholine was applied to the endplate region, and that micro-iontophoresis of acetylcholine into the cell had no effect [27]. With these and subsequent experiments it was shown definitively that neurotransmitter receptors are located at the surface of neuron membranes, specifically at the level of the synapses. Andrew F. Huxley (1917-present), Hugh R. Huxley (1924-present), Rolf Niedergerke and Jean Hanson (1919-1973) developed the sliding filaments theory where at the level of the sarcomere, skeletal muscle contraction involved the sliding of actin filaments past myosin filaments [28,29].

Robertson in 1956 made the first electron microscopic pictures of the neuromuscular junction of the lizard [30]. Bernard Katz (1911-2003), Ulf von Euler (1905-1983) and Julius Axelrod (1912-2004), in a series of brilliant studies, developed the quantal release theory of cholinergic action at the neuromuscular junction, noted its dependence on calcium, formulated the principle of ion transport as a channel function

gatunków zróżnicowanie budowy i opisał szczegóły budowy złącza nerwowo-mięśniowego [18]. Od tego momentu zaznaczył się znaczny postęp w poznawaniu budowy i czynności połączenia nerwowo-mięśniowego. Otto Loewi (1873-1961) i współpracownicy zidentyfikował w 1926 r. acetylcholinę jako neuroprzekaźnik w układzie cholinergicznym i opisał hamowanie acetylcholinesterazy przez fizostyginę [19]. Annette Marnay i David Nachmansohn (1899-1983) wykazali w 1938 obecność acetylcholiny w wysokich stężeniach w miejscach kontaktów nerwowo-mięśniowych [20]. John Carew Eccles (1903-1997) i O'Connor pierwszy raz zarejestrowali potencjał czynnościowy jako sygnał przewodzenia w płytce końcowej [21]. Zasadnicze znaczenie acetylcholinesterazy w przewodnictwie cholinergicznym zostało wyjaśnione przez Ecclesa w 1942 r. [22]. René Couteaux (1907-1999) i David Nachmansohn wykazali biochemicznie, że aktywność acetylcholinesterazy skupiona jest w strefie nerwowej włókien mięśniowych i utrzymuje się tam nawet po odnerwieniu [23]. Mendel i wsp. odkryli w 1943, że osocze zawiera dwa enzymy, które hydrolizują acetylcholinę [24].

Jose Del Castillo (1920-2002) i Bernard Katz (1911-2003) wykryli w 1954, że acetylcholina jest uwalniana w porcjach i rozwinęli w 1956 roku teorię pęcherzykowego uwalniania kwantowego [25,26]. W 1955, Del Castillo i Katz także stwierdzili, stosując badania elektrofizjologiczne, że depolaryzacja mięśnia żaby następowała tylko wtedy, gdy acetylcholinę podawano w region płytki końcowej, i że mikroiontoforesa acetylcholiny do komórki nie wywierało żadnego skutku [27]. Te i kolejne badania wykazały ostatecznie, że receptor dla neuroprzekaźnika jest umiejscowiony na powierzchni błony neuronu, dokładniej na poziomie synaps. Andrew F. Huxley (1917- obecnie), Hugh R. Huxley (1924 - obecnie), Rolf Niedergerke i Jean Hanson (1919-1973) rozwinęli teorię ślizgających się włókien, gdzie na poziomie sarkomeru, skurcz mięśnia szkieletowego obejmuje przesuwanie się włókien aktywny w stosunku do włókien miozyny [28,29].

Robertson w 1956 wykonał pierwsze zdjęcie w mikroskopie elektronowym złącza nerwowo-mięśniowego jaszczurki [30]. Bernard Katz (1911-2003), Ulf von Euler (1905-1983) i Julius Axelrod (1912-2004), w serii błyskotliwych badań, rozwinęli teorię kwantowego uwalniania cholinergicznego w działaniu na złącze nerwowo-mięśniowe, dostrzegli jego zależność od wapnia, sformułowali zasadę transportu jonów jako funkcji kanałów w błonie komórkowej i rozpoznali zna-

in cell membranes, and recognised the role of membrane plasticity in the release of acetylcholine from synaptic vesicles. Birks, Huxley and Katz, in 1960 described the electron microscopic pictures of the frog neuromuscular junction [31]. In the same year Ricardo Miledi introduced, after carefully exploring the chemo-sensitivity to acetylcholine at rat diaphragm neuromuscular junctions, the concept of extra-synaptic receptors: these were located symmetrically, hundreds of micrometres from the end-plate [32]. Miledi also gave the first evidence of the so-called spill over of neurotransmitter, and also reported that the responses to repeated pulses of Ach diminished progressively in amplitude [33]. René Couteaux (1907-1999) and Monique Pécot-Dechavassine published in 1970 the first clear cut pictures of synaptic vesicle exocytosis [34]. Bittner and Kennedy pointed in 1970 out that some form of vesicle recycling must occur [35]. Holtzman, Freeman and Kashner published in 1971 the proof of the reuptake of vesicles [36]. In June 1970, the French neuroscientist Jean-Pierre Changeux, working at the Pasteur Institute in Paris, reported the isolation of the acetylcholine receptor protein from the electric organ of *E. electricus* [37]. Miledi in februari 1971 published the first isolation of the acetylcholine receptor protein of Torpedo electric tissue [38]. Katz in the same year described the vesicle as release quantum [39]. Dryer, Peper, Akert, Sandri and Moor were the first to freeze fracture the neuromuscular junction and described the active zones opposite to each fold in the muscles' post-synaptic membrane in 1973 [40]. Numa et al. cloned the acetylcholine receptor in 1982 [41]. Merlie and Sanes showed in 1985 that n-AchR mRNA is highly concentrated in the synaptic region [42]. The first synaptic vesicle protein was cloned in 1987 by Südhoff et al [43]. Perin et al. discovered synaptotagmin as the synaptic Ca^{2+} sensor in 1990, which by Katz in 1969 was already expected to exist [44]. Sussman et al. described in 1991 the three-dimensional structure of acetylcholinesterase [45]. After these developments research mainly focused on the proteins involved in neurotransmitter release and the formation and maintenance of the neuromuscular junction.

2. The function of the neuromuscular junction

Contraction of muscles plays an important role in basic biology actions as flight or fight. It requires

czenie plastyczności błony w uwalnianiu acetylocholino- z pęcherzyków synaptycznych. Birks, Huxley i Katz, w 1960 opisali zdjęcie elektrono-mikroskopowe złącza nerwowo-mięśniowego żaby [31]. W tym samym roku Ricardo Miledi, po starannym przebadaniu chemicznej wrażliwości na acetylocholinę złącza nerwowo-mięśniowego mięśnia przepony szczura, wprowadził koncepcję receptorów postsynaptycznych, które są umiejscowione symetrycznie, kilkaset mikrometrów od płytki końcowej [32]. Miledi znalazł pierwsze dowody tak zwanego wymywania neuroprzekaźnika a także stwierdził, że amplituda odpowiedzi na powtarzane impulsy Ach stopniowo maleje [33]. René Couteaux (1907-1999) i Monique Pécot-Dechavassine opublikowali w 1970 pierwszy ostry obraz egzocytozy pęcherzyka synaptycznego [34]. Bittner i Kennedy wskazali w 1970 r., że musi istnieć pewna forma krążenia zwrotnego pęcherzyków [35]. Holtzman, Freeman i Kashner opublikowali w 1971 r. dowód na zwrotne wchłanianie pęcherzyków [36]. W czerwcu 1970 r., francuski neuronaukowiec Jean-Pierre Changeux, pracując w Instytucie Pasteura, obwieścił o wyizolowaniu białka receptora acetylocholino z narządu elektrycznego *E. Electricus* [37]. Miledi w lutym 1971 r. doniósł o pierwszej izolacji białka receptora acetylocholino z tkanki elektrycznej Torpedo [38]. Katz w tym samym roku opisał pęcherzyki, jako uwalniane kwanty [39]. Dryer, Peper, Akert, Sandri i Moore byli pierwszymi, którzy zatrzymali rozdzielanie połączenia nerwowo-mięśniowego i opisali strefy aktywne, przeciwległe do każdego wgłębienia w mięśniowej błonie postsynaptyczną w 1973 [40]. Numa i wsp. sklonowali receptor acetylocholino w 1982 [41]. Merlie i Sanes wykazał w 1985 r., że mRNA n-AchR występuje w wysokim stężeniu w przestrzeni synaptycznej [42]. Białko pęcherzyków synaptycznych sklonowali po raz pierwszy w 1987 r. Südhoff i wsp.[43]. Perin i wsp. odkryli synaptotagminę jako sensor synaptyczny Ca^{2+} w roku 1990, którego istnienie przewidział Katz już w 1969 roku [44]. Sussman i wsp. opisali w 1991 roku trójwymiarową budowę acetylocholinoesterazy [45]. W następstwie tego rozwoju, badania skupiły się głównie na białkach odpowiedzialnych za uwalnianie neuroprzekaźnika oraz wytworzenie i utrzymanie połączenia nerwowo-mięśniowego.

2. Działanie złącza nerwowo-mięśniowego

Skurcze mięśni odgrywają istotną rolę w podstawowych reakcjach biologicznych, jak ucieczka lub walka.

that an impulse is transferred from the motor nerve to the muscle. This transfer takes place at the neuromuscular junction (NMJ) localized at an "endplate zone" in the middle of each skeletal muscle fibre, and takes less than 1 m-second. The NMJ has a particular anatomy and physiology. The overall shape of the NMJ differs between various animal species, but the physiology is remarkably similar. Human NMJs are much smaller than those in well-studied laboratory animals. The vertebrate NMJ, including that of man, is a tripartite synapse, composed of three cellular elements: 1.) the presynaptic nerve terminal or presynaptic membrane, 2.) the postsynaptic specialization or postsynaptic membrane, and 3.) the synapse-associated glial cells, called perisynaptic Schwann cells. Between the presynaptic membrane and the postsynaptic membrane is the synaptic cleft located, where the actual transfer of the signal must take place. The transfer is mediated by the neurotransmitter acetylcholine (Ach). The nicotinic acetylcholine receptors (n-AchR) are of major importance as receptors of the Ach mediated impulse transfer. A core pathway involving various peptides is responsible for the formation (synaptogenesis) and maintenance of the synaptic structure, and for the release of Ach. In synaptogenesis there is aggregation and localization of n-AchRs in the postsynaptic membrane.

The electrical motor stimulus arrives at the NMJ via the motor nerve and depolarizes the nerve membrane via voltage-gated ion channels. Each motor axon branches within the muscle into 20-100 thin terminal fibres each terminating on a single muscle fibre. The fewer muscle fibres are innervated by one single neuron the more subtle the movements of the muscle can be. In the NMJ the electrical stimulus is first transformed into a chemical stimulus. The n-AchR there after transforms the chemical signal, via ligand-gated ion channels, back into an electrical stimulus again. The electrical stimulus is amplified to cause contraction of the whole muscle. Thus the NMJ can also be seen both as a transformer and amplifier.

Disturbances in the morphology and functioning of the NMJ lead to many diseases, in which muscle weakness is a central characteristic. The NMJ is also the place where pharmacological interference resulting in paralysis, takes place during anaesthesia.

Wymaga to przenoszenia impulsów z nerwów ruchowych do mięśni. Przenoszenie to ma miejsce w złączy nerwowo-mięśniowym (NMJ – *neuromuscular junction*) zlokalizowanym w „strefie płytki końcowej” pośrodku każdego włókna mięśniowego i trwa krócej niż 1 milisekundę. NMJ ma szczególną budowę i funkcję. Wygląd ogólny NMJ różny jest u poszczególnych gatunków zwierząt, ale jego funkcja jest uderzająco podobna. Ludzkie NMJ jest znacznie mniejsze od tych dokładnie badanych u zwierząt doświadczalnych. U kręgowców NMJ, włączając w to człowieka, trójczłonowa synapsa składa się z trzech elementów komórkowych: 1) przedsynaptycznego zakończenia nerwu, czyli błony presynaptycznej, 2) postsynaptycznej błony specjalistycznej, czyli błony postsynaptycznej i 3) związanych z synapsą komórek glejowych, nazwanych presynaptycznymi komórkami Schwanna. Między błoną presynaptyczną a błoną postsynaptyczną znajduje się szczelina synaptyczna, gdzie musi zachodzić chwilowa transmisja. Przekaz (sygnału) odbywa się za pomocą neuroprzekaźnika acetylocholino (Ach). Nikotynowe receptory acetylocholino (n-AchR) odgrywają istotniejszą rolę niż receptory zależnego od Ach przenoszenia impulsu. Zasadniczym kierunkiem działań, z włączeniem szeregu peptydów, jest ukształtowanie (synaptogeneza) i utrzymanie struktury synaptycznej i możliwości uwalniania Ach. Podczas synaptogenezy następuje skupienie i umiejscowienie AchR na błonie postsynaptycznej.

Elektryczny bodziec ruchowy dociera do NMJ nerwem ruchowym i depolaryzuje błonę nerwową poprzez napięcie-zależne kanały jonowe. Każdy akson motoryczny rozgałęzia się w obrębie mięśnia na 20-100 cienkich włókien końcowych, z których każde dociera do jednego włókna mięśniowego. Im mniej włókien mięśniowych jest unerwionych przez jeden neuron, tym subtelniejsze mogą być ruchy mięśnia. Bodziec elektryczny jest zmieniany w NMJ początkowo na bodziec chemiczny. Następnie n-AchR ponownie zamienia sygnał chemiczny na bodziec elektryczny, poprzez kanały jonowe związane z ligandami. Bodziec elektryczny ulega wzmocnieniu, by umożliwić skurcz całego mięśnia. NMJ może więc jednocześnie być i przetwornikiem i wzmacniaczem.

Nieprawidłowości budowy i czynności NMJ prowadzą do wielu chorób, w których osłabienie mięśni jest głównym objawem charakterystycznym. NMJ jest też miejscem, w którym podczas znieczulenia zachodzi farmakologiczna interferencja, powodująca porażenie mięśni.

3. Cell excitation and stimulus formation

In nerve cells are stimuli initiated and propagated by depolarization processes, i.e. shifts of ions across cellular membranes cause changes in the electrical polarity of the membrane. The shift of ions takes place via ion-channels, gated pores with a radius of $\sim 3 \text{ \AA}$, that permit the passive flow of ions down their electrochemical gradients. The current that flows due to the polarity change is called the action potential. In order to be able to cause the shift in ions do excitable cells (nerve, heart, skeletal, and smooth muscle cells) possess a high number of voltage-gated ion channels. Non-excitable cells (epithelial, skin, liver, and salivary gland cells) have few voltage-gated ion channels and generally use only small changes in membrane potential (generator potentials) to initiate their responses. The ion-channels involved allow the passage of positively charged ions (cations). They share a common structural pattern: the central water-filled pore, through which the ions move, is usually formed by four or five trans-membrane α -helices (tetrameric or pentameric channels, respectively), arranged like the staves of a barrel.

3.1. Initiation and propagation of a nerve stimulus [46]

In resting cells there is, due to the presence of different concentrations of charged ions on both sides of the cell membrane, a resting potential. The inside of the cell membrane is positively charged compared to the outside of the membrane. The resting membrane potential of mammalian neurons is about -70 mV . When an input signal occurs, mechanically, chemically, or voltage-gated channels (usually Na^+ , Cl^- , or Ca^{2+}) open and due to a small shift in the ion concentration lead to a graded potential. When this potential is sufficiently strong, it will arrive at the trigger zone of the axon hillock, and the membrane depolarizes to threshold potential (-55 mV). Then voltage-gated sodium (Na^+)-channels rapidly open, and sodium rushes into the cell causing a large change in the polarity across the membrane.

The membrane potential then approaches the Nernst equilibrium potential for Na^+ (E_{Na}) of $+67 \text{ mV}$. This causes the rising phase of the action potential (Figure 1.). The voltage-gated Na^+ -channels now close quickly. Voltage-gated potassium (K^+)-channels, which take slightly longer than voltage-gated Na^+ -channels to open, begin to open and allow K^+ move out of the cell.

3. Pobudzenie komórki i kształtowanie bodźca

Bodźce rozpoczynają się w komórkach nerwowych i rozprzestrzeniają się w wyniku procesów depolaryzacji, tj. przesunięć jonów poprzez błony komórkowe, zmieniających biegunowość elektryczną błon. Przesunięcie jonów odbywa się przez kanały jonowe, zamykane pory o promieniu ok. 3 \AA , pozwalających na bierny przepływ jonów zgodnie z ich gradientem elektrochemicznym. Prąd, który przepływa wskutek zmiany biegunowości, nazywany jest potencjałem czynnościowym. By zapewnić rozprzestrzenianie się przesunięcia jonowego w procesie czynnościowym, komórki pobudliwe (nerwowe, serca, mięśniowe i mięśni gładkich), posiadają wiele kanałów jonowych napięciowo-zależnych. Komórki niepobudliwe (nabłonka, skóry, wątroby i ślinianek) mają mniej sterowanych napięciem kanałów jonowych i na ogół wymagają nieznacznej zmiany potencjału błonowego (potencjału generującego) do wywołania ich odpowiedzi. Czynne kanały jonowe umożliwiają przepływ jonów naładowanych dodatnio (kationów). Dzielą wspólny schemat budowy: ośrodkowy kanał wypełniony wodą, przez który przesuwają się jony, jest uformowany zazwyczaj z czterech lub pięciu jednostek przezbłonowych α -helix (odpowiednio kanały tetrameryczne lub pentameryczne) ułożonych jak klepek w beczulce.

