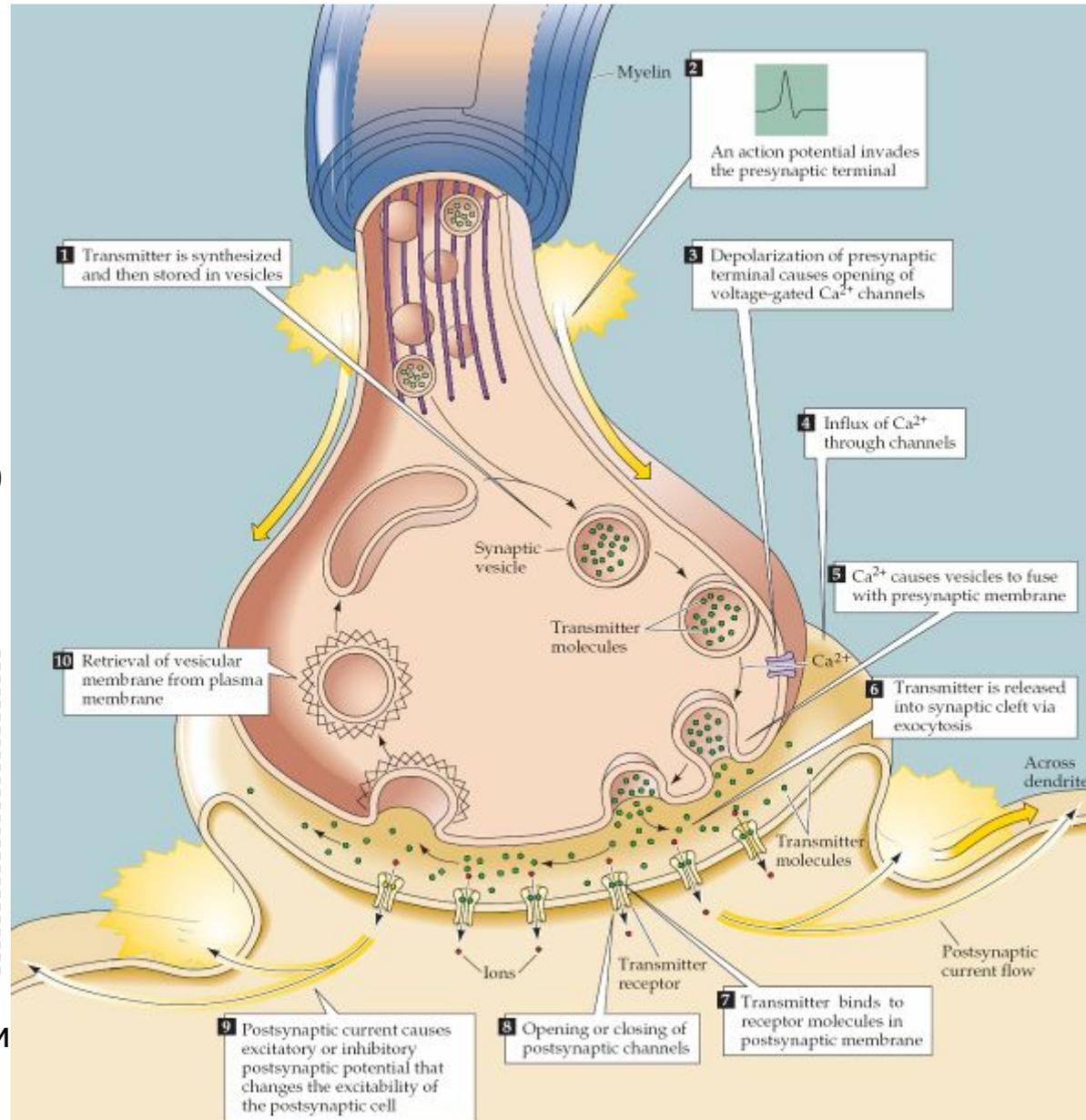


Последовательность событий в химическом синапсе после активации пресинаптического окончания

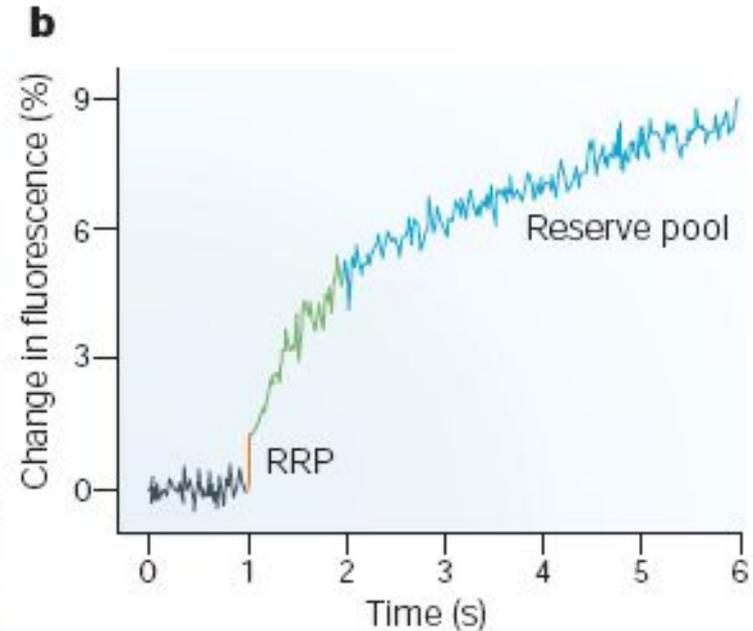
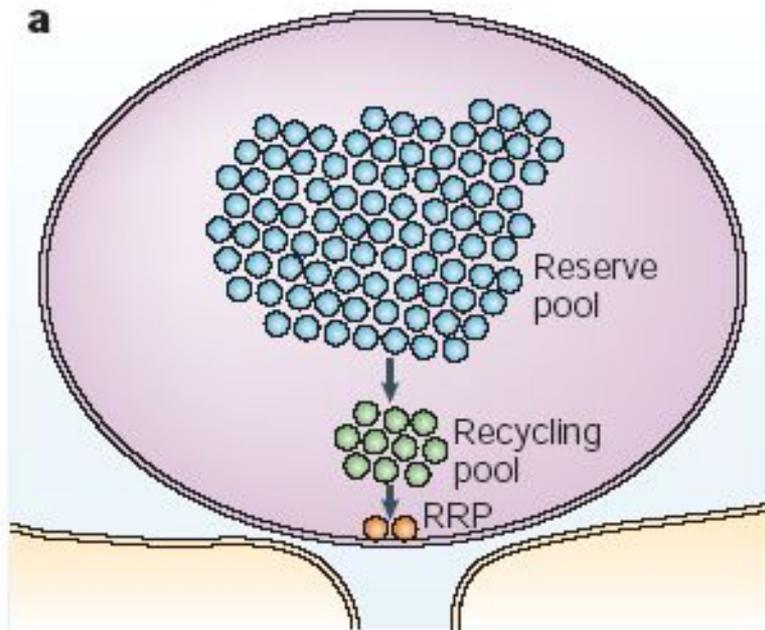
1. Подготовка везикул к экзоцитозу
2. Деполяризация в результате прихода ПД
3. Открытие Ca^{2+} -каналов
4. Увеличение концентрации Ca^{2+} до 10-100 мкМ (50-300 нМ в покое)
5. Запуск экзоцитоза - слияние везикулы с мембраной (через 60 мкс после 4)
6. Выделение медиатора в синаптическую щель
7. Связывание медиатора в рецепторами
8. Открытие (иногда закрытие) ионных каналов
9. Генерация (или прекращение) ионных токов (через 150 мкс после 2)
10. Рециклирование (возвращение) везикул в цитоплазму терминали



Стадии экзоцитоза медиатора из синаптических везикул

- **Транспорт (мобилизация**, англ., *trafficking*) вновь синтезированных везикул из перикариона в синапс осуществляется посредством anterograde транспорта.
- В пресинаптической терминали формируются **функциональные субпопуляции** (пулы) везикул:
 1. **Неподготовленные** (англ., *unprimed*) (их называют также **рециклированные**, англ., *recycling*) - большая популяция везикул, которые находятся в пространстве терминали и пополняют резервный пул (2). Этот пул формирует депо и может быть задействован во время периода массивной стимуляции или при нарушении процессов восстановления и рециклирования везикул.
 2. **Резервные** (англ., *reserve*) – популяция везикул, которые не полностью готовы к высвобождению медиатора, но могут быстро пополнить пул 3.
 3. **Готовые** к высвобождению медиатора (англ., *readily releasable*) – те везикулы, которые полностью пристыкованы к плазматической мембране и готовы для быстрого Ca^{2+} -зависимого высвобождения медиатора. Этот пул включает относительно небольшое число везикул.

Функциональные субпопуляции (пулы) синаптических везикул



Three vesicle pools

a) The classic three-pool model. The reserve pool makes up ~80–90% of the total pool, and the recycling pool is significantly smaller (~10–15%). The readily releasable pool (RRP) consists of a few vesicles (~1%) that seem to be docked and primed for release.

b) Three kinetic components of release (indicating release of three vesicle pools) on depolarization of goldfish bipolar cells. The cell was stimulated in the presence of the styryl dye FM 1-43, and the increase in fluorescence gives a direct measure of exocytosis.

Table 1 | **Characteristics of the vesicle pools**

Pool	Readily releasable pool (RRP)	Recycling pool	Reserve pool
Size (% of all vesicles)	~1–2%	~10–20%	~80–90%
Location	Docked	Scattered	Scattered (bulk of vesicle cluster)
Released within	<1 second	A few seconds	Tens of seconds, minutes
Recycling	Fast (seconds)	Fast (seconds)	Slow (minutes)
Mixing with other pools	Fast mixing with recycling vesicles	Slow mixing with reserve	Slow mixing with other vesicles
Mobility in resting terminals	None — docked	High	Low (high in bipolar cells)

Стадии экзоцитоза медиатора из синаптических везикул

- Специальный **процесс контроля** (англ., **targeting**) с участием малых G-белков *rab*-семейства, обеспечивающий соответствие везикулы данному синапсу и последующее ее «правильное» (эффективное) слияние с областью освобождения медиатора на мембране.
- Те везикулы, которые предназначены для слияния с пресинаптической мембраной активных зон, должны быть определенным образом позиционированы на ней. С участием нитей цитоскелета и *rab*-белков везикула «**привязывается**» (англ., **tethering**) к пресинаптической мембране. При этом везикула прикрепляется к мембране на расстоянии более, чем половина ее диаметра (более 25 нм). В этом процессе вовлекаются специальные белки **синапсины**.

Стадии экзоцитоза медиатора из синаптических везикул

- **Стыковка** (англ., *docking*) везикулы с местом освобождения медиатора в активной зоне происходит после процесса «привязывания» и представляет собой более стабильный тесный контакт везикулы с пресинаптической мембраной. Полностью пристыкованная везикула удерживается на расстоянии 5-10 нм от мембраны.
- **Подготовка** (*прайминг*, англ., *priming*) везикулы к экзоцитозу заключается в молекулярных перестройках белкового комплекса экзоцитоза, который приобретает свойство высокой чувствительности к Ca^{2+} и готовность к слиянию с пресинаптической мембраной.
- **Запуск** экзоцитоза (англ., *triggering*) происходит в результате активации белка **синаптогамина** (см. далее) входящим потоком Ca^{2+} . Этот белок взаимодействует с липидами мембран везикулы и пресинаптической терминали и инициирует их слияние.

Стадии экзоцитоза медиатора из синаптических везикул

- **Слияние** (англ., *fusion*) мембран является определяющей фазой регулируемого экзоцитоза.
- При этом происходит локальное слияние **билипидных слоев** мембран клетки и везикулы в ограниченном и высоко специализированном **домене активной зоны**.
- При этом мембрана везикулы становится единым целым с мембраной клетки, и только активный механизм восстановления может вновь сформировать везикулу и вернуть ее в следующий цикл экзоцитоза.

Альтернативный способ выделения медиатора из синаптических везикул

- Существует альтернативная форма тесного слияния везикулы с мембраной клетки и ее рециклирования, при котором не происходит полного слияния мембран.
- Такой способ выделения медиатора в англоязычной литературе называют «*kiss and run*» («*поцеловал и убежал*»), при котором происходит только частичное выделение содержимого везикулы через кратковременно формируемую пору, называемой «мерцающей».
- Считается, что способ «*поцеловал и убежал*» представляет собой особую форму высвобождения медиатора при синаптической активации, когда требуется быстрый круговорот везикул, например, в центральных синапсах, где медиатор выбрасывается из небольшого числа пузырьков, но с высокой частотой.

Стадии экзоцитоза медиатора из синаптических везикул

- **Восстановление** (англ., *retrieval*), или так называемое **рециклирование** (англ., *recycling*) везикул происходит по механизму **эндоцитоза**.
- При этом происходит формирование вокруг везикулы клатриновой оболочки, образованной специальным белком **клатрином**.
- Отщепление мембраны пузырька от пресинаптической мембраны происходит с участием белка **динамина** и **Ca²⁺-зависимой ГТФазы**.

Предполагают две схемы рециклирования везикул:

- 1) прямое образование новых пузырьков после **деградации клатриновой оболочки** и
- 2) прохождение специального **эндосомального процесса**, в котором из мембран пресинаптических эндосом образуются новые везикулы.

Процесс рециклирования везикул происходит в течение 30-60 с, однако может происходить и быстрее.

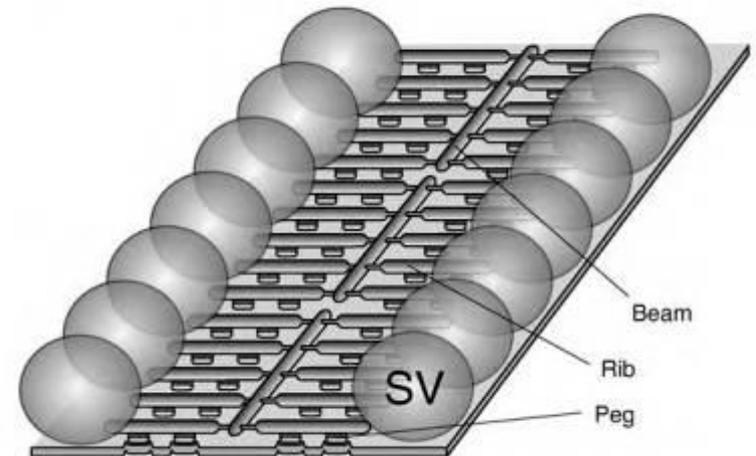
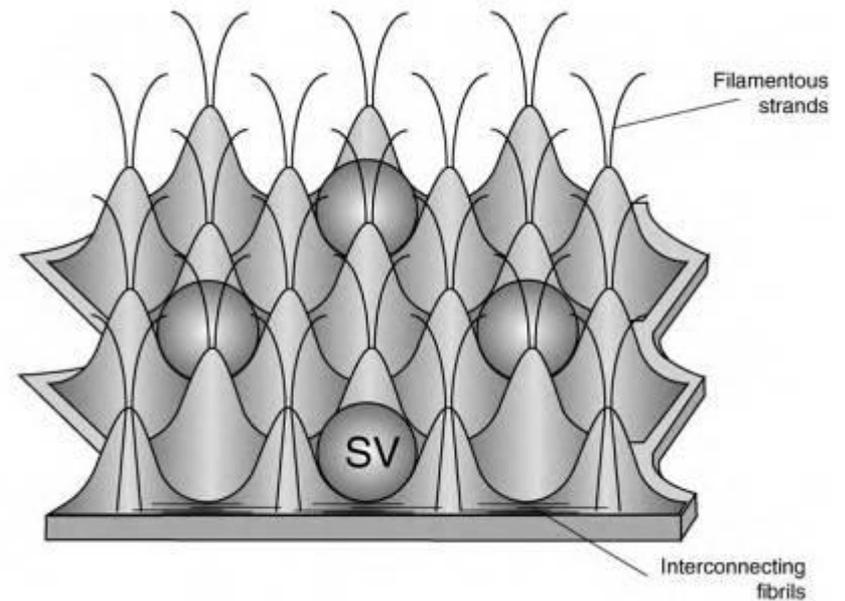
Морфо-функциональная организация активных зон

Методом электронно-микроскопической томографии на мембранах активных зон выявлена электронно-плотная упорядоченная **решетка цитоматрикса** из частиц конической формы, выдающихся в цитоплазму на 50 нм.