3.1. Wzbudzenie i przepływ bodźca nerwowego [46]

Komórki w stanie spoczynku, dzięki różnym stężeniom elektrycznie naładowanych jonów po obu stronach błony, mają potencjał spoczynkowy. Potencjał spoczynkowy komórek nerwowych ssaków wynosi około -70 mV . Gdy pojawia się sygnał wejściowy, kanały jonowe, sterowane mechanicznie, chemicznie lub napięciowo (głównie dla Na^+ , Cl^- , lub Ca^{2+}) otwierają się i wskutek niewielkiej zmiany stężenia jonów prowadzi do gradacji potencjału. Jeśli jest ona dostatecznie duża, może osiągnąć strefę spustową przewężenia aksonu i błona ulega depolaryzacji, osiągając potencjał progowy (-55). Następuje wtedy błyskawiczne otwarcie sterowanych napięciem kanałów Na^+ i sód wpływa do komórki, powodując znaczną zmianę biegunowości przezbłonowej.

Potencjał błonowy zbliża się do potencjału równowagi Ernsta dla Na^+ (E_{Na}) of $+67 \text{ mV}$. Powoduje to wzrost fazy potencjału czynnościowego (*patrz: rycina 1.*) Teraz sterowane napięciem kanały Na^+ ulegają szybkiemu zamknięciu. Sterowane napięciem

As K^+ leaves the cell, the membrane potential rapidly becomes more negative. This causes the repolarizing or falling phase of the action potential and sends the membrane potential back toward the resting membrane potential. Voltage-gated K^+ -channels and other K^+ -channels remain open, and the membrane potential undershoots the resting value, approaching the Nernst equilibrium potential for K^+ (E_K) of -98 mV. This phase is called the after-hyperpolarisation. Finally, voltage-gated K^+ -channels close, and small ion fluxes return the membrane potential to its resting value.

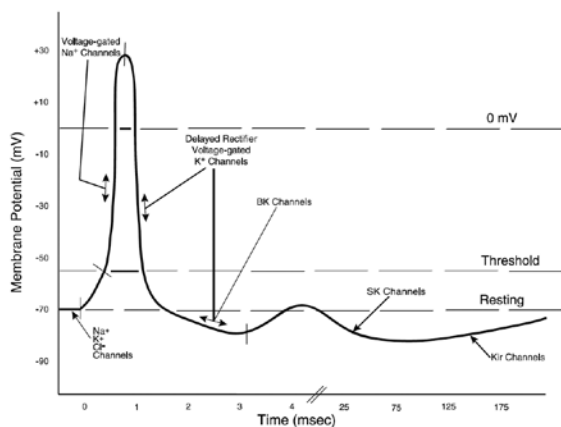


Figure 1. The action potential
Rycina 1. Potencjał czynnościowy

Depolarization of an excitable cell occurs from the influx of Na^+ and the efflux of K^+ . They are not equal to each other, and lead to a net influx of positive charges, which must be neutralized by anion influx. This influx of anions takes place through anion-selective channels that readily allow the passage of Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , and HCO_3^- . Upon depolarization an influx of Cl^- occurs to maintain electro-neutrality. Cl^- -channels oppose excitability by limiting the depolarizing stimulus, help to return a depolarized cell to resting voltage, and thus stabilize the membrane potential of excitable cells. The amount of anions present can increase or decrease the threshold potential. Inwardly rectifying K^+ -channels are involved in the last phase of recovery toward resting membrane potential following an action potential. Ca^{2+} -dependent K^+ -channels are activated by both depolarization and increases in intracellular free Ca^{2+} and contribute to the repolarization of neurons to resting membrane potential.

3.2. Activation of the nerve terminal

In the motor nerves is the action potential propa-

kanały K^+ , otwierające się wolniej niż sterowane napięciem kanały Na^+ , zaczynają się otwierać i umożliwiać wypływ K^+ z komórki. Gdy K^+ opuszcza komórkę, potencjał błony staje się gwałtownie bardziej ujemny. To powoduje repolaryzację albo fazę wygaszania potencjału czynnościowego i powrotu potencjału przezbłonowego do potencjału spoczynkowego. Kanały K^+ sterowane napięciem i inne kanały K^+ pozostają otwarte i potencjał błonowy spada poniżej wartości spoczynkowej, zbliżając się do potencjału równowagi Ernsta dla K^+ (E_K) z -98 mV. Ta faza nazywa się post-hiperpolaryzacją. Ostatecznie sterowane napięciem kanały K^+ zamykają się i mały prąd jonowy cofa potencjał błonowy do jego wartości spoczynkowej.

Depolaryzacja komórki pobudliwej następuje w wyniku wpływu Na^+ i wypływu K^+ . Nie są one sobie równe, czego wypadkową jest przewaga wpływu ładunków dodatnich, które muszą być zubożone wpływem anionów. Wpływ anionów odbywa się przez wybiórcze dla anionów kanały, umożliwiające łatwy pasaż Cl^- , Br^- , I^- , NO_3^- , i HCO_3^- . Następujący po depolaryzacji wpływ Cl^- utrzymuje stan elektrycznie neutralny. Kanały Cl^- przeciwstawiają się pobudliwości ograniczając impuls depolaryzujący, ułatwiając powrót komórki do napięcia spoczynkowego i stabilizując przez to potencjał błonowy pobudliwych komórek. Liczba obecnych anionów może zwiększać lub zmniejszać potencjał progowy. Dośrodkowo prostujące kanały K^+ uczestniczą w ostatniej fazie powrotu do potencjału spoczynkowego błony po potencjale czynnościowym. Kanały K^+ zależne od Ca^{2+} są aktywowane zarówno przez depolaryzację, jak i przez wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wolnego Ca^{2+} oraz przyczyniają się do repolaryzacji neuronów do stanu spoczynkowego potencjału błony.

3.2. Aktywacja zakończeń nerwowych

Potencjał czynnościowy rozprzestrzenia się w aksonie nerwu ruchowego w sposób skokowy, tj. potencjał "przeskakuje" z jednego przewężenia Ranviera na kolejne, zwiększając szybkość przewodzenia. Prawidłowa szybkość przewodzenia przekracza 50 m/sek. W błonie aksonalnej przewężeń Ranviera są gęsto rozmieszczone szybkie kanały Na^+ i nieliczne kanały K^+ . W tych właśnie miejscach działają środki znieczulenia miejscowego. Zakończenie nerwu ruchowego jest krótsze niż 100 μm i nie ma osłonki mielinowej. Jego błona bogata jest w prostownicze wolne i prostownicze dośrodkowe kanały K^+ i Na^+ . Pozwala

gated along the axon in a saltatory manner, i.e. the potential jumps from node of Ranvier to node of Ranvier, thereby passing a number of Ranvier nodes to increase the speed of conduction. The normal conduction velocity is more than 50 m/sec. The nodes of Ranvier have a high density of fast Na^+ -channels and few K^+ -channels in the axon membrane. It is here that the local anaesthetics exert their effect. The motor nerve terminal is less than 100 μM long and is un-myelinated. Its membrane is rich in delayed rectifier and inward rectifier K^+ -channels as well as only few Na^+ -channels. This allows the stimulus only to be propagated in the terminal and prevents dispersion of the signal. The arriving action potentials depolarize the membrane at the axon terminal. This causes opening of P/Q type voltage-gated Ca^{2+} -channels located in the pre-synaptic membrane, and allows Ca^{2+} to enter the neuron. The Ca^{2+} -channels are located in 2 parallel double rows of 5 channels and are 20 nm apart from each other, at a distance of 60 nm from the active zone [47]. The large number of channels allows rapid local increase in the Ca^{2+} -concentration. This Ca^{2+} starts a cascade of activities on peptides in the motor terminal, which ultimately lead to docking and fusion of Ach loaded vesicles with the presynaptic membrane. The Ach is released in the synaptic cleft and diffuses to the postsynaptic membrane (see section 4.1.4.). In Lambert-Eaton syndrome antibodies against the Ca^{2+} -channels decrease Ca^{2+} -influx and thus the release of Ach is limited (see section 6.3.).

3.3. Activation of the postsynaptic membrane

When Ach is diffused across the 20- to 30-nm wide synaptic cleft it will interact with the nicotinic n-AchRs, clustered at the rims of the junctional folds of the muscle membrane. When two Ach molecules bind to a n-AchR, a conformational change of the receptor opens the central pore and allows cations to flow into or out of the muscle cell. Since more Na^+ flows in than K^+ leaves, the muscle cell is depolarized to threshold for opening the nearby voltage-gated Na^+ -channels (see section 3.1.). This initiates amplification of the signal to a muscle action potential. Normally, an endplate potential is large enough to induce a sarcolemmal action potential that propagates from the endplate to the tendon and along the transverse tubular system. This membrane region projects deeply into the cell to ensure even distribution of the impulse. There the depolarization opens L-type voltage-gated Ca^{2+} -channels (dihydropyridin receptors) in the membrane

to tylko na przenoszenie bodźca w zakończeniu a zapobiega rozpraszaniu sygnału. Przybywający potencjał czynnościowy depolaryzuje błonę na zakończeniu aksonu. Powoduje to otwarcie typu P/Q napięciowozależnego kanału Ca^{2+} , umiejscowionego w błonie presynaptycznej i umożliwia wpływ Ca^{2+} do wnętrza neuronu. Kanały Ca^{2+} są rozmieszczone w dwu równoległych, podwójnych rzędach po 5 kanałów, oddalonych od siebie o 20 nm i w odległości 60 nm od strefy aktywnej [47]. Duża liczba kanałów umożliwia szybkie miejscowe zwiększenie stężenia Ca^{2+} . W zakończeniu nerwu ruchowego Ca^{2+} uruchamia kaskadę aktywacji peptydów, co ostatecznie prowadzi do przyczepiania do błony presynaptycznej i zlewania się ze sobą pęcherzyków, wypełnionych Ach. Ach jest uwalniana do szczeliny synaptycznej i dyfunduje do błony postsynaptycznej (*patrz: część 4.1.4.*). W zespole Lambert-Eaton, przeciwciała przeciwko kanałom Ca^{2+} zmniejszają napływ Ca^{2+} a przez to ograniczają uwalnianie Ach (*patrz: część 6.3.*).

3.3. Aktywacja błony postsynaptycznej

Dyfundująca poprzez mierzącą 20-30 nm szczelinę synaptyczną Ach wchodzi w interakcję z receptorami nikotynowymi n-AchR, skupionymi na grzbietach fałdów błony mięśnia w miejscu połączenia. Jeśli dwie cząsteczki Ach wiążą się z n-AchR, następuje zmiana ukształtowania receptora, otwierająca światło kanału na przepływ kationów do i z wnętrza komórki mięśniowej. Ponieważ wpływa więcej Na^+ niż K^+ wypływa, komórka mięśniowa ulega depolaryzacji do poziomu pobliskich kanałów bramkowanych napięciem (*patrz: część 3.1.*) Zapoczątkowuje to wzmocnienie sygnału do wielkości potencjału czynnościowego mięśnia. W normalnych warunkach, potencjał płytki końcowej jest wystarczająco duży, by wzbudzić potencjał czynnościowy sarkolemy, który rozprzestrzenia się z płytki końcowej aż do ścięgna i poprzez system kanalików poprzecznych. Ten obszar błony głęboko wnika w komórkę, zapewniając równomierne przewodzenie impulsu. Tam depolaryzacja otwiera bramkowane napięciem kanały typu L dla jonów Ca^{2+} (receptory dihydropirydyny) w błonie siatki sarkoplazmatycznej, pozwalając na wejście Ca^{2+} do sarkoplazmy mięśnia. Powoduje to zmianę struktury przestrzennej sąsiednich kanałów uwalniania Ca^{2+} (receptor ryandynowy), także zlokalizowanych na błonie retikulum sarkoplazmatycznego. Nagromadzony w siateczce sarkoplazmatycznej Ca^{2+} przemieszcza się gwałtownie

of the sarcoplasmic reticulum, allowing Ca^{2+} to enter the skeletal muscle sarcoplasm. This causes conformational change in adjacent Ca^{2+} -release-channels (the ryanodine receptor) which are also located in the membrane of the sarcoplasmic reticulum. Ca^{2+} sequestered in the sarcoplasmic reticulum rapidly moves into the system and binds to troponin C on the actin myofilament. This leads to the initiation of cross-bridge cycling of the muscle in the process known as excitation-contraction coupling. (see section 4.5.). Dysfunction of the ryanodine receptors plays an important role in malignant hyperthermia (see section 7.7.).

4. Anatomy and physiology of the neuromuscular junction

The NMJs in mammals have a diameter of 1-5 μM . In mammals is each muscle fibre in contacted with one single motor axon. An axon plus the connected muscle fibres form the motor unit. The more delicate the muscle movements have to be, the fewer muscle fibres are innervated by one single nerve fibre. One nerve impulse thus induces contraction of a number of muscle fibres of one and the same muscle. Only the extra-ocular muscles have multiple innervations per motor unit. Each nerve ending that makes contact with a muscle fibre is called a motor endplate.

Humans have, compared to other vertebrate's small nerve terminals that release only a few Ach quanta, which generate much smaller postsynaptic depolarisations than in other vertebrates. However, in human there are extensive folds and many Na^{+} -channels in the post-synaptic membrane which reduce the threshold for depolarisation by an amplification mechanism. The nerve terminal is covered with un-myelinated Schwann cells that play an important role in the formation and maintenance of the NMJ, and also in the amount of Ach released (Figure 2.). Under physiological conditions, the number of Ach quanta associated with each action potential is always higher than is necessary to establish a muscular action potential.

This excess of quanta released establishes, together with the high number of AchRs, the safety factor of the NMJ, making this synapse extremely reliable. To control muscle contractions, the release of Ach occurs in high-frequency bursts of activity, since motor neurons fire action potentials at high frequency. Interestingly, at these frequencies, the NMJ undergoes various forms of short-term plasticity (lasting up to a few minutes)

do układu i wiąże się z troponiną C włókien mięśniowych aktyny. To prowadzi do zapoczątkowania powtarzającego się krzyżowego mostkowania mięśnia, w procesie znanym jako sprzężenie pobudzenia i skurczu (*patrz: część 4.5.*) Dysfunkcja receptora rianodynowego odgrywa kluczową rolę w gorączce złośliwej (*Hyperthermia maligna*) (*patrz: część 7.7.*)

4. Anatomia i fizjologia złącza nerwowo-mięśniowego

U ssaków NMJ ma średnicę 1–5 μM , a każde włókno mięśniowe jest połączone z jednym aksonem nerwu ruchowego. Akson wraz z unerwianym włóknem mięśniowym stanowi jednostkę motoryczną. Im delikatniejsze muszą być wykonywane przez mięsień ruchy, tym mniej włókien mięśniowych jest unerwianych przez jedno włókno. Jeden bodziec nerwowy rozpoczyna skurcz licznych włókien tego samego mięśnia. Tylko mięśnie poruszające gałki oczne mają mnogie unerwienie jednostek motorycznych. Każde zakończenie nerwowe, stykające się z włóknem mięśniowym nazywane jest końcową płytką motoryczną (lub bardziej po polsku: ruchową).

Ludzie, w odróżnieniu od innych kręgowców, mają niewielkie zakończenia nerwowe, uwalniające tylko kilka pakietów Ach, które wytwarzają znacznie mniejszą depolaryzację postsynaptyczną niż u innych kręgowców. Ludzie mają jednak rozwinięte sfaldowania i liczne kanały Na^{+} błony postsynaptycznej, co obniża próg depolaryzacji poprzez mechanizm wzmacniającego. Niezmielinizowane zakończenie nerwowe jest osłonięte komórką Schwanna, odgrywającą istotną rolę w kształtowaniu, utrzymywaniu NMJ i ilości kwantów uwalnianej Ach (*patrz: rycina 2*). W warunkach fizjologicznych ilość pakietów Ach, dostępnych przy każdym potencjale czynnościowym, jest zawsze wyższa niż jest to konieczne, by osiągnąć potencjał czynnościowy w mięśniu.