Из вершин конусов частиц в цитоплазму выдаются **филаментные стержни** длиной около 100 нм.

Элементы активной зоны образуют упорядоченную ультраструктуру, состоящую из своеобразных «**стрешней**» (*peg*), «**ребер**» (*rib*) и «**пучков**» (*beam*).

SV – *synaptic vesicles*

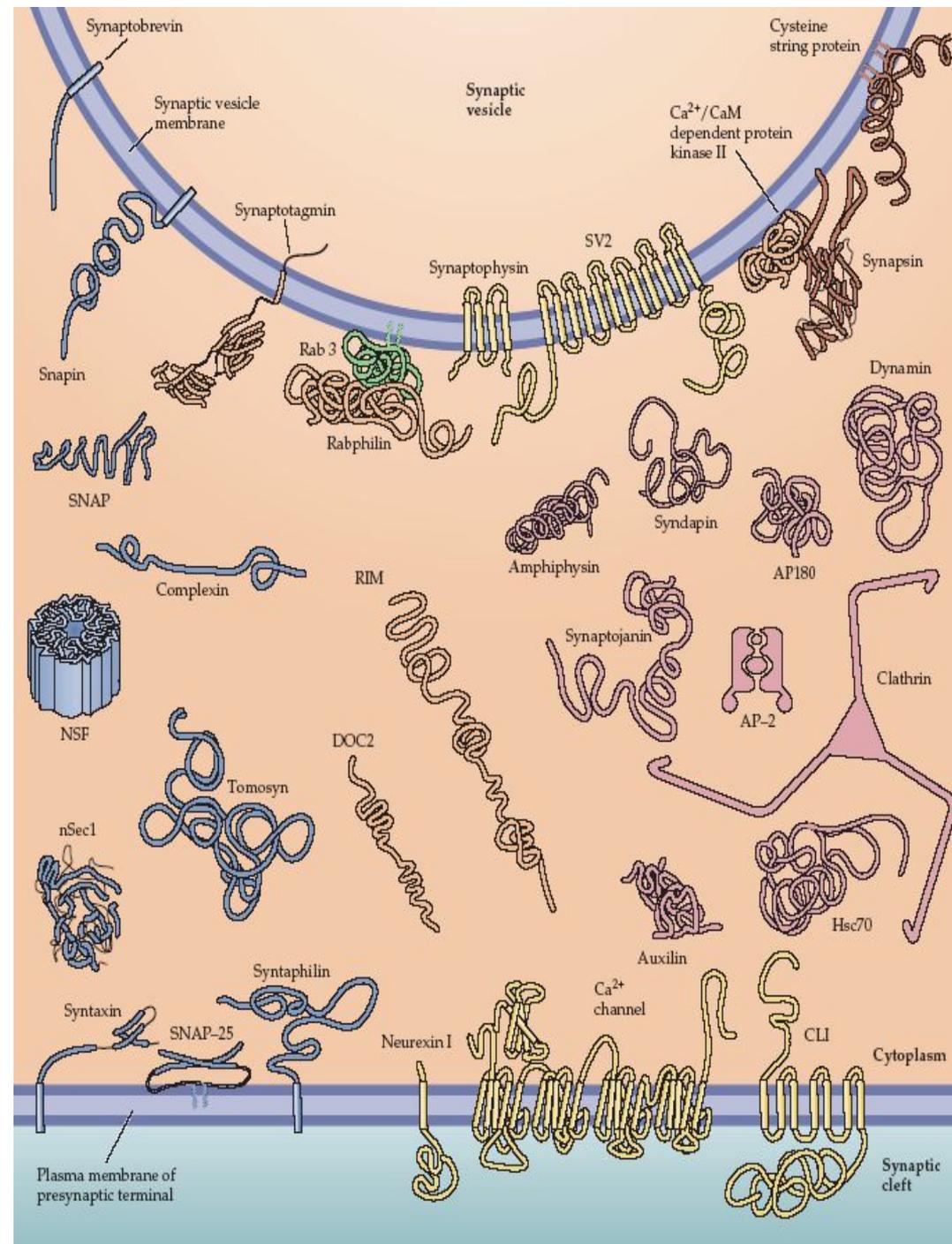


Морфо-функциональная организация активных зон

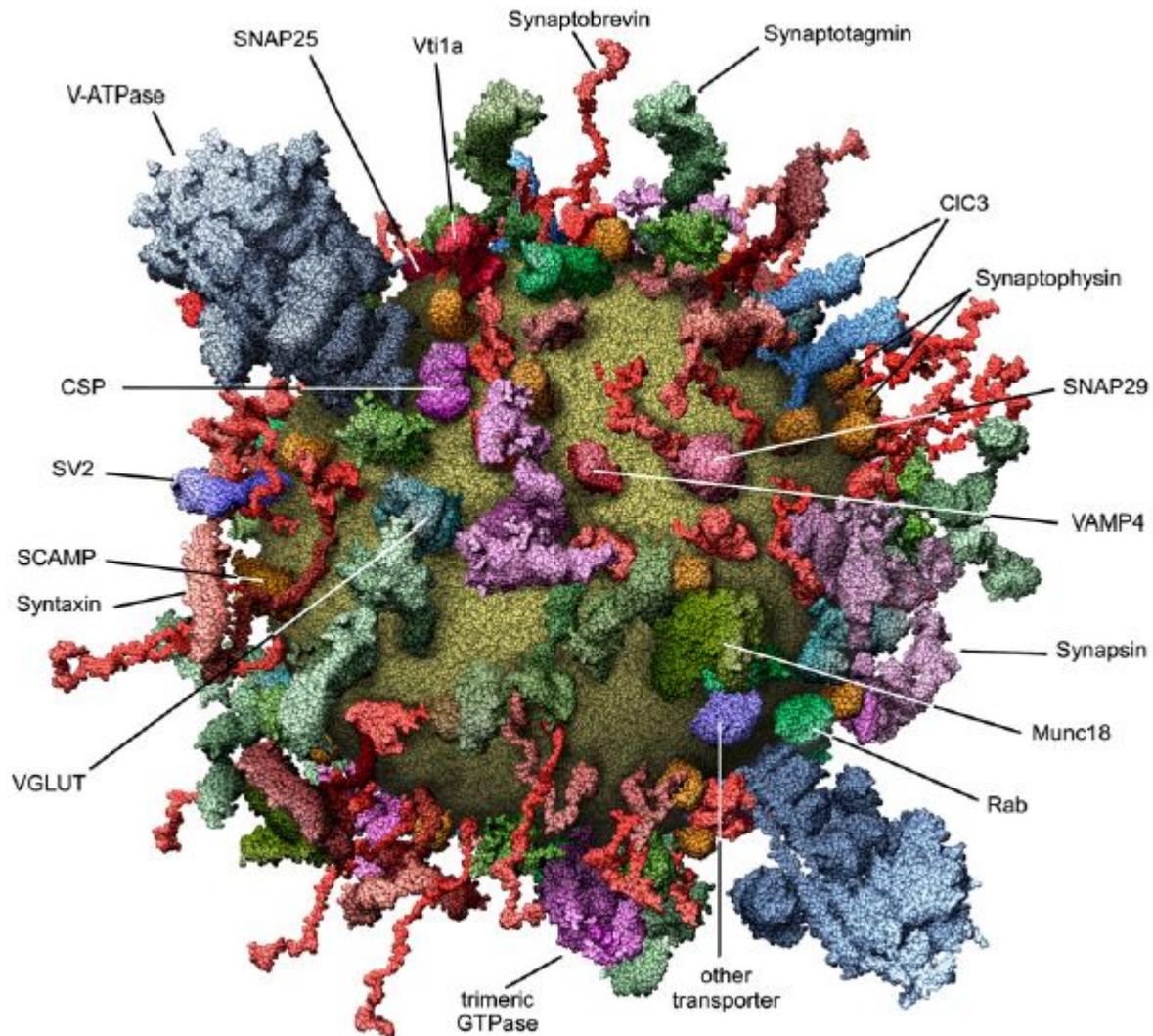
Плазматическая мембрана активных зон включает:

- ионные каналы,
- рецепторные белки,
- специальные клеточные молекулы, необходимые для адгезии и выравнивания пре- и постсинаптических мембран.
- Потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (N- и P/Q-типа) обеспечивают поток Ca^{2+} в цитоплазму в ответ на ПД.
- Клеточные молекулы адгезии представлены *иммуноглобулинами*, *интегринами* и *кадхеринами*. Специфическими молекулами адгезии в мембранах активных зон являются α - и β -нейрексины. β -нейрексины формируют асимметричные контакты с постсинаптическими *нейролигинами*, α -нейрексины связаны с Ca^{2+} -каналами.
- Внутри активной зоны локализован также ряд различных рецепторных белков, включая *метаботропные рецепторы*.
- Активная зона и постсинаптическое уплотнение окружены лентой из белкового *кадхерин/ β -катенин комплекса*.
- Цитоматрикс активных зон включает несколько *специфических белков*, задействованных в процессы экзоцитоза и эндоцитоза синаптических везикул.

Функциональные молекулы мембран синаптических везикул и пресинаптической терминали, вовлеченные в процесс экзоцитоза



Функциональные молекулы мембран синаптических везикул и пресинаптической терминали, вовлеченные в процесс экзоцитоза

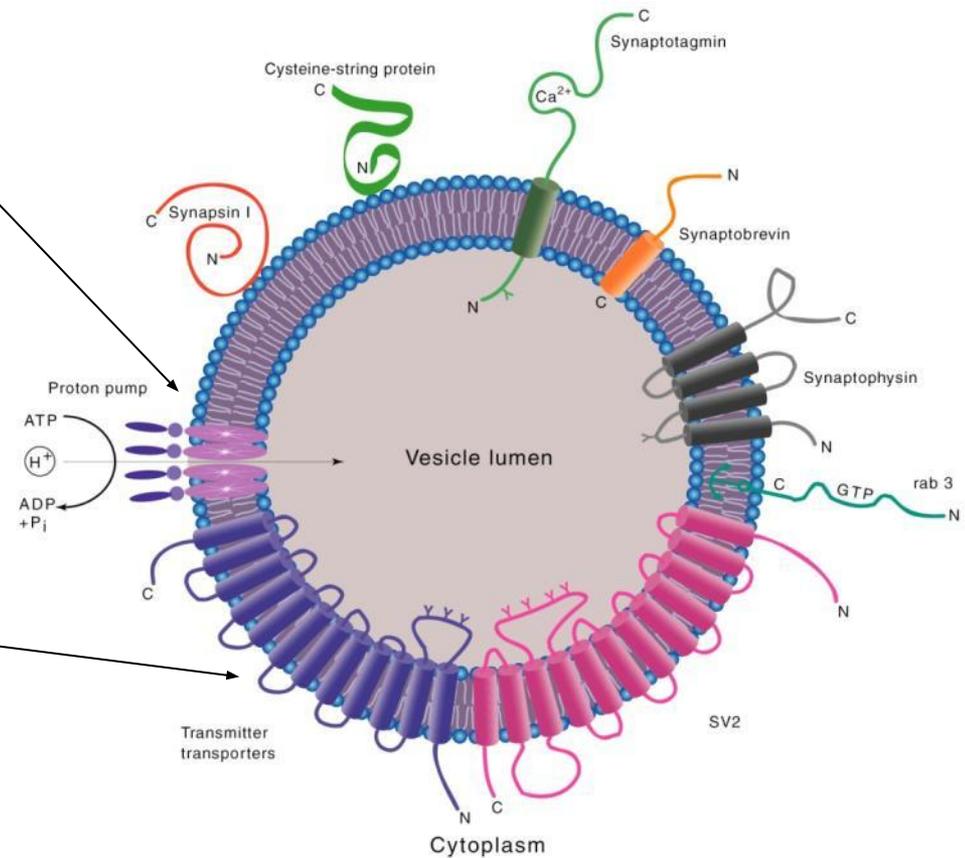


Функциональные молекулы мембраны синаптических везикул, вовлеченные в процесс экзоцитоза

Протонный насос H^+ -АТФаза V-типа переносит внутрь везикул H^+ , поддерживая в них низкий уровень pH.

Протонный градиент, направленный из синаптических везикул в цитоплазму, используется для транспорта молекул медиаторов внутрь везикул.

Транспортеры медиаторов используют энергию электрохимического градиента протонов.

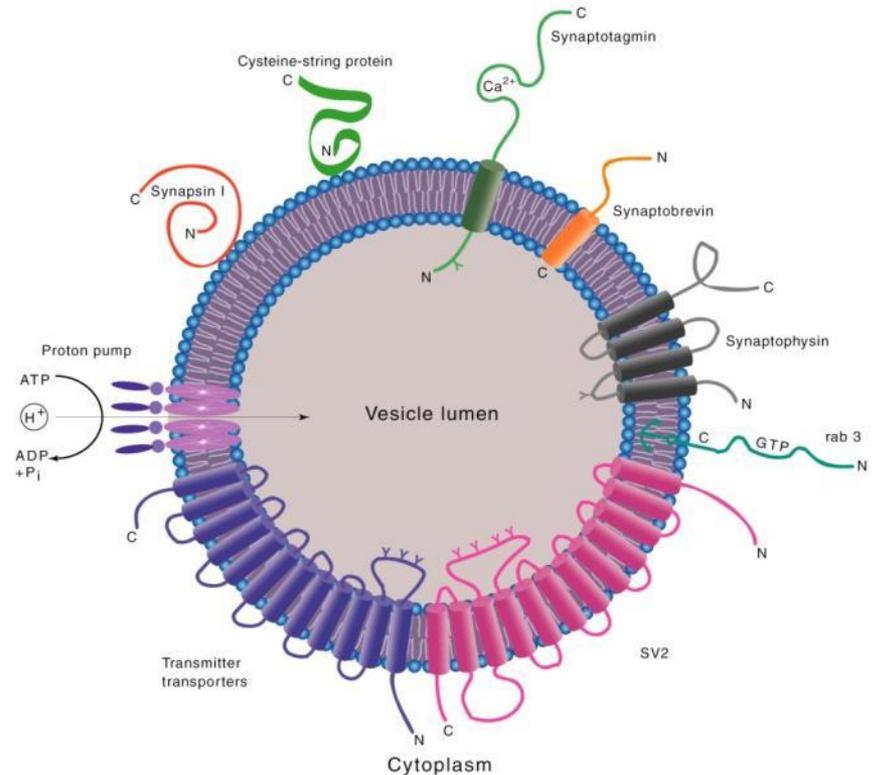


Функциональные молекулы мембраны синаптических везикул, вовлеченные в процесс экзоцитоза

Синаптические **SNARE белки** и **SNARE комплексы** (англ., *Soluble Nsf Attachment protein REceptor*) СВЯЗЫВАЮТ *N-ethylmaleimide Sensitive Factor (NSF)*.

Nsf - это белок, демонстрирующий свойство АТФазы и взаимодействующий со SNARE белками.

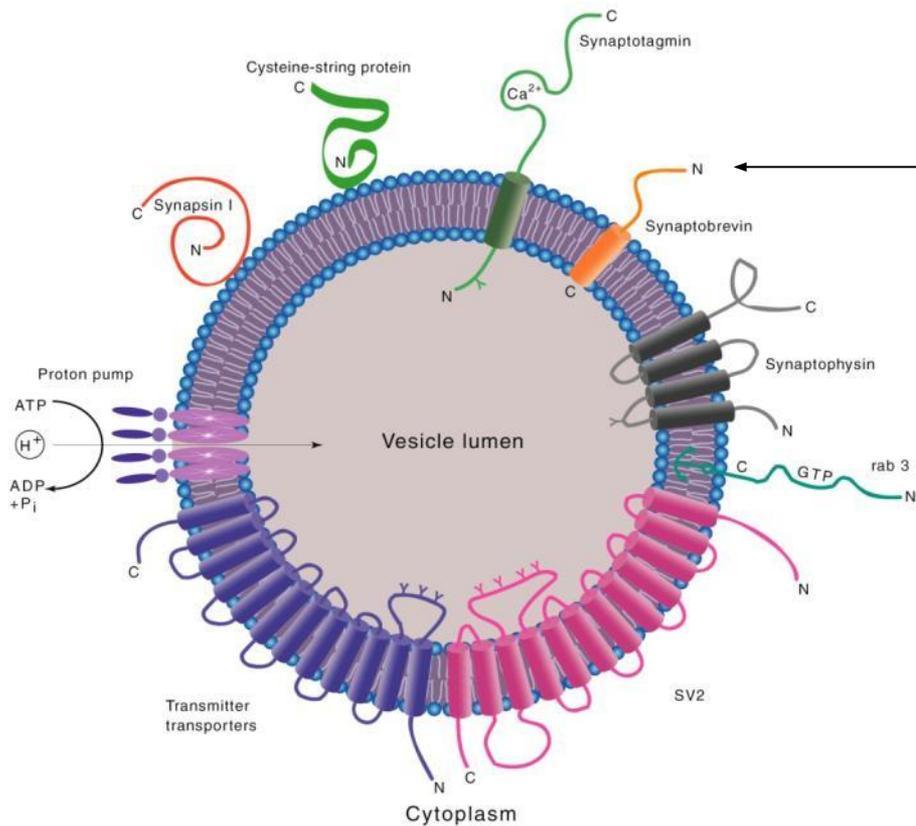
Слияние везикулы с пресинаптической мембраной приводит к образованию **транс SNARE комплексов**, которые обеспечивают стыковку везикул с пресинаптической мембраной, притягивая мембраны друг к другу.