Nadwyżka uwalnianych porcji oraz duża ilość AchRs, stanowi zabezpieczenie funkcji NMJ, zapewniając wysoką niezawodność tej synapsy. By sterować skurczem mięśnia, Ach pojawia się w wysoko częstotliwych salwach aktywności, ponieważ neurony ruchowe wyzwalają potencjały czynnościowe z dużą częstotliwością. Interesującym jest, że przy tych częstotliwościach NMJ ulega krótkotrwałym zmianom plastycznym różnego charakteru (trwającym do kilku minut), tak w czasie, jak i po pobudzeniu

both during and immediately following high frequency stimulation. The increase of synaptic transmission is named facilitation or potentiation, the decrease in synaptic transmission is named synaptic depression. This mechanism differs from the long-term up- and down regulation of the AChRs.

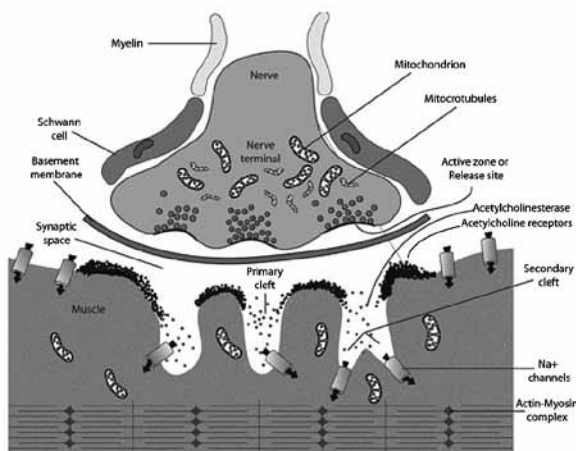


Figure 2. The neuromuscular junction
Rycina 2. Złącze nerwowo-mięśniowe

4.1. The presynaptic membrane

The motor nerve terminal or presynaptic membrane is the area where the nerve and muscle are apposed to each other, and where Ach is released. In the nerve terminal are mitochondria, neurofilaments, and other organelles shared with the axon, concentrated in the abjunctional portion of the terminal, nearer the Schwann cell. Membrane-bound synaptic vesicles are used to transport Ach between functionally distinct intracellular compartments where it is synthesized, and stored to the plasma membrane where it is released. Synaptic vesicles store Ach and undergo Ca^{2+} -dependent exocytosis upon the arrival of an action potential. After exocytosis, synaptic vesicles are retrieved by clathrin dependent endocytosis and are locally recycled to regenerate exocytosis-competent vesicles. Synaptic vesicles contain the machinery required for the uptake and storage of neurotransmitters including vesicular transporters, ion channels, and the vacuolar H^+ ATP-ase that fuels the transporters [48]. The synaptic vesicles are tightly clamped at the presynaptic membrane where the terminal surface is apposed to the muscle to prevent premature membrane fusion in the absence of Ca^{2+} . The vesicles are arranged in repeating clusters alongside small, thick-

o wysokiej częstotliwości. Zwiększenie przewodnictwa synaptycznego określa się jako ułatwienie (ang. facilitacja=facilitation) lub potencjalizację, a zmniejszenie przewodnictwa synaptycznego określa się mianem depresji synaptycznej. Mechanizm ten różni się od długotrwałej regulacji w górę i regulacji w dół receptorów AChR.

4.1. Błona presynaptyczna

Zakończenie nerwu ruchowego lub błona presynaptyczna. Stanowi przestrzeń, w której ustawione są naprzeciw siebie nerw i mięsień, i gdzie uwalniana jest Ach. W zakończeniu nerwowym znajdują się mitochondria, neurofilamenty i inne organelle, występujące w aksonie, skupione w części zakończenia oddalonej od złącza, w pobliżu komórki Schwanna. Związane z błoną pęcherzyki synaptyczne zawierają Ach, którą transportują z różnych czynnościowo przedziałów komórki, gdzie jest wytwarzana, do tych, w których jest składowana i do błony plazmatycznej, gdzie jest uwalniana. Pęcherzyki synaptyczne magazynują Ach a po nadejściu potencjału czynnościowego ulegają egzocytozie zależnej od Ca^{2+} . Po otwarciu się na zewnątrz (egzocytozie), pęcherzyki synaptyczne są odzyskiwane przez zależną od klatryny endocytozę i ulegają miejscowej regeneracji do postaci pęcherzyków, zdolnych do egzocytozy. Pęcherzyki synaptyczne zawierają wyposażenie, niezbędne do wychwytywania i magazynowania neuroprzebieżników, włącznie z transporterami pęcherzykowymi, kanałami jonowymi oraz pęcherzykową H^+ ATP-azą, zasilającą transportery [48]. Pęcherzyki synaptyczne są gęsto upakowane przy błonie presynaptycznej, gdzie powierzchnia zakończenia jest przeciwległa do mięśniowej, by zapobiec przedwczesnemu złaniu błon przy niedoborze Ca^{2+} . Pęcherzyki są ułożone w postaci powtarzających się wzdłuż pogrubionych, elektrono-gęstych fragmentów błony skupisk, określanych jako strefy aktywne. Przenoszony wzdłuż nerwu potencjał czynnościowy powoduje wpływ wapnia poprzez kanały Ca^{2+} bramkowane napięciem w pobliżu strefy aktywnej, co skutkuje migracją pęcherzyków do tej strefy. Pęcherzyki zlewają się z błoną neuronalną i uwalniają Ach w ciągu 200 μs do szczeliny synaptycznej, w procesie nazywanym egzocytozą. Całkowity proces migracji, zlewania się i wtórnego wychwytu, określa się jako krążenie (*patrz: część 4.1.4.*). Ponad 1000 białek jest czynnych w presynaptycznym zakończeniu nerwu a uważa się, że setki odpowiadają za obieg pęcherzyków i egzocy-

ened, electron-dense patches of membrane, referred to as active zones. The action potential propagated to the nerve results in calcium entry through voltage-gated Ca^{2+} -channels close to the active zone, causing vesicles to migrate to the active zone. The vesicles fuse with the neural membrane, and discharge Ach into the junctional cleft within 200 μs , a process which is called exocytosis. The complete process of migration, fusion, and recycling is called vesicle trafficking (see section 4.1.4.). More than 1000 proteins function in the presynaptic nerve terminal, and hundreds are thought to participate in vesicle trafficking and exocytosis. The vesicles as well as Ach are produced in the nerve cell. Vesicle trafficking and exocytosis are general principles that apply to all fusion reactions in all cells and is basically simple: a machinery consisting of three or four SNARE proteins and one *sec1*-Munc18-like protein (a synaptic membrane protein) is positioned and controlled by ancillary proteins, which in the case of the synapse, include active zone proteins such as Munc13 and soluble proteins such as tomosyn. They interact with each other and result in neurotransmitter release (see section 4.1.5.3.). There are various functionally important components in the motor nerve terminal (Figure 2.).

4.1.1. Schwann cells [50]

Perisynaptic Schwann cells are the peripheral glia cells that cap the nerve terminal at the NMJ. They are non-myelinating cells. The Schwann cells are very close to the nerve terminal without a basal membrane between the two. They play a role in the recovery of synaptic integrity following injury, as well as helping to establish synaptic efficacy. Schwann cells like all glia cells can detect neuronal activity and transmitter release, and they modulate synaptic function, as well as they promote synapse formation, repair, and stabilization [51,52]. Schwann cells are stimulated by influx of Ca^{2+} through voltage-sensitive Ca^{2+} -channels and release factors with small molecular weights between 500 and 5000 Da, that markedly and acutely potentiate spontaneous synaptic Ach release [53]. These factors are endocytosed and transferred to the motor neuron soma via slow, retrograde axon transport. Besides Schwann cells contain many receptors for neurotransmitters and neuromodulators that are present at the NMJ. One of them is the G-protein coupled receptors for both Ach (muscarinic AchR) and for ATP and Substance P. ATP and substance P is co-exocytosed in the NMJ in the

tożę. Zarówno pęcherzyki, jak i Ach, wytwarzane są w komórce nerwowej. Wędrówka pęcherzyków i egzocytoza stanowią uogólniony mechanizm, odnoszący się do wszystkich reakcji zlewania się i wszystkich komórek. Zasadniczo jest on prosty: maszyna złożona z trzech lub czterech białek SNARE i jednego białka *sec1*-Munc18-podobnego (białko błony synaptycznej) jest umiejscawiane i nadzorowane przez białka włosowate, które w przypadku synapsy, zawierają białka strefy aktywnej, jak Munc 13 i rozpuszczalne białka, jak tomozynę [49]. Reagują one ze sobą, co skutkuje uwolnieniem neuroprzekaźnika (*patrz: część 4.1.5.3.*). Zakończenie nerwu ruchowego zawiera różne czynne elementy składowe (*patrz: rycina 2*).

4.1.1. Komórki Schwanna [50]

Okołosynaptyczne komórki Schwanna stanowią obwodowe komórki glejowe, okrywające zakończenie nerwowe w złączy nerwowo-mięśniowym NMJ. Są to komórki bezmielinowe. Komórki Schwanna są położone blisko zakończenia nerwowego, nieoddzielone od niego błoną podstawową. Mają one znaczenie w odtwarzaniu ciągłości synapsy po urazach oraz podtrzymaniu wydajności synapsy. Komórki Schwanna, podobnie jak wszystkie komórki glejowe, mogą rozpoznać aktywność neuronów i uwolnienie neuroprzekaźników. Mogą też modulować czynność synapsy, pobudzać do jej wytworzenia, naprawy i stabilizacji [51,52]. Komórki Schwanna są pobudzone przez napływ Ca^{2+} , przez sterowane napięciem kanały Ca^{2+} oraz czynniki wyzwalające o niskiej masie cząsteczkowej, pomiędzy 500 a 5000 Da, które mocno i błyskawicznie zwiększają samoistny wypływ Ach z synapsy [53]. Czynniki te ulegają endocytozie i są wolno kierowane do ciała neuronu motorycznego na drodze wstecznego transportu aksonalnego. Komórki Schwanna posiadają ponadto liczne receptory dla neuroprzekaźników i neuromodulatorów, obecnych w NMJ. Jednym z nich jest sprzężony z białkiem G receptor Ach (receptor muskarynowy) i ATP i substancji P. ATP oraz substancja P są w NMJ uwalniane w tych samych pęcherzykach wspólnie z Ach. Receptory Ach i ATP umożliwiają funkcjonowanie sprzężenia zwrotnego i napędzają system kontroli uwalniania neuroprzekaźnika. Jest wysoce prawdopodobne, że receptory te stanowią rzeczywiście autoreceptory NMJ (*patrz: część 4.1.6.*). Poprzez te receptory stymulacja nerwu wysokimi częstotliwościami zwiększa śródkomórkowe stężenie jonów wapnia, proporcjonalnie do częstotliwości pobudzeń,

same vesicle as Ach. The Ach and ATP receptors make it possible in a feedback and feed forward system to control transmitter release. It is very likely that these receptors are indeed the presynaptic auto-receptors of the NMJ (see section 4.1.6.). Via these receptors does high-frequency nerve stimulation induce in a frequency-dependent manner an intracellular calcium increase in the Schwann cell. A massive activation of the G-proteins via this mechanism induces a reduction in transmitter release [54]. A decrease in activation of the Schwann cells results in enhanced spontaneous synaptic Ach release. The increase in spontaneous neurotransmission induced by glia cells may promote synapse formation and stability. One of the Schwann cell factors is TGF- β 1 (transforming growth factor- β 1) that up-regulates agrin expression in the motor neuron.

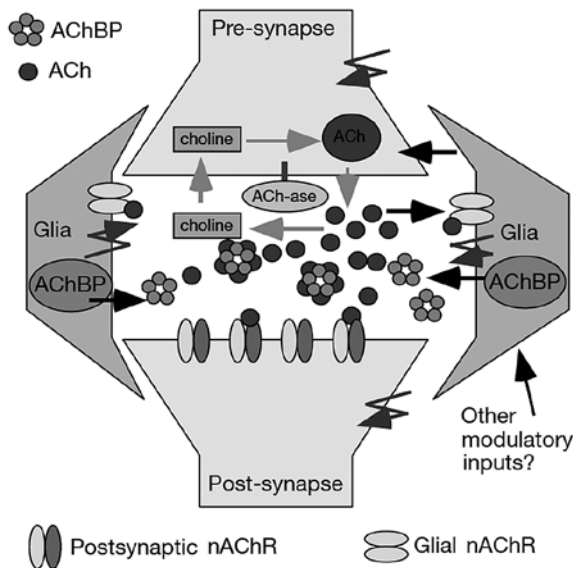


Figure 3. Acetylcholine binding protein
Rycina 3. Białko wiążące acetylocholinę

Schwann cells in some snails specifically modulate the efficacy of cholinergic transmission by secretion of a glia-cell produced protein. This acetylcholine binding protein (AChBP) is excreted stimulus dependent into the synaptic cleft and suppresses cholinergic synaptic transmission by binding Ach [55]. It is a novel molecular and cellular mechanism that is sufficient to account for its modulatory role in synaptic transmission. Under conditions of active presynaptic transmitter release, high m.molar concentrations of free Ach will probably activate both postsynaptic receptors and the n-AchRs

w komórce Schwanna. Zmasowane pobudzenie białka G w takim mechanizmie powoduje zmniejszenie uwalniania neuroprzekaźnika [54]. Ograniczenie pobudzeń komórek Schwanna prowadzi do wzmożonego uwalniania samoistnego Ach w synapsie. Wzbudzany przez komórki glejowe wzrost samoistnej neurotransmisji może wspierać kształtowanie się synapsy i ją stabilizować. Jednym z czynników obecnych w komórkach Schwanna jest TGF- β 1 (transformujący czynnik wzrostu - β 1), który dodatnio reguluje ekspresję agriny w neuronie ruchowym.

Komórki Schwanna u niektórych żmij swoiście modulują wydajność przewodnictwa cholinergicznego poprzez wydzielanie białka, wytwarzanego w tych komórkach glejowych. To wiążące acetylocholinę białko (AChBP) jest w odpowiedzi na pobudzenie, wydzielane do szczeliny synaptycznej i tłumi przewodzenie cholinergiczne w synapsie, przez związanie Ach [55]. Jest to nowy mechanizm molekularno-komórkowy, zdolny odgrywać rolę modulatora przewodnictwa synaptycznego. W warunkach czynnego uwalniania presynaptycznego neuroprzekaźnika, wysokie stężenie cząsteczek wolnej Ach prawdopodobnie uczynni zarówno receptory postsynaptyczne, jak i n-AchR w komórkach Schwanna. To może nasilić uwalnianie AchBP i zwiększyć stężenie neuroprzekaźnika w szczelinie synaptycznej [56]. Gdy Ach wiąże się w szczelinie synaptycznej z AchBP, acetylcholinesteraza zhydrolizuje tylko wolną Ach, utrzymując tym samym minimalne stężenie Ach i jej odzyskiwanie z buforu AchBP (patrz: rycina 3). Ach związana z AchBP nie jest zdolna do pobudzenia receptorów postsynaptycznych n-AchR.

Jedyną funkcją AchBP jest wiązanie Ach bez otwarcia kanału jonowego. Jego budowa jest porównywalna z pętlą Cys podjednostki α w AchR. Homopentamer AchBP wykształca pączkowatą strukturę o promieniu 80 Å i wysokości 62 Å.

Liczne α -neurotoksyny z jądów żmij i ślimaków, jak α -bungarotoksyna, α -konotoksyna, epibatydyna, erabutoksyna, lobelina, kobratoksyna, wiążą się z AchBP. Również *d-tubokuraryna* i galamina wiążą się wysoce swoiście z AchBP.

Czy AchBP występuje także u człowieka, jeszcze nie jest wiadomym.

4.1.2. Strefa aktywna [57]

Strefa aktywna jest wieloczynnościową organellą, która ułatwia przyczepianie się pęcherzyków, zako-

on the Schwann cells, which would enhance the release of AchBP, thus increasing its concentration in the synaptic cleft [56]. When Ach is bound to AchBP in the synaptic cleft, acetylcholinesterase will hydrolyse only the free Ach, thereby keeping the Ach concentration minimal and draining it from the AchBP buffer (Figure 3.). Ach bound to AchBP is unable to activate postsynaptic n-AchRs.

The only function of AchBP is binding of Ach without opening ion-channels. Its structure is comparable to the Cys-loop of the α -subunits in the AchR. The AchBP homopentamer forms a doughnut-like structure with a radius of 80 Å and a height of 62 Å.

Also many α -neurotoxins from snake and snail venom (for example α -bungarotoxin, α -conotoxin, epibatidine, erabutoxin, lobeline, cobratoxin) do bind to AchBP. Also *d*-tubocurarine and gallamine bind with high affinity to AchBP.

Whether this AchBP also exists in human is not yet known.

4.1.2. *The active zone* [57]

The active zone is a multifunctional organelle that helps dock synaptic vesicles, anchors the Ca^{2+} -channels in the membrane, and is involved in fusion of the vesicles with the membrane [58]. Active zones are present in all fast synapses in both the central and peripheral nervous system. In mammals are the active zones about 100-nm long and contains about 20 intra-membranous particles in two parallel rows [59]. For a typical human NMJ, there are about 200 active zones, which can accommodate up to 400 vesicles, less than 0.1% of all those present in the motor terminal [60]. One action potential at the nerve terminal causes fusion of 50-300 vesicles [61].