Функциональные молекулы мембраны синаптических везикул, вовлеченные в процесс экзоцитоза

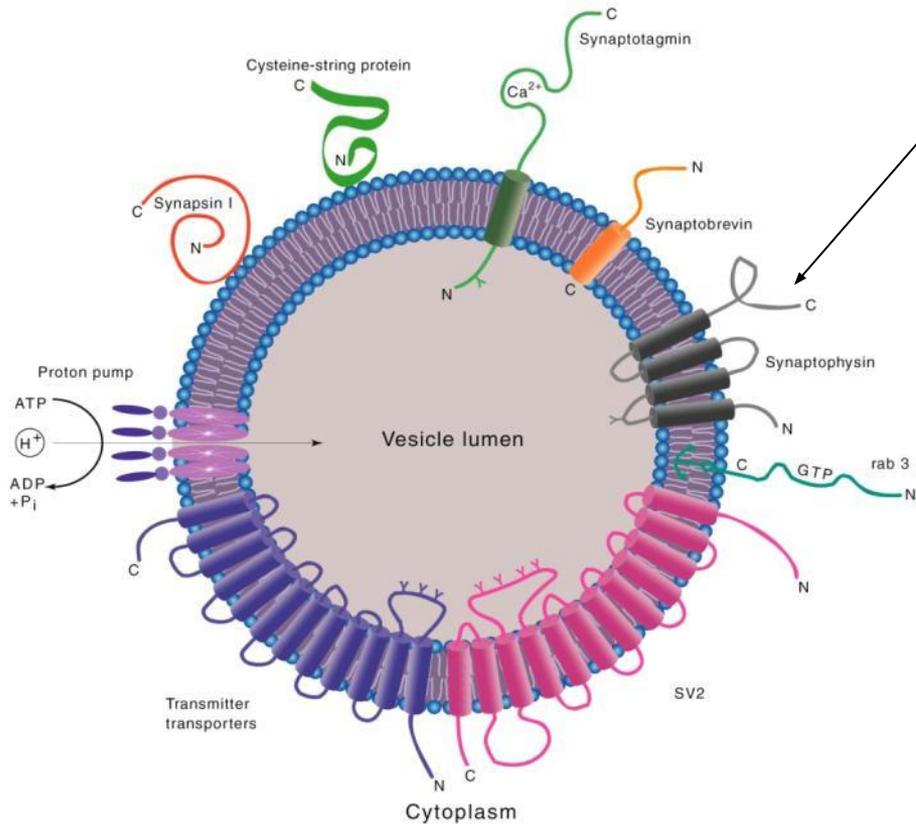
SNARE комплексы образованы тремя белками:

- везикулярный белок **синаптобревин**
- два белка плазматической мембраны - **синтаксин** и **SNAP-25**.



- Белок **rab3** участвует в процессе контроля (англ., *targeting*).

Функциональные молекулы мембраны синаптических везикул, вовлеченные в процесс экзоцитоза

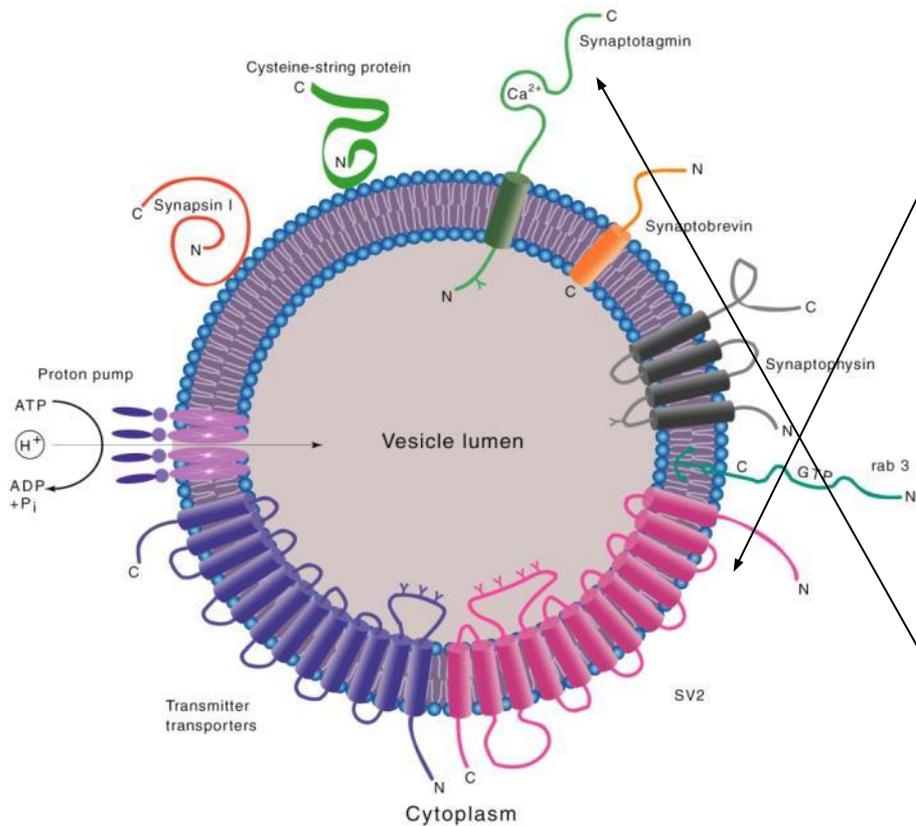


Синаптофизин связывается с холестерином и вовлечен в индукцию формирования изгиба мембраны везикулы во время ее образования.

Синаптофизин образует комплекс с синаптовревином и протонной помпой.

Взаимодействуя с синаптовревином, синаптофизин препятствует его включению в функциональный **SNARE комплекс**, обеспечивая регуляцию экзоцитоза везикул.

Функциональные молекулы мембраны синаптических везикул, вовлеченные в процесс экзоцитоза



Отсутствие **SV2** приводит к аномальной высокой концентрации цитоплазматического Ca²⁺.

Предполагается, что **SV2** транспортирует Ca²⁺ внутрь везикул, уменьшая вероятность экзоцитоза, чтобы сбалансировать эффект высокой синаптической активности нервной терминали.

Домен N-терминали **SV2** взаимодействует с Ca²⁺-сенсором мембраны везикулы Ca²⁺-связывающим белком **синаптотагмином**, регулируя его активность

Функциональные молекулы мембраны синаптических везикул, вовлеченные в процесс экзоцитоза

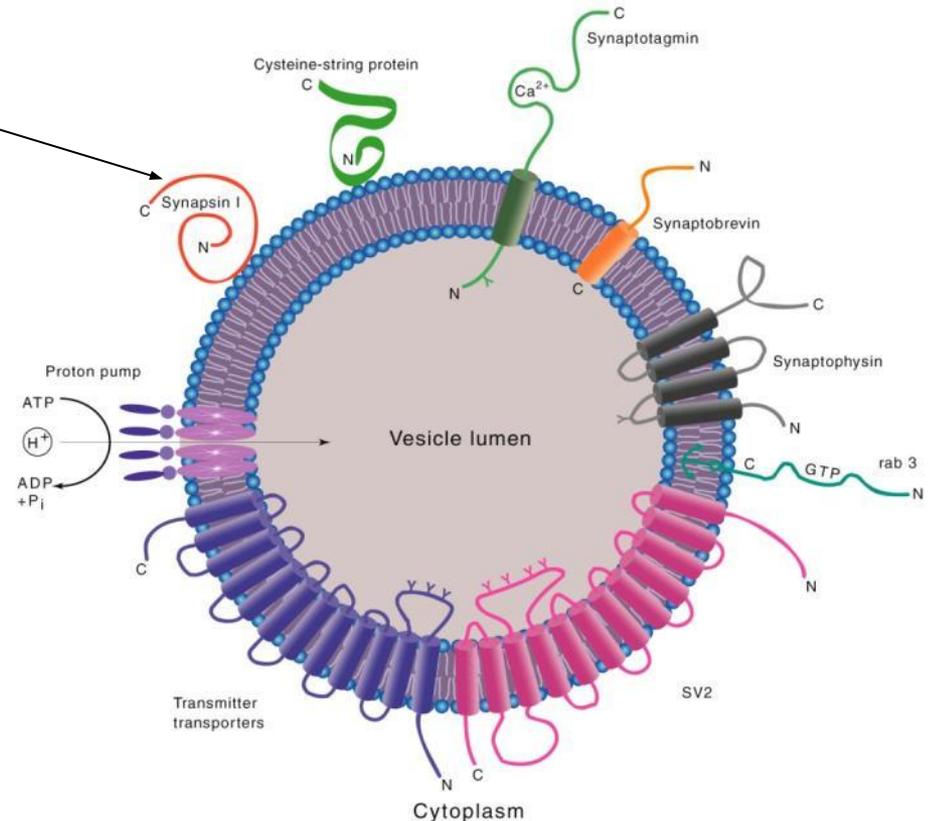
Синапсины связаны с липидами и белками мембраны.

Они взаимодействуют с белками цитоскелета. Это взаимодействие регулируется их фосфорилированием.

Предполагается, что синапсины «привязывают» везикулы к нитям цитоскелета, удерживая их в резервном пуле.

Синаптическая активность приводит к фосфорилированию синапсинов, в результате чего везикулы освобождаются от нитей цитоскелета, удерживающих их в резервном пуле.

Это приводит к мобилизации и миграции везикул к плазматической мембране, где они потенциально готовы к экзоцитозу.

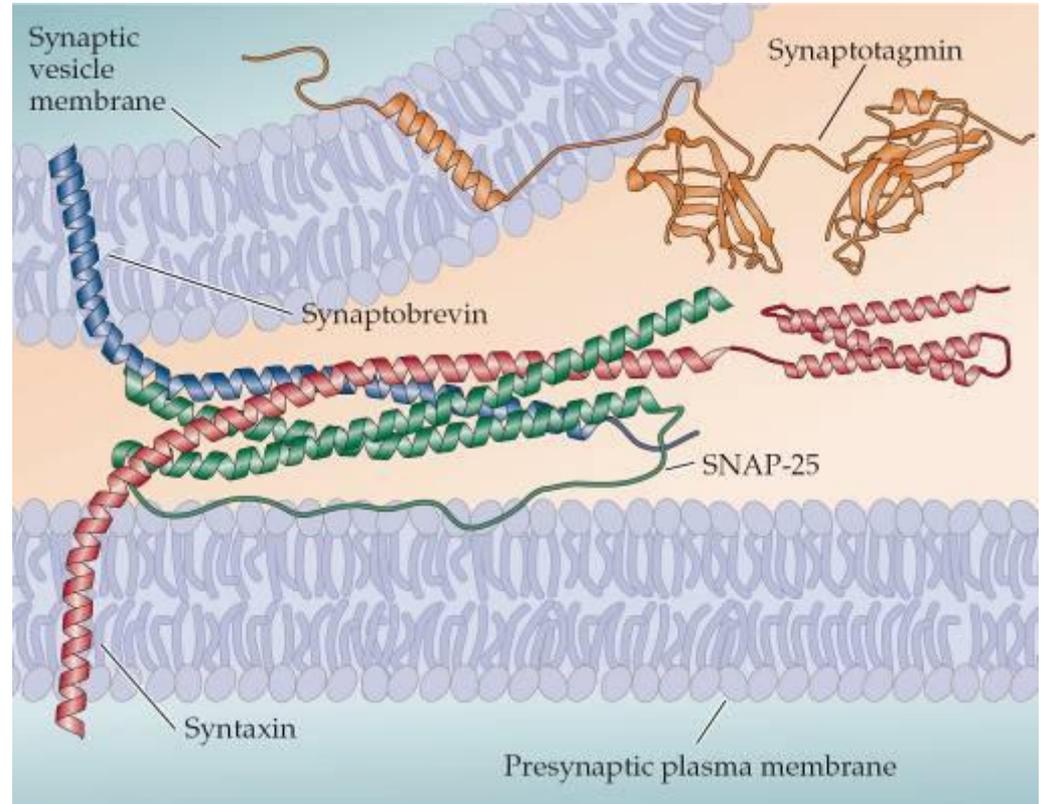


Функциональные молекулы мембраны пресинаптической терминали, вовлеченные в процесс экзоцитоза

Структура SNARE комплекса

Везикулярный SNARE белок **синаптобревин** формирует спиралевидный комплекс с белками плазматической мембраны **синтаксином** и **SNAP-25**.

Ca^{2+} -связывающий белок **синаптотагмин** выполняет роль Ca^{2+} -сенсора мембраны.