The active zone contains three structures: 1.) dense aggregates of cytoplasmic macromolecules called active zone material, which are attached to the membrane; 2.) synaptic vesicles docked on the membrane next to the active material; and 3.) aggregates of macromolecules that include Ca^{2+} -channels within the membrane.

The active zones are localized opposite the folds in the muscle membrane, on which crests the n-AchRs are located. Active zones are rich in voltage-gated Ca^{2+} -channels and thus respond to changes in calcium levels.

Synaptic vesicles only dock and fuse, and release Ach at the active zone [62,63]. The active zone is surrounded by the perisynaptic zone, the endocytic zone, in which synaptic vesicles that have undergone fusion

twicza kanały Ca^{2+} w błonie i bierze udział w procesie zlewania się pęcherzyków z błoną [58]. Strefy aktywne występują we wszystkich szybkich synapsach ośrodkowej i obwodowej części układu nerwowego. U ssaków strefa aktywna ma blisko 100-nm długości i zawiera około 20 elementów wewnątrzkomórkowych ułożonych w dwa szeregi [59]. W typowym ludzkim NMJ znajduje się około 200 stref aktywnych, mogących pomieścić do 400 pęcherzyków, z których mniej niż 0.1% jest obecna w zakończeniu motorycznym [60]. Jeden potencjał czynnościowy docierający do zakończenia nerwowego powoduje zlanie się 50-300 pęcherzyków [61].

Strefa aktywna składa się z trzech struktur: 1.) gęstych agregatów makrocząsteczek cytoplazmatycznych, nazywanych materiałem strefy aktywnej, przyczepionych do błony; 2.) pęcherzyków synaptycznych rozmieszczonych na błonie w pobliżu materiału aktywnego; i 3.) agregatów makrocząsteczek w błonie, zawierających także kanały Ca^{2+} .

Strefy aktywne umiejscowione są naprzeciwko fałdów błony mięśniowej, na których szczytowych częściach znajdują się n-AchR. Strefy aktywne są bogato wyposażone w kanały Ca^{2+} , dzięki czemu mogą reagować na zmiany w stężeniu wapnia.

Pęcherzyki synaptyczne osiadają, zlewają się i uwalniają Ach tylko w strefie aktywnej [62,63]. Strefa aktywna otoczona jest strefą perisynaptyczną, strefą endocytozy, w której pęcherzyki synaptyczne, które uległy zlaniu się, są usuwane drogą endocytozy regulowanej przez klatrynę (*patrz: część 4.1.5.4.*) [64]. W strefach aktywnych pęcherzyki są utrzymywane w skupieniu przez osieciowanie włóknami aktyny i jedną lub więcej izoform synapsyny [65]. Struktury określane jako „zatyczki”, „żebra” i „belki” są uporządkowane wzdłuż pośrodkowej linii, wykształcając wysoko wyspecjalizowaną ultrastrukturę. Pęcherzyki synaptyczne, zadokowane na błonie presynaptycznej, są ułożone w równoległych szeregach, stykając się ze środkową linią gęstego materiału („belki”) za pomocą włókien („żebra”). Same żebra natomiast kontaktują się z przenikającymi błonę cząsteczkami („zatyczkami”), o których sądzi się, że są sterowanymi napięciem kanałami wapniowymi (*patrz: rycina 4.*) Stymulacja potencjałem czynnościowym jest wyzwalana przez Ca^{2+} , powodując oddzielenie się synapsyny od pęcherzyków i umożliwiając ich zlewanie się (*patrz: część 4.1.5.*).

are retrieved by clathrin-mediated endocytosis (see section 4.1.5.4.) [64]. In the active zones are vesicles held together by a meshwork of actin filaments and by one or more synapsin isoforms [65]. Structures called “pegs”, “ribs”, and “beams” are arranged along the midline of the presynaptic ridge, giving rise to a highly ordered ultra-structure. Synaptic vesicles docked at the presynaptic membrane are arranged in parallel rows, connected to a central line of dense material (or “beams”) by filaments (“ribs”). The ribs themselves contact transmembrane particles (“pegs”), which were proposed to be voltage-gated calcium channels (Figure 4.). During action potential stimulation there is triggered by Ca^{2+} , a dissociation of synapsins from the vesicles, and then the vesicles can fuse (see section 4.1.5.).

The calcium activates via calmodulin a series of peptides in the vesicle wall, the cytoplasm and the presynaptic membrane. Through interaction of these proteins the vesicle trafficking process occurs close to the vesicle docking sites (see section 4.1.4.) [66]. The active zone material contains macromolecules including SNAREs, shown by biochemical molecular biology to be involved in vesicle docking and fusion at synapses [67]. The active zones also contain proteins (Munc13s, Rab3-interacting molecules, Piccolo, Bassoon, ERC1b, ERC2, α -lipids and receptor protein tyrosine phosphatases) that consist of multiple protein-protein interaction domains and that specifically bind to each other, thus creating a dense network of proteins [68].

4.1.3. *Quantal acetylcholine release*

Upon nerve stimulation is Ach released in quanta of variable size. The size is depending on the muscle activity, and is controlled via a feedback mechanism [69]. At average each vesicle contains approximately 10,000 molecules of Ach. Prolonged high-frequency stimulation reduces quantal size by approximately 20%. Blockade of neural activity at the NMJ substantially increases quantal size, apparently through a presynaptic mechanism (see section 4.1.5.2.).

The Ach quanta are packaged in the vesicles together with ATP, Ca^{2+} , and Mg^{2+} . In human with each stimulus approximately 20-25 quanta of Ach are released from the nerve, i.e. one per active zone. When acetylcholinesterase (AchE) activity is intact, the Ach molecules from a single quantum rapidly saturate the majority of n-AchRs only within a radial distance of about $0.5 \mu M$ from the release site [70]. If two vesicles were to be released simultaneously from sites closer

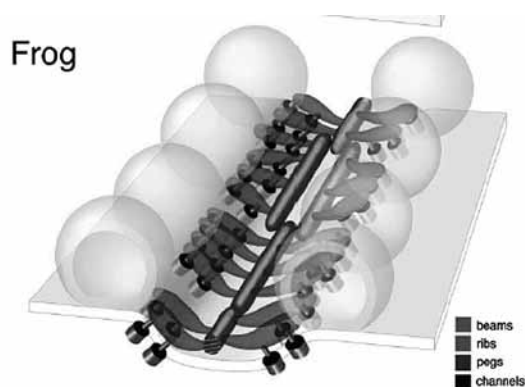


Figure 4. Vesicles entrapped at active zone
Rycina 4. Pęcherzyki związane w strefie aktywnej

Wapń aktywuje za pośrednictwem kalmoduliny szereg białek w ścianie pęcherzyka, cytoplazmie i błonie presynaptycznej. Dzięki wspólnemu oddziaływaniu tych białek, proces przemieszczania pęcherzyków odbywa się w pobliżu miejsc dokowania pęcherzyków (*patrz: część 4.1.4.*) [66]. Materiał strefy aktywnej zawiera makrocząsteczki, w tym SNARE, o których wiadomo z biochemii i biologii molekularnej, że uczestniczą w dokowaniu pęcherzyków w synapsach i ich zlewaniu się [67]. Strefy aktywne zawierają też białka (Munc13, cząsteczki interaktywne z Rab3, Piccolo, Bassoon, ERC1b, ERC2, α -lipidy i receptor fosfatazy tyrozyno protein) zawierających liczne domeny interakcji białko-białko i łączących się z sobą, tworząc gęstą sieć białkową [68].

4.1.3. *Kwantowe uwalnianie acetylcholiny*

Po pobudzeniu nerwu Ach jest uwalniana w porcjach o zmiennej wielkości. Wielkość zależy od aktywności mięśnia i jest regulowana w mechanizmie sprzężenia zwrotnego [69]. Przeciętnie każdy pęcherzyk zawiera w przybliżeniu 10 000 cząstek Ach. Utrzymujące się pobudzenie o wysokiej częstotliwości impulsów, powoduje zmniejszenie wielkości porcji o około 20%. Blokada czynności nerwowej w NMJ istotnie zwiększa wielkość porcji, jak się wydaje, poprzez mechanizm presynaptyczny (*patrz: część 4.1.5.2.*).

Porcje ilościowe Ach są upakowane w pęcherzykach razem z ATP, Ca^{2+} i Mg^{2+} . U ludzi z każdym pobudzeniem uwalnia się z nerwu około 20-25 porcji Ach, tj. jedna na każdą strefę aktywną. Jeśli aktywność esterazy acetylcholinowej (AchE) jest niezaburzona,

together than $1 \mu\text{M}$, whether in the same or different active zones, their zones of saturation would overlap. This would result in a loss of transmitter efficacy since Ach molecules would have to diffuse further before binding to unoccupied n-AchRs and run a greater risk of being hydrolysed by the AchE in the synaptic cleft before binding. On average, only 0.15–0.25 quanta/ μM^2 are released by each action potential [71]. The molecules in a quantum of transmitter exert their full depolarizing effect within about 0.2 ms after they are released.

4.1.4. *Acetylcholine vesicles* [72]

Vesicles are membranous structures formed from the endoplasmic reticulum, which are filled with a neurotransmitter and allowing quantal release of this transmitter. The vesicles have a size of 40–50 nm in diameter. There are in the motor nerve terminal three pools (types) of vesicles containing Ach (Figure 5.) [73,74]. The first pool are the small (2–4% of total) readily releasable pool (RRP) of vesicles, docked (and primed) to the presynaptic active zones and immediately available for release in response to nerve stimulation [75]. In human there is on average only about one “*readily releasable*” quantum Ach at each active zone. The second pool is the mobilization pool that immediately supplements the readily releasable pool when needed [76]. Moderate physiological frequencies of stimulation cause continuous redistribution of vesicles between these two pools. The mobilized secretory vesicles appear to move randomly with little sensitivity to temperature [77]. High-frequency stimulation induces the depletion of the recycling from these two pools, and then the reserve pool vesicles are involved. The majority of the synaptic vesicles are sequestered in the reserve pool, tethered to the cytoskeleton in a composed net of actin, synapsin, synaptotagmin and spectrin. This pool is produced by slow endocytosis including the formation of deep membrane infolding from which vesicles are formed by clathrin-mediated endocytosis (see section 4.1.5.4.) [78].

The vesicles of the reserve pool are tethered to the cytoskeleton, a little away from the active zones (Figure 6.). They are mobilized when presynaptic endoplasmic reticulum ryanodine receptors (RyR)-mediate Ca^{2+} release which activates Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II (CamKII). The recruitment from the reserve pool induces post-tetanic potentiation (PTP) [79].

cząsteczki Ach z jednej porcji natychmiast wysycają większość n-AchR, ale tylko w promieniu około $0.5 \mu\text{M}$ od miejsca uwolnienia [70]. Jeśli dwa pęcherzyki są uwolnione jednocześnie z miejsc odległych o mniej niż $1 \mu\text{M}$, niezależnie od tego czy z jednej, czy dwu stref aktywnych, ich obszary wysycania zachodzą na siebie. Prowadzi to zmniejszenia skuteczności neuroprzekaznika, ponieważ cząsteczki Ach muszą dyfundować dalej, by związać się z niezajętym n-AchR i narażone są na większe ryzyko zhydrolizowania przez AchE w szczeliny synaptycznej jeszcze przed związaniem. Każdy potencjał czynnościowy powoduje uwolnienie średnio zaledwie 0.15–0.25 porcji ilościowych/ μM^2 [71]. Cząsteczki ilościowej porcji neuroprzekaznika wywołują swoje pełne działanie depolaryzujące w ciągu około 0.2 po uwolnieniu.

4.1.4. *Pęcherzyki acetylocholinu* [72]

Pęcherzyki są tworami błoniastymi, wykształconymi przez siateczkę endoplazmatyczną, wypełnionymi neuroprzekaznikiem i umożliwiającymi porcjowane wydzielanie tego przekaznika. Pęcherzyki mają średnicę rzędu 40–50 nm. W zakończeniach nerwów ruchowych występują trzy typy skupisk pęcherzyków, zawierających Ach (*patrz: rycina 5*) [73,74]. Typ pierwszy stanowi mała (2–4% całości) łatwo uwalnialna pula (*readily releasable pool* -RRP) pęcherzyków, przyczepionych (i przygotowanych) przy presynaptycznej strefie aktywnej i bezpośrednio gotowych do uwolnienia w odpowiedzi na pobudzenie nerwu [75]. U człowieka zazwyczaj występuje tylko jedna, łatwo uwalniana porcja Ach w każdej strefie aktywnej. Typ drugi stanowi pula mobilizacyjna, która w miarę potrzeby natychmiast uzupełnia pulę szybko wyzwalaną [76]. Stymulacja o fizjologicznej, umiarkowanej częstotliwości powoduje ciągłe przemieszczanie się pęcherzyków między tymi dwoma zbiorami. Uruchomione pęcherzyki wydzielnicze wydają się poruszać w sposób dowolny, nie wykazując większej wrażliwości na temperaturę [77]. Duża częstotliwość pobudzeń powoduje zmniejszenie przepływu między obu zbiorami pęcherzyków, co powoduje uruchomienie rezerwowej puli pęcherzyków. Większość pęcherzyków synaptycznych jest zmagazynowana w rezerwowym zbiorze, przymocowanym do szkieletu komórki rozbudowaną siecią aktyny, synapsyny, synaptotagminy i spektryny. Zbiór tego typu jest wytwarzany przez wolną endocytozę, z tworzeniem głębokich wgłobień błony, z której formowane są pęcherzyki w endocytozie

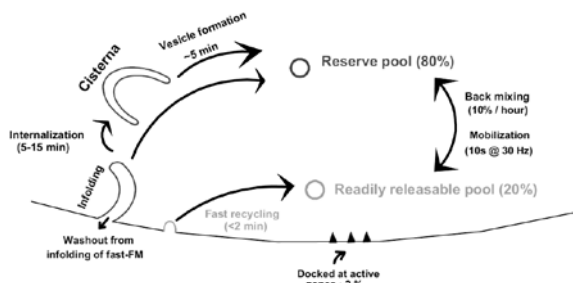


Figure 5. Acetylcholine vesicle pools
Rycina 5. Skupiska pęcherzyków acetylocholinyl

Synaptic vesicles are docked at the presynaptic membrane arranged in parallel rows (Figure 4.), connected to a central line of dense material (or “beams”) by filaments (“ribs”). The ribs themselves contact trans-membrane particles which are the voltage-gated Ca^{2+} -channels. A complex meshwork of fine filaments surrounds the vesicles. With synapsin are the vesicles connected to actin, which is connected with the presynaptic membrane of the active zone (Figure 6.). Also are vesicles connected with each other via synapsin.

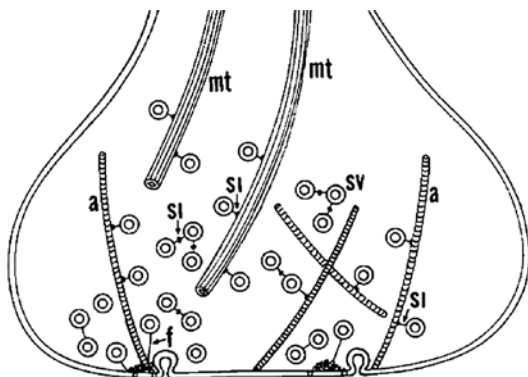


Figure 6. Vesicles tethered to cytoskeleton. Synaptic vesicles (SV) are interlinked with each other via synapsin-1 (S1) and with actin fibrils (a) via long filaments (f). Vesicles are after endosomal production transported along axonal microtubules (mt)

Rycina 6. Pęcherzyki przyłączone do szkieletu komórkowego. Pęcherzyki synaptyczne (SV) są połączone ze sobą za pomocą synapsyny-1 (S1) a z aktyną (a) przez długie włókienka (f). Pęcherzyki, po zakończeniu ich endosomalnej produkcji, są transportowane wzdłuż mikrocewek aksonu (mt).

regulowanej przez klatrynę (patrz: część 4.1.5.4.) [78].

Pęcherzyki puli rezerwowej są przymocowane do szkieletu komórki w nieznacznym oddaleniu od stref aktywnych (patrz: rycina 6). Są one uruchamiane, gdy receptory ryanodynowe (RyR) siatki endoplazmatycznej uwalniają Ca^{2+} , który z kolei aktywuje kinazę II (Cam KII), zależnej od Ca^{2+} /kalmoduliny [79].

Pęcherzyki synaptyczne są osadzone na błonie presynaptycznej, ułożone w dwa szeregi (patrz: rycina 4), złączone w linii środkowej z materiałem gęstym (lub „belkami”) za pomocą włókien („żeber”). Ze swojej strony żebra kontaktują się z przesywającymi błonę cząstkami, tworzącymi bramkowane napięciem kanały Ca^{2+} . Pęcherzyki otoczone są gęstą pajęczyną włókienek. Za pomocą synapsyny pęcherzyki związane są z aktyną, która z kolei połączona jest ze stroną presynaptyczną strefy aktywnej (patrz: rycina 6). Pęcherzyki są ze sobą połączone także za pomocą synapsyny.

Pęcherzyki krążą w powtarzających się cyklach uwalniania. Pęcherzyki synaptyczne zawierają dwie niezbędne składowe: białko transportowe, nieodpowiedzialne do wychwytu neuroprzekaźnika i białko odpowiedzialne za przemieszczanie się, uczestniczące w procesach egzocytozy i endocytozy oraz krążenia zwrotnego. Białka transportowe składają się z typu pęcherzykowego pomp protonowych, wytwarzających gradient elektrochemiczny, który zasila wychwytywanie i transportery neuroprzekaźnika, uczestniczące w doraźnym wychwycie Ach (patrz: część 4.1.5.2.). Do białek odpowiedzialnych za obieg zwrotny należą białka błony, białka związane z post translacyjną modyfikacją lipidów i białka związane na obwodzie (patrz: część 4.1.5.3).

Pęcherzyk w NMJ zawierają zarówno Ach jak i ATP. Obecność ATP jest ważna w regulowaniu zawartości Ach. W pęcherzykach znajdują się także substancja P i CGRP, spełniające funkcję regulacyjną.

4.1.5. Cykl obiegu pęcherzyków [80]

Cykl obiegu pęcherzyków obejmuje aktywne przenoszenie pęcherzyków z miejsca ich wytwarzania *de novo*, ich napełnianie, magazynowanie (dokowanie) zlewanie się i obieg zwrotny. Proces ten może być podzielony na cztery etapy: 1.) produkcję nowych pęcherzyków, 2.) napełnianie pęcherzyków, 3.) egzocytozę i 4.) endocytozę. Egzocytoza jest zależna od szczególnej rodziny białek, występujących od drożdży po człowieka. U człowieka działa 36 peptydów. Ta rodzina białek obejmuje SNARE, białka Rab/ypt i białka błony

Vesicles are recycled for repeated rounds of release. Synaptic vesicles contain two classes of obligatory components: transport proteins involved in neurotransmitter uptake, and trafficking proteins that participate in synaptic vesicle exo- and endocytosis and recycling. Transport proteins are composed of a vacuolar-type proton pump that generates the electrochemical gradient, which fuels neurotransmitter uptake and neurotransmitter transporters that mediate the actual Ach uptake (see section 4.1.5.2.). The trafficking proteins include intrinsic membrane proteins, proteins associated via posttranslational lipid modifications, and peripherally bound proteins (see section 4.1.5.3).

The vesicles in the NMJ both contain Ach and ATP. This ATP is important in the regulation of Ach content. Also substance P and CGRP are present in the vesicle and play a regulatory role.

4.1.5. Vesicle trafficking [80]

Vesicle trafficking describes the active transport of vesicles from their de novo production, their filling, docking, fusion and recycling. This process can be divided in four parts: 1.) vesicle de novo production; 2.) vesicle filling; 3.) exocytosis; and 4.) endocytosis. Exocytosis involves specialized protein families that are conserved from yeast to humans. In humans there are 36 peptides involved. These protein families include the SNAREs, the Rab/ypt proteins, and the synaptic membrane proteins. In neuronal exocytosis, syntaxin 1a and SNAP-25 are predominantly localized at the presynaptic plasma membrane, whereas synaptobrevin is predominantly localized at synaptic vesicle membranes. The majority of the protein is exposed in the cytoplasm, followed by a single membrane-spanning region and a few amino acids, facing either the lumen of an intracellular compartment or the extracellular side. Upon nerve stimulation is the exocytosis machinery activated. When the membranes are getting very close to each other, the proteins (SNAREs) assemble into complexes called SNARE-pins that brings them closer to each other, where after the vesicles are primed and ultimately fuse with the membrane (Figure 7). During priming are the vesicles also further loaded with ATP.

After fusion the synaptic vesicles undergo endocytosis, in which also proteins are involved. The recycling is probably by three alternative pathways (Figure 8.): 1.) Vesicles are re-acidified and refilled with neurotransmitters without undocking, thus remain-

synaptycznej. Podczas egzocytozy neuronalnej, syntaksyna 1a i SNAP-25 są zlokalizowane przeważnie na presynaptycznej błonie plazmatycznej, podczas gdy synapobrewina jest przede wszystkim umiejscowiona w błonach pęcherzyków synaptycznych. Przeważająca część białek jest zawarta w cytoplazmie, a mniejsza w pojedynczym obszarze napinania błony o niewielu resztach aminokwasowych, skierowanych albo w stronę światła przedziału wewnątrzkomórkowego, albo na zewnętrzną stronę komórki. Pobudzenie nerwu uruchamia mechanizmy egzocytozy. Gdy błony bardzo zbliżają się do siebie, białka (SNARE) skupiają się w zespoły określane mianem ziaren SNARE, które przyciągają się, po czym następuje przygotowanie pęcherzyków i ostateczne zlanie z błoną komórkową (*patrz: rycina 7*). W fazie wstępnej pęcherzyki są doładowywane ATP.

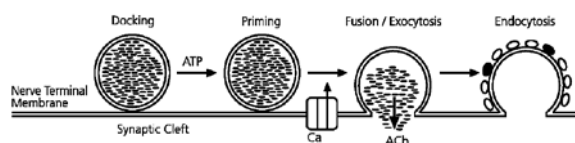


Figure 7. Vesicle trafficking

Rycina 7. Cykl obiegu pęcherzyków

Po zlaniu się pęcherzyki synaptyczne ulegają endocytozie, w której również uczestniczą białka. Obieg zwrotny odbywa się prawdopodobnie trzema drogami (*patrz: rycina 8*): 1.) pęcherzyki są ponownie zakwaszone i napełnione neuroprzebieżnikiem, bez zmagazynowania, a więc pozostając w puli szybkiego uwalniania (“pocałuj i zatrzymaj się”); 2.) pęcherzyki niezdeponowane o lokalnym krążeniu wrotnym (“pocałuj i pędź”) albo 3.) pęcherzyki ulegają endocytozie jako twory opłaszczone klatryną, ponownie napełniane są neuroprzebieżnikiem, albo bezpośrednio, albo po przejściu endosomalnej fazy pośredniej (“endosomalne krążenie zwrotne”).

Cykl obiegu pęcherzyków jest więc procesem złożonym, wymagającym udziału licznych białek, odtwarzanych za pomocą mRNA i reagujących między sobą. Białka te należą do rozpuszczalnych peptydów odpowiedzialnych za wiązanie z receptorem, wrażliwych na czynnik N-etylomaleimid, określane skrótem SNARE.

Liczne toksyny bakteryjne, roślinne i zwierzęce, oddziałują na te białka wywołują porażenie mięśni, zaburzając uwalnianie Ach.

ing in the readily releasable pool (“kiss-and-stay”); 2.) vesicles undock and recycle locally (“kiss-and-run”) to re-acidify and refill with neurotransmitters; or 3.) vesicles endocytose via clathrin-coated pits and re-acidify and refill with neurotransmitters either directly or after passing through an endosomal intermediate (“endosomal recycling”).

The vesicle trafficking process thus is a complicated process that involves many peptides which interfere with each other and which are expressed from mRNA. The peptides belong to the soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor proteins, called SNAREs.

Many bacterial, plant, and animal toxins affect these peptides and cause muscle paralysis by interfering with the Ach release.

4.1.5.1. Vesicle production

Vesicles are produced de novo, or recycled from exocytosed vesicles. New synaptic vesicles are produced from the endoplasmic reticulum in the cell body, and then actively transported via the axon hillock and along the axon to the motor nerve terminal. The molecular motors responsible for moving the vesicles in the axons include proteins in the kinesin super-family. During transportation the de novo produced vesicles acquire the vesicular acetylcholine transporter (VAChT), SNAREs, and the ADP/ATP trans-locase in their membrane. These proteins have half-lives in the order of days. During the last part of transportation in the nerve many of the vesicles take on an initial load of Ach and ATP. Once in the nerve terminal the VAChT is activated and the vesicles receive a second charge of Ach by exchange for protons (see section 4.1.5.2.). Now the vesicles have entered the pool of releasable vesicles.

The VAChT are associated with 4 vesamicol receptors per vesicle, which are important in modulation of the Ach uptake in the vesicle. Occupation of only a fraction of the vesamicol receptors completely blocks active Ach uptake. Attached to the synaptic vesicle membrane are proteoglycans which can bind some Ach and ATP.

4.1.5.2. Vesicle filling [82]

The novo synthesised vesicles take up some Ach during their transportation from the cell body to the nerve terminal. The amount taken up in de novo vesicles is determined by the concentration of Ach in

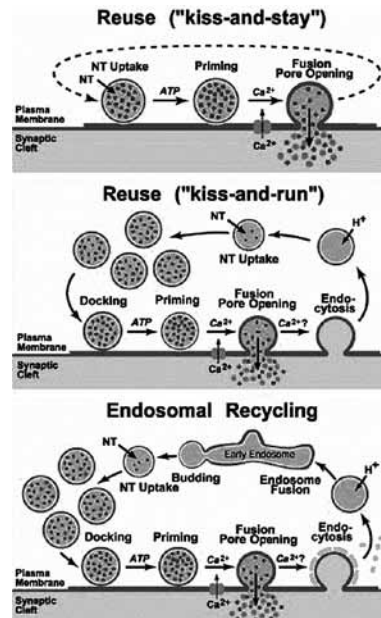


Figure 8. Endocytosis

Rycina 8. Endocytoza

4.1.5.1. Wytwarzanie pęcherzyków

Pęcherzyki są wytwarzane od nowa lub stanowią odzysk pęcherzyków, które uległy egzocytozie. Nowe pęcherzyki synaptyczne są wytwarzane z siatki endoplazmatycznej w trzonie komórki i przenoszone do zakończenia nerwu ruchowego wzdłuż wypustki aksonalnej. Molekularnym silnikiem, poruszającym pęcherzyki w aksonie, są białka z nadrodziny kinezyn s. Od nowa wytwarzane pęcherzyki podczas przenoszenia otrzymują pęcherzykowy transporter acetylocholiny (VAChT), SNARE i translokazę ADP/ATP w swojej błonie. Półokres trwania tych białek jest rzędu dni. W czasie ostatniej fazy transportu w nerwie, pęcherzyki pobierają początkowy ładunek Ach i ATP a kiedy tylko w zakończeniu nerwowym ulegnie aktywacji, ładunek Ach jest uzupełniany przez dodatkową porcję, na drodze wymiany z protonami (patrz część 4.1.5.2.). Od tego momentu stanowią pulę pęcherzyków przygotowanych do uwolnienia.

Działanie VAChT wymaga obecności 4 receptorów vesamikolu w każdym pęcherzyku, istotnych dla sterowania wychwytem Ach przez pęcherzyk [81]. Zajęcie nawet niewielkiej części receptorów vesamikolu całkowicie blokuje czynny wychwytem Ach. Do błon pęcherzyków synaptycznych doczepione są proteoglikany, które mogą wiązać część Ach i ATP.

the cytoplasm. During this transport also the V_{AChT} and ADP/ATP trans-locase is included in the vesicle membrane. V_{AChT} is responsible for further filling of the vesicle in the motor terminal. Once the newly formed releasable vesicles (VP2) are filled, the mechanism for Ach exchange across their membrane is shut down via occupation of the vesamicol receptors which blocks the V_{AChT}: the vesicles are sealed-off, unable to take up or release Ach at any appreciable rate. In recycled vesicles the Ach content is determined by the Ach concentration in the cytoplasm, and by some regulatory mechanisms from presynaptic AchRs (most likely present in the Schwann cell).

Synaptic transmission requires two types of neurotransmitter transporters. Following exocytosis, plasma membrane transporters remove neurotransmitters from the synaptic cleft to terminate signalling and recycle the neurotransmitters for another round of exocytosis. Vesicular neurotransmitter transporters package neurotransmitters into the lumen of secretory vesicles. Vesicular transporter expression can regulate the amount of neurotransmitter contained in secretory vesicles and thus may influence quantal size.

V_{AChT} is a twelve-trans-membrane domain protein that takes about 10% of the vesicle volume. V_{AChT} uses the electrochemical gradient to accumulate Ach in synaptic vesicles, and is also responsible for filling of the recycled vesicles. Ach uptake is regulated by this vacuolar proton-pump, a large multi-protein complex. Its activity establishes an electrochemical gradient across the vesicle membrane [83]. It exchanges two protons from inside the vesicle for an Ach in the axoplasm, and hence depends on an H⁺ electrochemical gradient which is produced by the vacuolar H⁺-ATPase. This ATPase mediates H⁺ flux in the opposite direction under physiological conditions, and uses the energy released by ATP hydrolysis to make the gradient [84]. The vesicular acetylcholine transporter (V_{AChT}) interacts directly with the v-SNARE synaptobrevin, involved in synaptic vesicle fusion [85]. Thus there is a connection between the synaptic vesicle and neurotransmitter cycles.

During repetitive stimulation, the recycling vesicles in the readily releasable store are loaded with less Ach than usual. This is caused by the feedback from the un-myelinated Schwann cells. The concentration of Ach inside synaptic vesicles thus depends on a number of factors: the concentration of substrate available in

4.1.5.2. Wypełnianie pęcherzyków [82]

Wytwarzane od nowa pęcherzyki mogą pobierać pewne ilości Ach na swej drodze od środka komórki ku zakończeniu nerwowemu. Ilość pobrana przez nowo wytworzony pęcherzyk zależy od stężenia Ach w cytoplazmie. Podczas tego transportu uczestniczą także V_{AChT} i translokaza ADP/ATP błony pęcherzyka, odpowiedzialne za dalsze napełnianie pęcherzyka w zakończeniu nerwu ruchowego. Gdy tylko nowo wytworzony, gotowy do uwolnienia pęcherzyk (VP2) wypełni się, mechanizm przechodzenia Ach przez jego błonę zostaje wyłączony poprzez zajęcie receptorów vesamikolu, co unieczynnia V_{AChT}: pęcherzyki zostają zamknięte, i nie mogą ani przyjmować ani uwalniać znaczących ilości Ach. W odzyskiwanych pęcherzykach zawartość Ach jest określana przez stężenie Ach w cytoplazmie i przez niektóre mechanizmy regulacyjne sterowane przez presynaptyczne receptory Ach (obecne przede wszystkim w komórkach Schwanna).

Przewodnictwo synaptyczne wymaga dwu typów transporterów dla neuroprzebieżników. W następstwie egzocytozy, transporter błony komórkowej usuwa neuroprzebieżnik ze szczeliny synaptycznej, kończąc tym przesyłanie sygnału i przejmując go zwrótnie do użycia w następnej rundzie procesu uwalniania. Pęcherzykowe transportery neuroprzebieżnika upychają go w świetle pęcherzyków sekrecyjnych. Ekspresja transporterów pęcherzykowych może regulować ilość neuroprzebieżnika zawartą w pęcherzykach sekrecyjnych i tym samym wpływać na wielkość porcji.

V_{AChT} jest dwunastokrotnie przez błonową domeną białkową, zajmującą około 10% objętości pęcherzyka. Pęcherzykowa AchT wykorzystuje gradient elektrochemiczny do gromadzenia Ach w pęcherzykach synaptycznych i odpowiada również za napełnianie pęcherzyków odzyskanych. Wchłanianie Ach jest regulowane przez pęcherzykową pompę protonową, duży kompleks wielobiałkowy. Jej aktywność utrzymuje gradient elektrochemiczny po obu stronach błony pęcherzykowej [83]. Wymienia ona dwa protony z wnętrza pęcherzyka na dwie cząsteczki Ach z aksoplazmy a tym samym jest zależna od gradientu elektrochemicznego H⁺ wytwarzanego przez pęcherzykową ATP-azę H⁺. Enzym ten pośredniczy w przepływie H⁺ w kierunku przeciwnym do fizjologicznego i wykorzystując energię uzyskaną z hydrolizy ATP dla wytworzenia gradientu [84]. Pęcherzykowy transporter acetylocholiny (V_{AChT}) reaguje bezpośrednio z synaptybreviną v-SNARE, uczestniczącą w zlewaniu

the cytoplasm, the Ach transport mechanism, the pre-synaptic auto-receptors, and nonspecific leakage of Ach across the vesicle membrane. There exists a substantial variation in quantal size, i.e. in the filling of the vesicle. Prolonged high-frequency stimulation reduces quantal size by approximately 20% [86]. Repetitive stimulation also reduces the number of quanta stored in the nerve terminal [87].