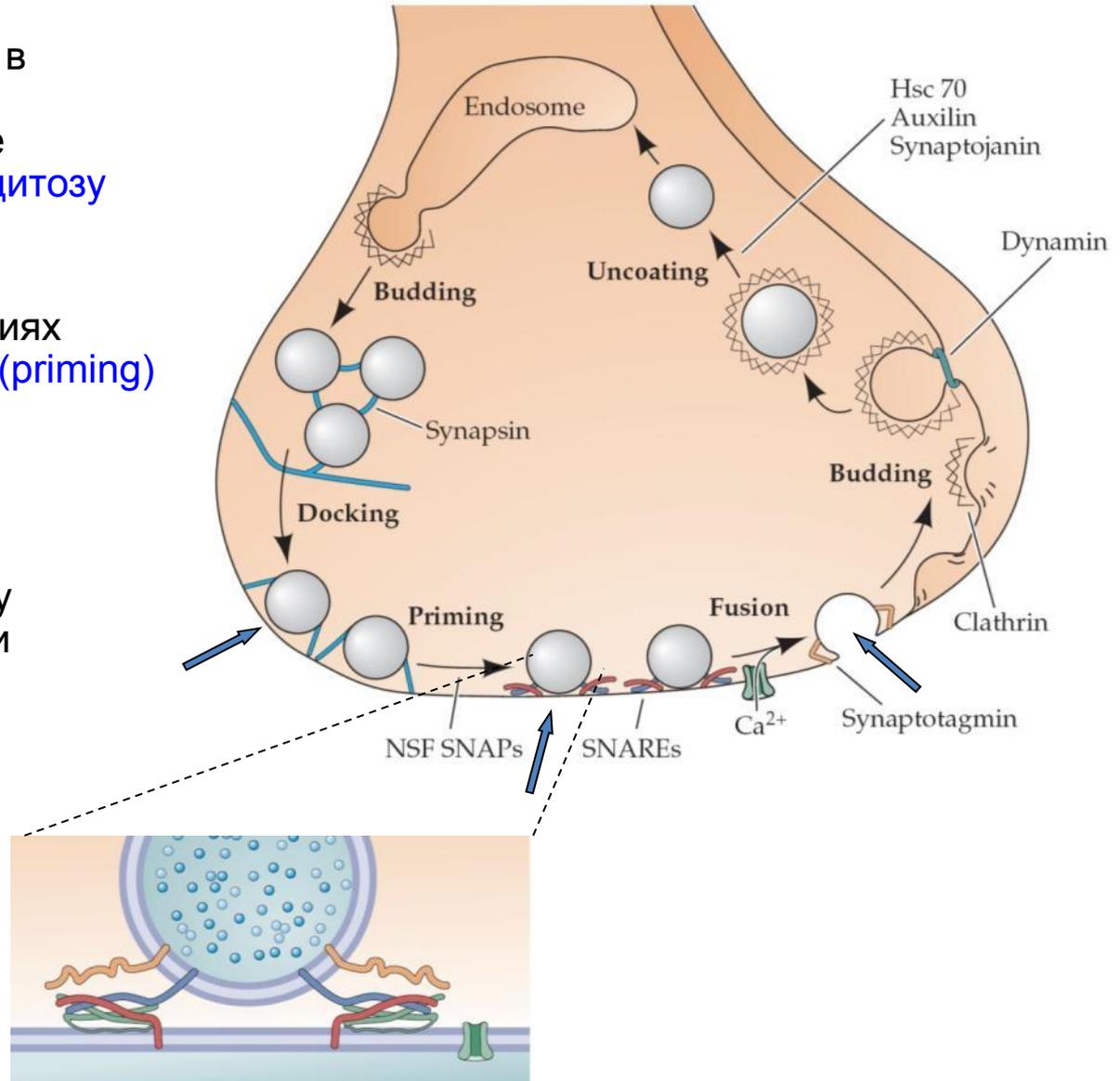


Молекулярный механизм экзоцитоза медиатора

При деполяризации мембраны в первую очередь освобождают медиатор те везикулы, которые формируют пул **ГОТОВЫХ К ЭКЗОЦИТОЗУ** везикул.

Эти везикулы находятся в стадиях **стыковки (docking)**, **подготовки (priming)** и **слияния (fusion)** (отмечено стрелками).

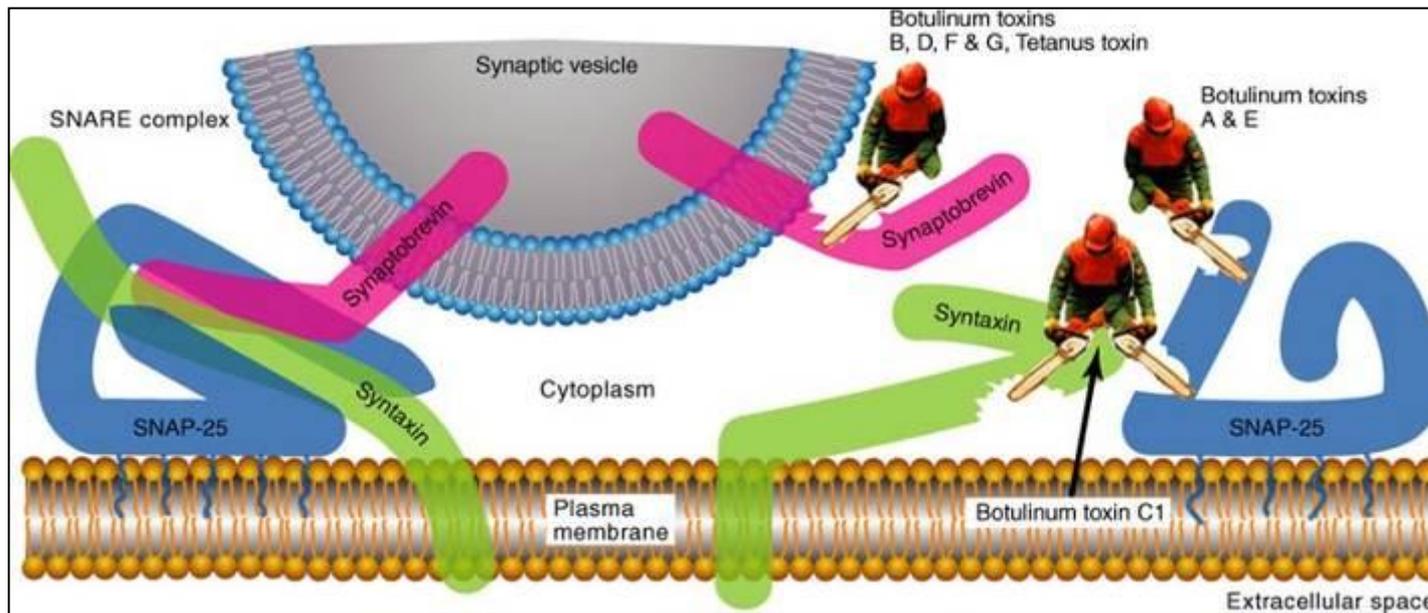
SNARE комплекс в «активной» композиции приводит к тесному присоединению **везикулярной** и **плазматической мембран**, что необходимо для их слияния



Молекулярный механизм экзоцитоза медиатора

SNARE комплекс в «активной» композиции приводит к тесному присоединению **везикулярной** и **плазматической мембран**, что необходимо для их слияния.

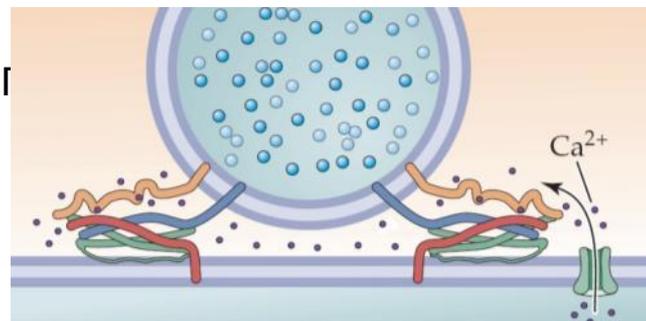
Важным доказательством этого является открытие **семи ботулинистических токсинов (A-G)**, которые в разных местах разрушают спиралевидные контакты между **белками SNARE комплекса**, блокируя синаптическое выделение медиатора.



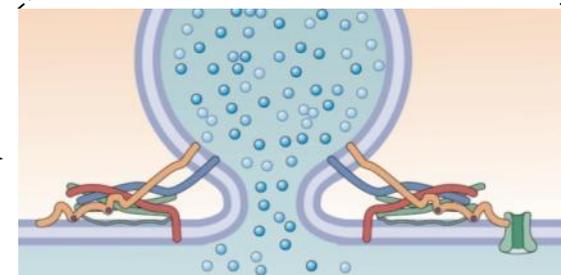
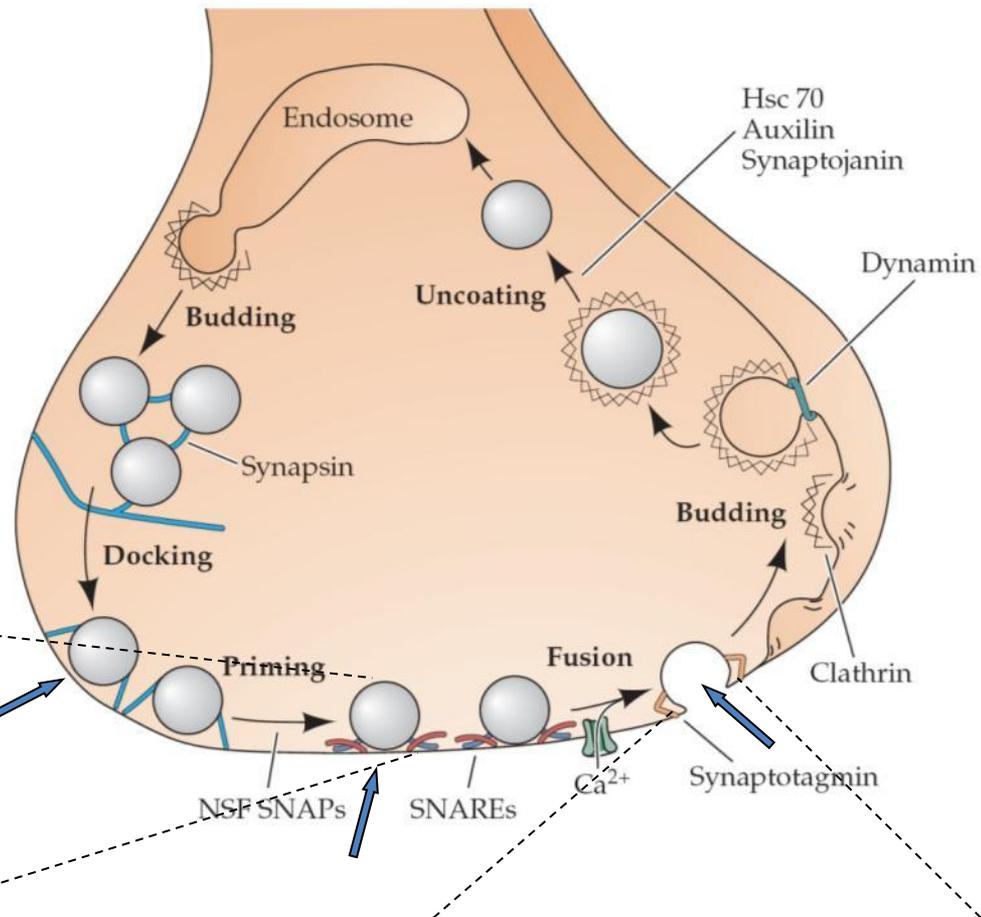
Молекулярный механизм экзоцитоза медиатора

Синаптотагмин является ключевым Ca^{2+} -сенсором и связывает Ca^{2+} , что необходимо для запуска слияния везикул с мембраной терминали.