The larger vesicles termed VP1 and mainly present in the reserve pool of vesicles, contain 3- to 5-fold more Ach than the smaller VP2 vesicles, which consists mainly in recycled vesicles [88]. However, VP2 exhibit a substantially higher VAChT activity [89]. Blockade of neural activity substantially increases the quantal size through the presynaptic mechanism [90]. The amount of transmitter released per vesicle can be regulated either before or after fusion. Regulation after vesicle fusion involves closure of the fusion pore before the full release of vesicle contents, the “*kiss-and-run*” mechanism. In kiss-and-run exocytosis a single vesicle is endocytosed rapidly before full collapse has occurred, preventing loss of vesicle identity.

4.1.5.3. *Vesicle docking and fusion* [91]

Docking and fusion of the vesicle are complicated processes in which SNARE peptides are involved. The most distinctive and ubiquitous molecular action of all SNARE families is the formation of a parallel four helix bundle, referred to as the SNARE core complex. Four SNARE motifs, each of which is basically heptad repeats of 60-70 amino acids, intertwine with each other into a four-stranded coil that bridges two membranes (Figure 9A, 9B). The involved proteins are partly bound to the vesicle membrane (v-SNAREs), partly present in the cytosol and partly bound to the nerve membrane (t-SNAREs).

The SNARE model predicts that each of the two fusing membranes needs to contribute at least one SNARE with a trans-membrane domain. The vesicles first will become primed with soluble N-ethylmaleimide sensitive-factor attachment receptor proteins (SNARE), after which they are fusion competent, i.e. become Ca²⁺ responsive. During priming v-SNARE proteins become located at the plasma membrane (syntaxin and SNAP-25). Then the vesicles form the readily releasable pool which is located close to the active side. Synaptotagmin on the vesicular membrane acts as a calcium sensor and moves the synaptic vesicles to synaptic zones rich in Ca²⁺-channels, thereby stabilising the vesicles in the

się pęcherzyków synaptycznych [85]. W ten sposób zachodzi związek przyczynowy między krążeniem pęcherzyków synaptycznych i neuroprzebiegu.

W czasie powtarzanej stymulacji odzyskiwane pęcherzyki w puli gotowej do uwolnienia są słabiej wypełnione Ach niż zazwyczaj. Jest to spowodowane sprzężeniem zwrotnym ze strony niezmielinizowanych komórek Schwanna. Stężenie Ach wewnątrz pęcherzyków synaptycznych zależy więc od szeregu czynników: stężenia substratu dostępnego w cytoplazmie, mechanizmu transportu Ach, autoreceptorów presynaptycznych i nieswoistego wycieku Ach przez błonę pęcherzykową. Mają miejsce istotne wahania wielkości pakietów (kwantów), tj. wypełnienia pęcherzyków. Przedłużona stymulacja wysokimi częstotliwościami zmniejsza wielkość porcji o około 20% [86]. Powtarzane pobudzenia zmniejszają także ilość porcji (kwantów) zdeponowanych w zakończeniu nerwowym [87].

Duże pęcherzyki, określane jako VP1 i obecne głównie w rezerwowej puli pęcherzyków, zawierają 2 do 5 razy więcej Ach niż małe pęcherzyki VP2, stanowiące przeważnie pęcherzyki odzyskane [88]. Jednakże VP2 wykazuje istotnie wyższą aktywność VAChT [89]. Zablockowanie aktywności nerwowej znacząco zwiększa wielkość kwantów poprzez działanie mechanizmu presynaptycznego [90]. Ilość uwalnianego przez pęcherzyk neuroprzebiegu może być regulowana albo przed, albo po jego zlaniu się (z błoną presynaptyczną). Regulacja po zlaniu się pęcherzyka polega na wcześniejszym zamknięciu wytworzonego ujścia, łączącego ze szczeliną synaptyczną, jeszcze przed uwolnieniem pełnej porcji neuroprzebiegu – mechanizm „pocałuj i uciekaj”. W tym mechanizmie, pęcherzyk w trakcie egzocytozy gwałtownie ulega endocytozie, zanim całkowicie się zapadnie, co zapobiega utracie jego tożsamości.

4.1.5.3. *Dokowanie i zlewanie pęcherzyków* [91]

Dokowanie i zlewanie (fuzja) pęcherzyków jest złożonym procesem, w którym uczestniczą peptydy SNARE. Najbardziej swoistym i wyróżniającym działaniem wszystkich odmian białek SNARE jest wytwarzanie czterech równoległych pęczków helisy, określanych jako kompleks rdzeniowy SNARE. Cztery motywy SNARE, z których każdy zasadniczo stanowi powtórzenie 60-70 aminokwasów, spletają się wzajemnie ze sobą w poczwórny łańcuch, łączący dwie błony (*patrz: ryciny 9 A i B*). Białka czynne są częściowo związane z błoną pęcherzykową (v-SNARE), częściowo obecne są w cytosolu, a częściowo związane są z błoną

docked state. Ca^{2+} triggers binding of syntaxin (cell membrane) to synaptotagmin (vesicle membrane), the major Ca^{2+} receptor for neuronal exocytosis. This is a crucial switch in activating membrane fusion [92]. Now the vesicle is in close apposition, but not yet fused, with the plasma membrane [93,94]. Munc18-1 controls the synaptic vesicle fusion by allowing the formation of the core complex when it dissociates from syntaxin while synaptophysin dissociates from synaptobrevin. Complexin clamp the SNARE complex in a pre-fusion state (Figure 9A), but prevents fusion.

Depolarization of the presynaptic membrane causes the Ca^{2+} -channels to open, allowing the entry of more calcium, which triggers the fusion of the docked vesicles by activation of synaptotagmin that liberates the complexin (Figure 9B). Then complete fusion takes place within milliseconds with exocytosis of the neurotransmitter in the synaptic cleft occurs (Figure 9C) [95]. The calcium activated SNARE proteins synaptobrevin, syntaxin and SNAP-25 thus constitute the docking complex [96]. The tight-SNARE complex needs the action of the ATP-ase NSF to be dissociated so that v- and t-SNARE proteins can be recycled after fusion.

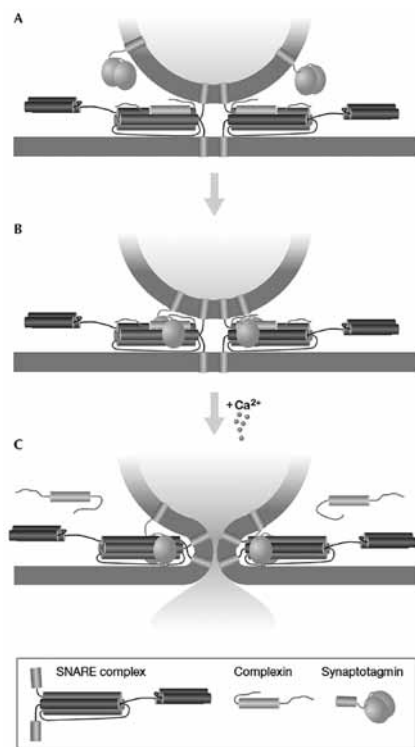


Figure 9. Docking and fusion of the vesicle
Rycina 9. Dokowanie i zlewanie się pęcherzyków

nerwową (t-SNARE).

Model SNARE zakłada, że każda z dwu zlewających się błon wymaga udziału co najmniej jednej cząstki SNARE z domeną przezbłonową. Pęcherzyki zostają najpierw przygotowane za pomocą związania czynnika wrażliwego na N-etylomaleimid z receptorowym białkiem (SNARE), za czym pęcherzyki stają się zdolne do zrania, tj. stają się wrażliwe na Ca^{2+} . W fazie przygotowania białka zostają rozmieszczone na błonie plazmatycznej (syntaxyna i SNAP-25). Następnie pęcherzyki układają się w pulę gotową do uwolnienia, rozmieszczoną w pobliżu miejsca aktywnego. Synaptotagmina w błonie pęcherzykowej działa jako czujnik wapnia i kieruje pęcherzyki w kierunku bogatych w kanały Ca^{2+} odcinków synapsy, unieruchamiając w ten sposób pęcherzyki w pozycji wyczekującej. Jony Ca^{2+} początkują wiązanie syntaksyny (błona komórkowa) z synaptotagminą (błona pęcherzykowa), głównym receptorem dla neuronalnej egzocytozy. Jest to podstawowy starter aktywacji zlewania się (fuzji) błon [92]. W takim momencie pęcherzyki są ustawione na przeciwko błony plazmatycznej, ale nie ulegają jeszcze zespoleniu z nią [93,94]. Munc18-1 reguluje zlewanie się pęcherzyków synaptycznych, umożliwiając tworzenie rdzennego kompleksu, uwalniając się od syntaksyny, w czasie gdy synaptofizyna uwalnia się od synaptobrewiny. Kompleksyna zakleszcza kompleks SNARE w stanie przedfuzyjnym (rycina 9, część A), ale zapobiega zlewaniu się błon.

Depolaryzacja błony presynaptycznej powoduje otwarcie kanałów Ca^{2+} , pozwalając na wpływ większej ilości wapnia, który wyzwała zlewanie się pęcherzyków, znajdujących się w pozycji wyczekującej przez uczynienie synaptotagminy, która wyzwała kompleksynę (rycina 9 część B). Całkowite zlenie się błon następuje wtedy w czasie milisekund z następującą egzocytozą neuroprzekaźnika do szczeliny synaptycznej (rycina 9, część C) [95]. Białka SNARE aktywujące synaptobrewinę, syntaxyna i SNAP-25 tworzą kompleks, odpowiedzialny za ustawianie pęcherzyków w pozycji wyczekującej (in. dokowanie lub parkowanie) [96]. Ściśnięty kompleks wymaga działania NSF ATP-azy aby po dysocjacji białka v- i t-SNARE mogły być ponownie wykorzystane po procesie zespolenia błon.

Wiele innych białek reguluje SNARE. Część tych białek reguluje skupianie się, lokalizację i zmianę struktury SNARE. Interakcje między t-SNAREs i neuronalnymi kanałami Ca^{2+} wspomagają odzyskiwanie kompleksów SNARE z miejsca egzocytozy [97].

The SNAREs are controlled by a multitude of other proteins. Some of these proteins may regulate assembly, localization and/or conformation of the SNAREs. Interactions between t-SNAREs and neuronal Ca^{2+} -channels may help recruit SNARE complexes to the site of exocytosis [97].

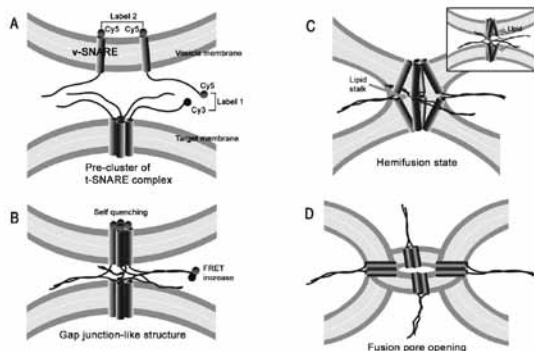


Figure 10. Vesicle fusion

Rycina 10. Zlewianie się pęcherzyków

The formation of the SNARE complex initially starts at the N-terminal part, and propagates toward the membrane-proximal C-terminal part, where the trans-membrane domains are expected to transduce tension from SNARE complex formation to two apposing membranes destined to fuse [98,99]. Fusion of lipid bilayers in an aqueous environment is a two-step process. First, the membranes are brought into close proximity where counteracting electrostatic forces need to be overcome before the lipids of the proximal leaflets can interact. Then the boundary between the hydrophilic and hydrophobic portion of the bilayer is destabilized and the outer part of the vesicle membrane fuses with the inner part of the cell membrane (hemifusion). Only there after also the other parts fuse (complete fusion) (Figure 10). A gap junction-like structure develops and the trans-membrane domain parts of syntaxin 1. The trans-membrane domains of the gap junction-like structure expand laterally to an extent that allows for a small number of lipid molecules between them in the form of a lipid stalk. Fusion pores form an aqueous connection across the fusing bilayers, which can open abruptly in micro-seconds. This phase is followed by a gradual expansion of the fusion pore that is irreversible, the activated fusion peptide inserts into the interior of the target membrane. Opening of a fusion pore thus would involve two processes: dis-

Kształtowanie kompleksu SNARE rozpoczyna się od części N – końcowej i rozprzestrzenia w kierunku znajdującej się w pobliżu błony części C-końcowej, gdzie przezbłonowe domeny powinny przenosić napięcie formowanego kompleksu SNARE na dwie przeciwległe błony mające ulec zespoleniu [98,99]. Zlewianie się dwu warstw lipidów w środowisku wodnym przebiega w dwu etapach. W pierwszym błony są przybliżane do siebie, przy czym muszą być pokonane siły elektrostatyczne, zanim sąsiadujące ze sobą blaszki mogły wejść w interakcje. Powoduje to utratę równowagi między częścią hydrofilną a częścią hydrofobową podwójnej blaszki i zewnętrzna blaszka pęcherzyka zlewa się z wewnętrzną warstwą błony komórkowej (hemifuzja albo inaczej połowicze zlanie lub zespolenie). Uzupełnieniem tego procesu jest zespolenie pozostałych części (pełna fuzja czy inaczej: pełne zespolenie) (patrz: rycina 10) Rozwijają się struktury przypominające złącza przerywane (*gap junction*) i części domeny przezbłonowej syntaksyny 1. Domeny przezbłonowe struktury przypominającej złącze bezstykowe (przerwane) rozszerzają się do boku tak dalece, że umożliwiają małej liczbie cząstek lipidowych pomiędzy nim łączyć się w rodzaj szypuły. Szczeliny zespolenia tworzą wodne połączenia przez zespalające się podwójne blaszki, które mogą otworzyć się w ciągu mikrosekund. Po tej fazie następuje stopniowe i nieodwracalne rozprzestrzenianie się szczelin w złączu, uczynnione peptydy zespalające wnikają do wnętrza odpowiedniej błony. Otwarcie szczeliny złącza obejmuje więc dwa procesy: przerwanie i zespalanie warstwy wewnętrznej błony oraz całkowitą dysocjację domen przezbłonowych, by ostatecznie mógł być utworzony pierścieniowy kształt z kompleksów cis-SNARE [100].

Mutacje genów odpowiedzialnych za wytwarzanie białek SNARE prowadzi do chorób nerwowo-mięśniowych, jak wrodzone zespoły miasteniczne i tym podobnych.

SNARES odnoszące się do synaptobrewiny (synaptobrewina, białko błony związane z pęcherzykiem VAMP - *vesicle-associated membrane protein*) to białka SNARE błony pęcherzyka (v-SNAREs), podczas gdy peptydy SNARES związane z syntaksyną i SNAP-25 stanowią białka błony docelowej (t-SNAREs) [101,102]. Wewnątrzkomórkowymi maszynami fuzji są nadbiałkowe struktury, powstające w miarę potrzeby i rozbrajane natychmiast po zakończeniu procesu zlewania się błon, w sposób pozwalający na ich ponowne użycie. Z wyjątkiem SNARE zakotwiczonych w błonie (przypuszczalnych katalizatorów zespalania),

ruption and merging of the inner leaflet membranes and complete dissociation of the trans-membrane domains to finally achieve a ring-like arrangement of cis-SNARE complexes [100].

Mutations in the genes responsible for the production of the SNARE proteins results in neuromuscular diseases like congenital myasthenic syndromes etc.

SNAREs related to synaptobrevin (synaptobrevin, vesicle-associated membrane protein=VAMP) are vesicle membrane SNAREs (v-SNAREs), whereas SNAREs related to syntaxin and SNAP-25 are target membrane SNAREs (t-SNAREs) [101,102]. The intracellular fusion machines are dynamic supra-molecular structures that are assembled upon demand and dismantled as soon as fusion is completed to allow them to be easily and quickly reused. Except for the membrane-anchored SNAREs (the presumed fusion catalysts), most components are recruited from the cytoplasm. After fusion, Rab proteins are inactivated by GTP-ase-activating proteins and dissociate from the respective membranes to initiate a new cycle of fusion. SNARE complexes, in turn, are dissociated after fusion so that the individual SNARE proteins can be recycled with their resident membranes.

The number of vesicles released at a synapse is determined by the number of release-ready (or docked) vesicles and the exocytotic probability of the individual vesicles. During repetitive stimulation, electrophysiological recordings show that the number of synaptic vesicles released with each stimulus decreases over time. This results from depletion of synaptic vesicles in the readily releasable pool, a change in the probability of vesicle release, and insufficient vesicle pool replenishment [103].

4.1.5.4. Vesicle fission

Endocytosis thus is the formation of vesicles from presynaptic membrane [104]. Much of the membrane from vesicles released by nerve stimulation is retrieved by endocytosis. These vesicles are refilled with Ach and ATP, sealed-off, and returned to the readily releasable pool. Recycling of vesicles can take place via two pathways: 1.) recycling before the vesicle membrane is completely integrated in the presynaptic membrane 2.) clathrin and dynamin mediated endocytosis. This last process is essential for the vesicle cycle [105]. Clathrin-mediated endocytosis presumably represents the major pathway. A number of adaptor and accessory proteins

większość komponentów pochodzi z cytoplazmy. Po zespoleniu białka Rab ulegają unieczynnieniu przez białka, aktywowane przez GTP-azę i odłączają się od właściwej błony, by rozpocząć nowy cykl zlewania się kolejnych błon. Kompleksy SNARE, dla odmiany, po procesie zespalania, ulegają dysocjacji, dzięki czemu poszczególne białka SNARE mogą być ponownie użyte z ich przyległymi fragmentami błon.

Liczba uwolnionych w synapsie pęcherzyków jest określona przez ilość pęcherzyków gotowych do uwolnienia (zdeponowanych) i prawdopodobieństwem egzocytozy każdego z pojedynczych pęcherzyków. Badania elektrofizjologiczne wykazują, że liczba uwalnianych pęcherzyków maleje po każdym z powtarzanych bodźców. Jest to następstwem zmniejszenia ilości pęcherzyków synaptycznych w puli przygotowanej do uwolnienia, zmiany możliwości uwalniania pęcherzyków i niedostatecznym uzupełnianiem puli pęcherzyków [103].

4.1.5.4. Odczepianie pęcherzyków

Endocytoza to wytwarzanie pęcherzyków z błony presynaptycznej [104]. Znaczna ilość błon z pęcherzyków uwalnianych podczas drażnienia nerwu jest odzyskiwana drogą endocytozy. Pęcherzyki te są ponownie napełniane Ach i ATP, zamykane i kierowane do puli pęcherzyków uwalnianych w pierwszej kolejności. Odzyskiwanie pęcherzyków odbywa się na dwa sposoby: 1) odzyskanie pęcherzyka, zanim błona pęcherzyka ulegnie całkowitemu zespoleniu z błoną presynaptyczną, 2) endocytozę regulowaną przez klatrynę i dynaminę. Ten ostatni sposób jest niezbędny w cyklu tworzenia i odzyskiwania pęcherzyków [105]. Endocytoza regulowana przez klatrynę stanowi sposób najistotniejszy. Włączone są w to liczne białka adaptacyjne i dodatkowe. Współpracują one z klatryną w odkształcaniu błony, skupiając je w rusztowanie klatrynowe, bądź też towarzysząc odczepianiu pęcherzyków z udziałem dynaminy-GTP-azy. Proces przebiega w kilku etapach: 1) klatryna osłania nukleację i gromadzenie, 2) klatryna osłania część dojrzewania, 3) klatryna osłania odczepianie pęcherzyka i 4) pęcherzyk uwalnia się z osłony klatryny [106].

Endocytoza błony pęcherzykowej, w której uczestniczy klatryna, może bezpośrednio obejmować błonę plazmatyczną w pobliżu strefy aktywnej lub przez większą endocytozę ze sfałdowań obszerniejszych błony plazmatycznej, z której pączkują opłaszczone klatryną pęcherzyki. W następstwie dołączenia klatryny do zlewającej się błony pęcherzyka, przebudowa klatryny

is involved. They cooperate with clathrin in deforming the membrane, assembling the clathrin scaffold, or assisting dynamin-GTP-ase-mediated fission. The process holds several steps: 1.) clathrin coat nucleation and assembly; 2.) clathrin coated part maturation; 3.) clathrin coated vesicle fission and; 4.) vesicle uncoating [106].

Clathrin-mediated endocytosis of vesicle membranes can occur directly from the plasma membrane of the peri-active zone or by bulk endocytosis of large membrane infoldings from which clathrin coated vesicles bud. Following clathrin recruitment to the fused vesicle membrane, rearrangement of clathrin causes curvature of the clathrin cage and membrane indentation or early budding (Figure 11) [107]. The final separation of the coated pits from the plasma membrane requires dynamin, a small GTP-ase that forms a collar around the neck of the budding vesicle and drives vesicle fission [108]. Cortactin and syndacina bind to dynamin which causes fission of the membrane curved by clathrin [109]. Synaptotagmin facilitates this process, but is not absolutely required for endocytosis [110].

Ca^{2+} ions are involved in activation of the endocytosis machinery, but can be substituted by other bivalent cations. Significant decrease of extracellular Ca^{2+} concentration leads to the impairment of synaptic vesicle retrieval [111]. The final stage after the vesicle has been severed from the plasma membrane is the uncoating process, during which both the clathrin cage and adaptor proteins disengage from the vesicle. The clathrin-coated vesicles then shed their coats and trans-locate to the interior of the nerve terminal.

In bulk endocytosis large parts of membrane produce endosomes which enter the cell. New vesicles bud off from these endosomes (Figure 12.). Also here clathrin is involved.

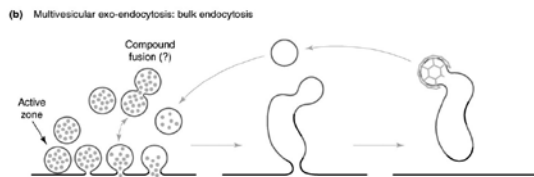


Figure 12. Bulk endocytosis
Rycina 12. Masywna endocytoza

The recycled vesicles enter the nerve terminal and refill with Ach, and are used again [112]. Recycled vesi-

powoduje zakrzywienie koszyka klatrynowego i wgłobienie błony lub wczesne pączkowanie (*patrz: rycina 11*) [107]. Ostateczne odszczepienie opłaszczonych jamek od błony plazmatycznej wymaga działania dynaminy, małej cząstki GTP-azy, tworzącej kołnierz wokół szyjki wpuklającego się pęcherzyka i prowadzi do jego odłączenia [108]. Kortaktyna i syndacyna wiążą się z dynamiką, co powoduje odszczepienie błony zakrzywionej przez klatrynę [109]. Synaptotagmina ułatwia endocytozę, ale nie jest dla niej absolutnie niezbędna [110].

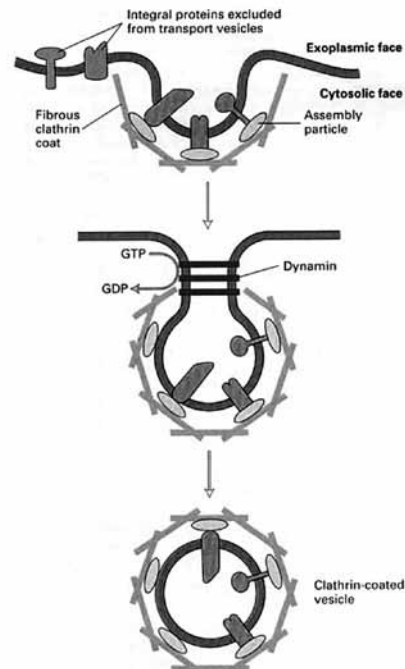


Figure 11. Clathrin mediated endocytosis
Rycina 11. Endocytoza regulowana za pomocą klatryny

Jony Ca^{2+} są włączone w aktywację mechanizmów endocytozy, ale mogą być zastąpione przez inne kationy dwuwartościowe. Znaczne zmniejszenie stężenia zewnątrzkomórkowego Ca^{2+} prowadzi do upośledzonego odzyskiwania pęcherzyków synaptycznych [111]. Końcowym etapem po oddzieleniu pęcherzyka od błony plazmatycznej jest proces usuwania otuliny, w którym zarówno koszyk klatryny, jak i białka dostosowujące odłączają się od pęcherzyka. Otulone klatryną pęcherzyki gubią swoją otulinę i przemieszczają się do wnętrza zakończenia nerwowego.

W masywnej endocytozie znaczne części błony wywarzają endosomy, wnika-jące do komórki. Z takich

cles can go to all three pools of vesicles [113]. Clathrin-mediated endocytosis thus maintains synaptic vesicle pools [114]. However, functional synaptic vesicles exist even when clathrin function has been disrupted [115]. Clathrin mediated endocytosis takes place at the pericellular zone of the nerve terminal.

It has been proposed that synaptic vesicles can also transiently fuse with the plasma membrane by means of a narrow fusion pore, release their contents into the synaptic cleft and re-internalize in a dynamin-dependent but clathrin-independent manner (kiss and run release and recycling). In this kiss-and-run recycling are synaptic vesicles thought to fuse only partially with the plasma membrane, and pulled back into the cytoplasm without a need for clathrin [116]. Also these vesicles can reload and fuse again [117,118].

4.1.6. Presynaptic acetylcholine receptors, autoreceptors

In the presynaptic membrane are n-AchRs present. It may be that these receptors actually are located in the cell membrane of the un-myelinated Schwann cells. These nicotinic receptors ($\alpha 3\beta 2$) sense the presence of transmitter in the synaptic cleft and, by means of a positive- and negative-feedback system, causes the release of more or less transmitter. The positive feedback is complemented by a negative-feedback system that senses when the concentration of transmitter in the synaptic cleft has increased appropriately and shuts down the release system. It is believed that tetanic fade and train-of-four fade during neuromuscular block due to non-depolarising NMBs arise from inhibition of presynaptic cholinergic auto-receptors at the motor nerve ending [119]. Succinylcholine does not inhibit the presynaptic nicotinic auto-receptor at clinically relevant concentrations [120]. Auto-receptors located in the membrane of the terminal and sensitive to the synaptic cleft concentration of the neurotransmitter thus introduce terminal regulation in the neural secretory event, representing a mechanism of fine tuning of the amplitude of the chemical signal [121]. The difference between presynaptic and postsynaptic n-AchRs is that presynaptic n-AchRs can bind β -bungarotoxin only, while postsynaptic receptors only bind to α -bungarotoxin [122].

The n-AchR subtype on the nerve terminal or Schwann cells that causes fade have been identified as having $\alpha 3\beta 2$ constitution [123].

endosomów wypęczkowują nowe pęcherzyki (*patrz: rycina 12*). Również i tu działa klatryna.

Odzyskane pęcherzyki docierają do zakończenia nerwowego, napełniane są Ach i ponownie używane [112]. Odzyskiwane pęcherzyki mogą trafić do jednego z trzech zbiorów (puli) pęcherzyków [113]. Endocytoza regulowana za pomocą klatryny podtrzymuje w ten sposób zasób pęcherzyków synaptycznych [114]. Sprawne pęcherzyki synaptyczne istnieją jednak także przy przerwaniu sprawnego działania klatryny [115]. Endocytoza regulowana za pomocą klatryny odbywa się przy strefie aktywnej zakończenia nerwu.

Przypuszczano, że pęcherzyki synaptyczne mogą się także zespalać z błoną plazmatyczną za pomocą małych szczelin fuzyjnych, uwalniać swoją zawartość do szczeliny synaptycznej i ponownie ulegać internowaniu w sposób zależny od dynaminy, ale niezależny od klatryny (uwalnianie i odzyskiwanie według zasady "pocałuj i uciekaj"). Uważa się, że w tym mechanizmie "pocałuj i uciekaj", pęcherzyki synaptyczne tylko częściowo zespalają się z błoną plazmatyczną i wycofywane są do cytoplazmy bez potrzeby udziału klatryny [116]. Także te pęcherzyki mogą być ponownie ładowane i wyładowywane poprzez fuzję błon [117,118].

4.1.6. Presynaptyczne receptory acetylocholin, autoreceptory

W błonie presynaptycznej obecne są receptory n-AchR. Może być tak, że receptory te są aktualnie rozmieszczone na bezmielinowych komórkach Schwanna. Te receptory nikotynowe ($\alpha 3\beta 2$) reagują na obecność przekaźnika w szczelinie synaptycznej i za pomocą dodatnich lub ujemnych sprzężeń zwrotnych, powodują zwiększenie lub zmniejszenie uwalniania przekaźnika. Dodatnie sprzężenie zwrotne jest uzupełniane o sprzężenie zwrotne ujemne, włączane wtedy, kiedy stężenie przekaźnika w szczelinie synaptycznej osiągnie właściwy poziom, i zamyka system dla dalszego wypływu. Uważa się, że zanikanie podczas stymulacji tężcowej lub ciągu czterech bodźców podczas działania NMB, wynika z hamowania presynaptycznych autoreceptorów cholinergicznym na zakończeniach nerwów ruchowych [119]. Sukcynylocholina nie blokuje presynaptycznych autoreceptorów nikotynowych w stężeniach klinicznie istotnych [120]. Autoreceptory rozmieszczone w błonie zakończenia i wrażliwe na zmiany stężenia neuroprzekaźnika w szczelinie, pobudzają końcową regulację zjawiska sekrecji neuronalnej, stanowiąc mechanizm delikatnego sterowania ampli-

4.1.7. Genetic aspects of the presynaptic organization

Proteomic studies suggest that at least 26 genes encode presynaptic proteins, and 12 of them cause defects in presynaptic structure that can lead to decreased Ach release and muscle weakness. These defects can be related to exocytosis, endocytosis, formation of active and peri-active zones, vesicle transport, and neuropeptide modulation.

4.2. The synaptic cleft [125]

Between the presynaptic membrane and the postsynaptic membrane exists a gap, called the synaptic or junctional cleft, with a width of approximately 50 nm. The cleft contains the basement membrane and extracellular matrix material that covers many cells in the body. The basement membrane consists of two layers: a) the basal lamina directly linked to the plasma membrane, and b) an external, fibrillar reticular lamina. The basement membranes contain protein and carbohydrate but no lipid or nucleic acid. The fibrils of the reticular lamina are collagenous, and they are embedded in an amorphous proteoglycan-rich ground substance. Basement membrane components in muscles play active roles in myogenesis and synaptogenesis. At the NMJ, the basal lamina, but not the reticular lamina passes between nerve and muscle membranes and extends into the junctional folds that invaginate the postsynaptic membrane. The basal lamina holds them together at short distance, an activity performed by integrins and dystroglycan [126]. Furthermore the basal lamina holds AchE.

4.2.1. The basal lamina

The basal lamina is built around a cooperative meshwork of collagen type-IV and laminins, stabilized by heparan sulphate proteoglycans (HSPs) and linker proteins, which organizes and entraps an array of modular extracellular matrix glycoproteins, including perisynaptic fibronectin and tenascin-C, as well as other soluble and insoluble morphogenic, mitogenic, and trophic signals. Glycoproteins provide adhesive and signalling mechanisms supporting synaptic target recognition and synaptogenesis [127]. Heparan sulphate proteoglycans and chondroitin sulphate proteoglycans bind to signalling factors and cell surface molecules [128]. Pre-synaptically secreted growth factors are present in the matrix and induce synaptic n-AchR clustering/maintenance. Additional

tułą sygnału chemicznego [121]. Różnica pomiędzy presynaptycznymi i postsynaptycznymi n-AchR polega na tym, że presynaptyczne n-AchR mogą wiązać tylko β -bungarotoksynę, podczas gdy receptory postsynaptyczne wiążą tylko α -bungarotoksynę [122].

Podtyp n-AchR na zakończeniach nerwowych lub komórkach Schwanna, odpowiedzialny za zjawisko zanikania, został poznany w swojej budowie, jako złożony z podjednostek $\alpha\beta\delta$ [123].

4.1.7. Genetyczne aspekty organizacji presynaptycznej

Badania proteomiczne sugerują, że co najmniej 26 genów zawiera kody białek presynaptycznych a 12 z nich może wiązać się defektem w strukturach presynaptycznych i może prowadzić do zmniejszonego uwalniania Ach i nużliwości mięśni [124]. Defekty te mogą dotyczyć egzocytozy, endocytozy, tworzenia stref aktywnych i okołaktywnych, przenoszenia pęcherzyków i modulacji neuropeptydów.

4.2. Szczelina synaptyczna [125]

Między błoną presynaptyczną a błoną postsynaptyczną istnieje przerwa, nazywana szczeliną złącza albo synaptyczną, której szerokość wynosi około 50 nm. Szczelina zawiera błony podstawne i macierz zewnątrzkomórkową, pokrywającą większość komórek ciała. Błona podstawna jest zbudowana z dwu warstw: a) blaszki podstawowej bezpośrednio stykającej się z błoną plazmatyczną i b) blaszki zewnętrznej, włóknisto-siatkowej. Błona podstawowa zawiera białka i węglowodany, ale nie zawiera lipidów ani kwasów nukleinowych. Włókna blaszki siatkowej zbudowane są z kolagenu i zanurzone są w amorficznej substancji podstawowej, bogatej w proteoglikan. Składniki błony podstawowej odgrywają w mięśniach czynną rolę w miogenezie i synaptogenezie. W złączu nerwowo-mięśniowym, blaszka podstawowa, a nie blaszka siatkowata, przechodzi między błoną nerwową a mięśniową i rozciąga się do fałdów wcinających się w błonę postsynaptyczną. Błona podstawowa utrzymuje je w bliskiej odległości, w czym pomagają integryny i dystroglikan [126]. Ponadto blaszka podstawowa utrzymuje AchE.

4.2.1. Blaszka podstawowa

Blaszka podstawowa jest oparta w swej budowie na współpracującej sieci kolagenu typu IV i laminin, stabilizowanych heparanem siarczanu proteoglikanów (HSP) i białek wiążących. Porządkuje ona i wiąże szereg modułów glikoproteinowych macierzy zewnątrzko-

synaptic cleft components contribute to assembly of the n-AchR domain. Thus, the synaptic extracellular matrix provides a scaffold supporting the wide range of trans-synaptic signalling interactions shaping synapse structure and function. The basal lamina is 50–100 nm thick.

The core basal lamina components, laminin and collagen IV, are signalling as well as structural molecules, and their receptors, dystroglycan and integrins, are signal transducers [129,130]. For example, active signalling from laminin α_2 provides a survival signal for muscle. Laminin enhances proliferation of myoblasts, stimulates their motility, and leads them to assume the bipolar shape characteristic of fusing cells [131]. Myotube formation is decreased, although not abolished, in the absence of laminin. Laminin and collagen IV also provide binding sites for the proteoglycans perlecan [132]. A major fraction of AchE at the NMJ is stably associated with the synaptic basal lamina via a collagen-like “tail” (ColQ) [133]. Mutations of ColQ in humans underlie some cases of congenital myasthenia gravis. ColQ binds to perlecan in the basal lamina. The basal lamina plays a role in maintaining the postsynaptic integrity via the nerve-derived synaptic basal lamina component agrin. Thus the basal lamina plays an essential and dynamic role in the organization of the complex morphology of the NMJ, with its presynaptic active zones where Ach is released by calcium-triggered exocytosis of synaptic vesicles, its postsynaptic clustering of AchRs and its secondary folds containing voltage-dependent sodium channels where action potentials originate. The dystroglycan complex binds to laminin on the extracellular surface of the muscle cell. On the muscle cell intracellular surface, the dystroglycan complex binds to dystrophin. Dystrophin also binds to the actin cytoskeleton in the muscle cell. Laminin in the matrix binds to the calcium channels in the presynaptic motor neuron. This binding is thought to signal the motor nerve terminal in the location of the active zone complex.

The NMJ is bounded by four distinct basal laminae (primary cleft, secondary cleft, extra-synaptic, and terminal Schwann cell). The basal membranes also possess potent signalling components, which promote proliferation, survival, and differentiation in neighbouring cells.

mórkowej, włącznie z perisynaptyczną fibronektyną i tenascyną-C oraz innymi rozpuszczalnymi i nierozpuszczalnymi sygnałami morfogenezy, mitozy i wzrostu. Glikoproteiny zabezpieczają mechanizmy adhezyjne i sygnalizacyjne, podtrzymujące rozpoznawanie tarczy i synaptogenezę [127]. Heparan siarczanowy proteoglikanu i chondroitynian siarczanowy proteoglikanu wiążą się z czynnikami sygnalizacyjnymi i cząsteczkami na powierzchni komórki [128]. Presynaptycznie wydzielany czynnik wzrostowy jest obecny w macierzy i indukuje oraz pobudza do zespalania się i utrzymywania n-AchR. Do zlepiania się domen n-AchR przyczyniają się też inne składowe szczeliny synaptycznej. Synaptyczna macierz pozakomórkowa stanowi więc rusztowanie, podtrzymujące szeroki zakres transsynaptycznych interakcji sygnalizacyjnych, wpływających na budowę i czynność synapsy. Błazka podstawowa ma 50-100 nm grubości.

Zasadnicze składniki błazki podstawowej, laminina i kolagen IV, są cząsteczkami zarówno sygnalizacyjnymi, jak i strukturalnymi a ich receptory, dystroglikan i integryny, stanowią przekaźniki sygnału [129,130]. Na przykład aktywny sygnał z lamininy α_2 stanowi sygnał podtrzymania życia dla mięśnia. Laminina nasila proliferację myoblastów, pobudza ich ruchliwość i prowadzi do przybierania przez nie kształtu dwubiegunowego, charakterystycznego dla zlepiających się komórek [131]. Przy braku lamininy tworzenie cewy mięśniowej jest ograniczone, ale nie zatrzymane. Laminina kolagen IV stanowią też miejsca wiązania dla proteoglycanów perlecan [132]. Przeważająca część AchE w NMJ jest stabilnie połączona z synaptyczną błoną podstawową poprzez kolagenopodobny „warkocz” (ColQ) [133]. Mutacje ColQ u ludzi stanowią podstawę niektórych przypadków wrodzonej ciężkiej miastonii. ColQ wiąże się z perlekanem w błonie podstawowej. Błona podstawowa ma znaczenie w utrzymaniu postsynaptycznej integralności przy pomocy agryny, pochodnej składowej neuronalnej synaptycznej błony podstawowej. Błona podstawowa odgrywa zatem istotną i dynamiczną rolę w organizowaniu złożonej budowy NMJ, z jej presynaptycznymi strefami aktywnymi, gdzie Ach jest uwalniana z pęcherzyków drogą zależnej od wapnia egzocytozy, w postsynaptycznym gromadzeniu się AchR i wtórnym powstawaniu wtórnych fałdów, zawierających bramkowane napięciem kanały sodowe, gdzie powstaje potencjał czynnościowy. Kompleks dystroglikanu wiążą się z lamininą zewnętrznąj powierzchni komórki mięśniowej. Na powierzchni wewnętrznej błony komórkowej, kompleks dystroglikanu wiąże się z dystrofiną.

4.2.2. *Acetylcholinesterase* [134]

Ach diffuses after its release from the nerve across the synaptic cleft and reaches the n-AchR. Much of the Ach is during this diffusion hydrolysed by acetylcholinesterase (AChE) [135]. The hydrolysis is very fast; about 100 μ .sec for one substrate molecule. Neurons, muscle cells, and Schwann cells synthesize and secrete AChE at the NMJ, however, with a different molecular form. In the synaptic cleft there are about 3000 molecules of AChE per μm^2 surface of postsynaptic membrane. The concentration in the secondary synaptic folds is very high, they are thus like sinks that inactivate Ach, preventing the receptors to be activated more than ones. AChE is excreted into the cytoplasm of the muscle fibres and associate intra-cellular with the proteoglycan perlecan, and then they are externalized to the NMJ. AChE, unlike AchR, is not a trans-membrane protein but is a molecule associated with the basement membrane at the NMJ. Most of the secreted enzymes are attached to an anchorage protein, and the pool of monomeric subunits that is not recruited by them, undergoes degradation. Muscle AChE finally appears at the surface of the cells about 2.5 h after its synthesis and has a half-life of about 50 h [136]. AChE is accumulated mostly in the synaptic cleft, in the area facing the postsynaptic crests and in the synaptic folds. Most of the newly synthesized enzyme, however, is catalytically inactive and rapidly degraded by the ERAD pathway. These molecules are sensitive to the endoglycosidase Endo-H, indicating residence in the endoplasmic reticulum and/or the early Golgi apparatus. The subset of AChE molecules that subsequently mature to catalytically active enzyme become resistant to Endo-H, indicating transport to and transit through the Golgi apparatus.

Human AChE is composed of an invariable core of 534 amino acids and a variable C-terminal peptide of 14, 26 or 40 amino acids [137]. AChE exists in various structural confirmations. Two classes of AChEs have been defined: the globular and asymmetric forms. Globular forms are monomers (G1), dimers (G2) and tetramers (G4) of the catalytic subunit; and asymmetric forms comprised to one (A4), two (A8) or three (A12) catalytic tetramers attached to a non-catalytic subunit. The synaptic form of the enzyme, consisting of three catalytic tetramers associated with the collagen-like tail (ColQ). The AChE found at the NMJ – the A12 form – consists

Dystrofina wiąże się także z aktywną w szkielecie komórki mięśniowej. Laminina w macierzy presynaptycznych części neuronów motorycznych związana jest z kanałami wapnia. Uważa się, że wiązanie to służy sygnalizowaniu kompleksu strefy aktywnej w zakończeniu nerwu ruchowego.

Połączenie nerwowo-mięśniowe jest umocowane przez cztery różne blaszki podstawowe (szczelina pierwotna, szczelina wtórna, pozasynaptyczna i krańcowa komórka Schwanna). Błony podstawowe mają także silne składowe sygnalizacyjne, które wspierają proliferację, przeżywalność i różnicowanie sąsiednich komórek.

4.2.2. *Acetylcholinoesteraza* [134]

Acetylocholina, po jej uwolnieniu z nerwu, dyfunduje poprzez szczelinę synaptyczną i dociera do n-AchR. Dużo Ach w czasie tej dyfuzji jest hydrolyzowane przez acetylocholinoesterazę (AChE) [135]. Hydrolyza jest bardzo szybka, około 100 μ .sek na jedną cząsteczkę substratu. Neurony, komórki mięśniowe i komórki Schwanna syntetyzują i wydzielają AChE, jednakże w różnej postaci molekularnej. W szczelinie synaptycznej znajduje się około 3000 cząsteczek AChE na μm^2 powierzchni błony synaptycznej. Stężenie we wtórnych fałdach synaptycznych jest tak bardzo wysokie, że sprawiają one wrażenie zgłębników unieczynnających Ach, zapobiegając pobudzenie receptora więcej, niż jeden raz. Acetylocholinoesteraza jest wydzielana do cytoplazmy włókien mięśniowych i łączy się wewnątrzkomórkowo z proteoglikanem perlekanu, po czym jest przesuwana na zewnątrz do NM. Acetylocholinoesteraza, w odróżnieniu od AchR, nie stanowi białka przezbłonowego, lecz jest cząsteczką, związaną z błoną podstawową w NMJ. Większość uwalnianego enzymu jest doczepiona do białka kotwiczącego i ze zbiorem monomerycznych podjednostek, nie zaangażowanych przez ten enzym, ulega degradacji. Mięśniowa AChE pojawia się ostatecznie na powierzchni komórki w 2,5 godz. po jej zsyntetyzowaniu i ma półokres trwania 50 godz. [136]. Acetylocholinoesteraza jest gromadzona przeważnie w szczelinie synaptycznej, w obszarze grzebieni postsynaptycznych i synaptycznych fałdów. W przeważającej części nowo zsyntetyzowany enzym nie jest aktywny katalitycznie i ulega szybkiej degradacji drogą ERAD. Większość cząsteczek jest wrażliwa na endoglikozydazę Endo-H, obecną w siatce endoplazmatycznej i (lub) w aparacie Golgiego. Podzbiór cząsteczek AChE, które dojrzewają do katalitycznej aktywności,

of 12 catalytic subunits connected to 3 collagen-like tails (ColQ subunits) via which AchE attaches to the synaptic basement membrane [138,139]. The ColQ contains two heparin binding domains that interact with heparan sulphate proteoglycans, such as perlecan, which in turn interact with dystroglycan [140-142]. The C-terminal of ColQ binds to the muscle-specific kinase (MuSK), the ColQ subunit of AchE binds to heparin and the A12 form of the enzyme binds to perlecan. Perlecan interacts with the trans-membrane molecule dystroglycan that is linked to the actin cytoskeleton through dystrophin/utrophin (Figure 14.).

Several neuromuscular influences, including neurotrophic substances, nerve impulse patterns, and muscle mechanical activity has been implicated in the maintenance of AchE expression. Nerve derived agrin directs the accumulation of AchE at maturing and adult synapses [143].

Butyrylcholinesterase (BchE) is a presynaptic modulator of synaptic transmission at mature NMJs [144]. AchEs are very stable in the basal lamina ($t_{1/2}$ around 20 days) [145].

Ach transiently binds to the peripheral anionic site of the enzyme inducing structural changes which allow Ach to enter the gorge of the AchE molecule, where the anionic subsite binds choline and positions the ester at the acylation site. Serine displaces choline from the Ach and the acetate group is liberated by a hydrolysis step.

The binding of Ach to its receptor sites is much faster than the rate at which it is hydrolyzed by AchE, the amount of Ach molecules that will initially bind to synaptic receptors is determined by the ratio of receptors to esterase: roughly 20% esterase and 80% receptors [146]. The rate at which Ach is liberated from the activated receptors is slower than the Ach hydrolysis rate, so that, when Ach molecules are released, most AchE units are free and capable of binding a "new" Ach molecule, maintaining in this way a low Ach concentration in the cleft and virtually excluding the possibility of a single Ach molecule activating another receptor.

Denervation of mammalian skeletal muscle and the blocking of spontaneous contraction by tetrodotoxin (TTX) have been shown to decrease AchE activity and the appearance of asymmetric forms at the cell surface. The lack of membrane depolarization also negatively affects ColQ expression.

stają się odporne na działanie Endo-H, czego dowodzi transport do i przez aparat Golgiego. Ludzka AchE jest zbudowana ze stałego rdzenia 354 aminokwasów i zmiennego peptydu C-końcowego, złożonego z 14, 26 lub 40 aminokwasów [137]. Acetylocholinoesteraza występuje w różnych postaciach strukturalnych. Określono dwie klasy AchE: w postaci kłębkowej i asymetrycznej. Postać kłębkowa stanowi monomery (G1), dimery (G2) i tetramery (G4) podjednostek katalizujących a postać asymetryczna jest ograniczona do jednego (A4) dwu (A8) lub trzech (A12) tetramerów katalizujących, przyłączonych do podjednostki nie katalizującej. Postać synaptyczna enzymu zbudowana jest z trzech tetramerów katalizujących, połączonych ze sznurem kolagenopodobnym (CO1Q). Znalaziona w złączy nerwowo-mięśniowym AchE, postać A12, składa się z 12 podjednostek katalizujących, połączonych z 3 sznurami kolagenopodobnymi (podjednostki CO1Q), za pomocą których AchE przytwierdza się do błony podstawowej pęcherzyka [138,139]. ColQ ma dwie heparynowe domeny wiązania, które wchodzi w reakcję z proteoglikanami siarczanu heparyny, jak perlekan, który z kolei reaguje z dystroglikanem [140-142]. Zakończenie węglowe ColQ łączy się ze swoistą dla mięśnia kinazą (MuSK). Podjednostka AchE ColQ, wiąże się z heparyną a postać A12 enzymu wiąże się z perlekanem. Perlekan reaguje z cząsteczką przezbłonową, dystroglikanem, który z kolei jest przytwierdzony do aktyny szkieletu komórkowego, poprzez dystrofinę/utrofinę (patrz: rycina 14).

Uważa się, że na utrzymywanie ekspresji AchE, wpływa szereg mechanizmów pochodzenia mięśniowego, jak substancje neurotroficzne, sekwencje pobudzeń nerwowych i mechaniczna aktywność mięśnia. Agryna pochodzenia nerwowego kieruje gromadzeniem się i dojrzewaniem AchE w synapsach człowieka [143].

Butyrylocholinesteraza (BchE) jest modulatorem presynaptycznym przewodzenia synaptycznego w dojrzałych zakończeniach nerwowo-mięśniowych [144]. Esteraza Ach w błonach podstawnych jest bardzo stabilna ($t_{1/2}$ około 20 dni) [145].

Przejściowo Ach wiąże się z obwodową częścią anionową enzymu, powodując zmiany strukturalne, które z kolei umożliwiają wejście Ach do cieśni cząsteczki AchE. W tym miejscu cholina zostaje związana przez podjednostki anionowe i ester ustawiony jest w pozycji do acetylacji. Seryna wypiera cholinę z Ach i część octanowa jest uwolniona w przebiegu hydrolyzy.

Correspondence address:

Leo H.D.J. Booij
Professor of Anaesthesiology
Department of Anaesthesiology
Radboud University Nijmegen,
P.O. Box 9101, 6500 HB Nijmegen
The Netherlands
Phone: +31 24 354 0524
E-mail: l.booij@anes.azn.nl

References/Piśmiennictwo

at Authors/u Autorów
and/oraz: www.anestezjologiairatownictwo.pl

Wiązanie Ach z miejscem acetylacji jest znacznie szybsze niż tempo hydrolizowania przez AchE. Ilość cząsteczek Ach związanych wstępnie z receptorami synaptycznymi określona jest przez stosunek ilości miejsc receptorowych do liczby cząsteczek esterazy; w przybliżeniu na 80% receptorów przypada 20% cząsteczek esterazy [146]. Szybkość uwalniania cząsteczek Ach z pobudzonych receptorów jest mniejsza od szybkości hydrolizy, w związku z czym na uwolnione cząstki Ach czeka już gotowa większość swobodnych enzymów AchE, gotowych na przyjęcie „nowych”, utrzymując w ten sposób niski poziom stężenia Ach w szczelinie synaptycznej i molekuł Ach, tym samym praktycznie uniemożliwiając pobudzenie kolejnych receptorów przez jedną cząsteczkę Ach.

Wykazano, że odnerwienie mięśni szkieletowych ssaków albo zablokowanie kurczliwości mięśni przez tetrodotoksynę (TTX), zmniejsza aktywność AchE i wywołuje pojawianie się kształtów asymetrycznych na powierzchni komórki. Brak depolaryzacji wpływa także negatywnie na ekspresję Co1Q.