При связывании с Ca^{2+} **синаптотагмин** встраивается своей цитоплазматической частью в плазматическую мембрану и связывается с **белками SNARE комплекса**.



мембран атора.



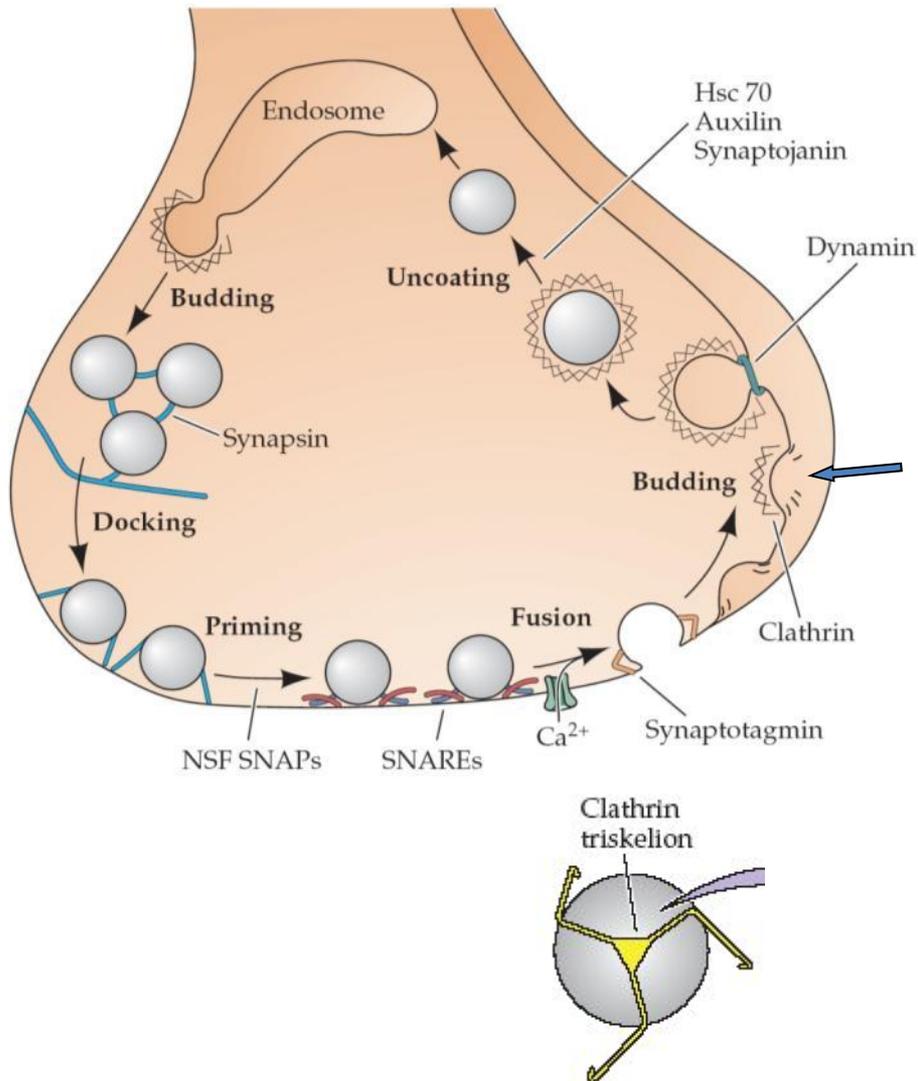
Молекулярный механизм экзоцитоза медиатора

Клатрин захватывает «пустую» везикулу, «отпочковывая» ее от плазматической мембраны.

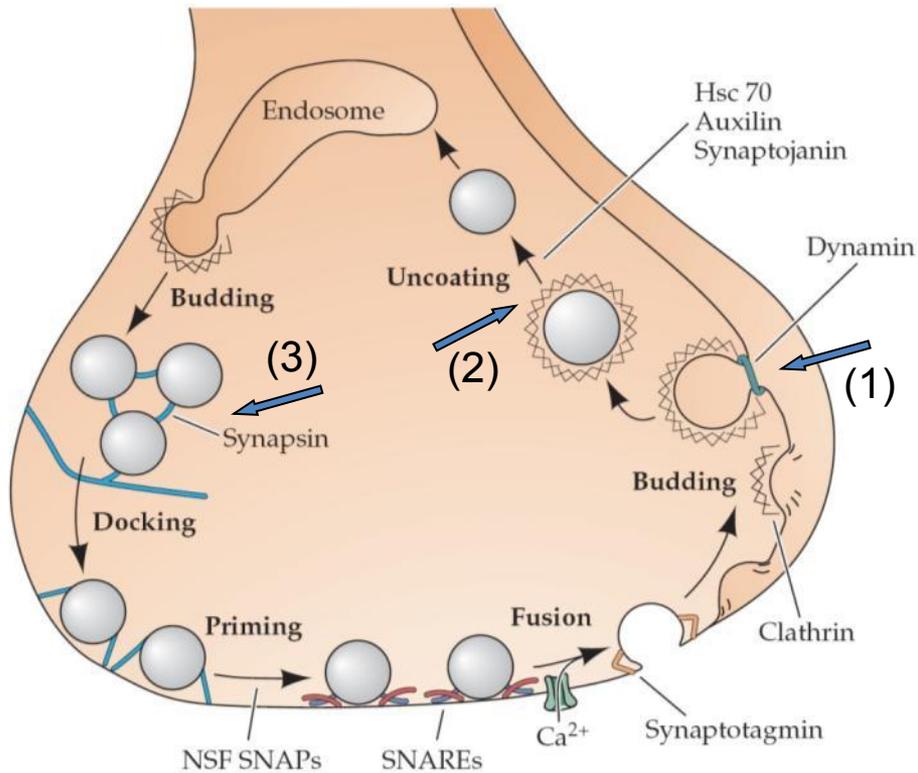
Молекулы **клатрина** формируют структуру, похожую на геодезический колпак.

Эти структуры формируют «одетую» этим белком выпуклость мембраны (со стороны цитоплазмы), что инициирует дальнейшее захватывание везикулы внутрь терминали.

Клатриновая оболочка при участии еще некоторых белков создает кривизну «захваченного» фрагмента мембраны и в конечном счете формирует полусферическое мембранное образование.



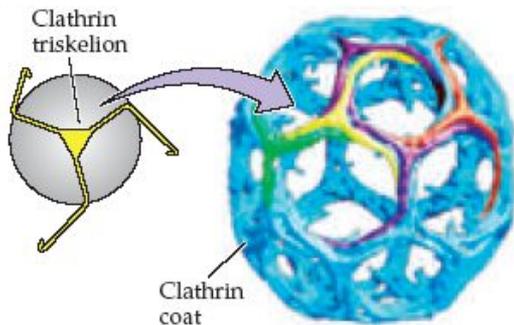
Молекулярный механизм экзоцитоза медиатора



(1) Другой белок **динамин** сдавливает края мембранной полусферы, замыкая ее в «одетый» **клатрином** пузырек.

(2) Затем **клатриновая оболочка** удаляется с участием АТФазы, транспортных агрегатных молекул (*Hsc70*), белка ауксиллина (*Auxilin*) и белка липидной фосфатазы (*Synaptojanin*).

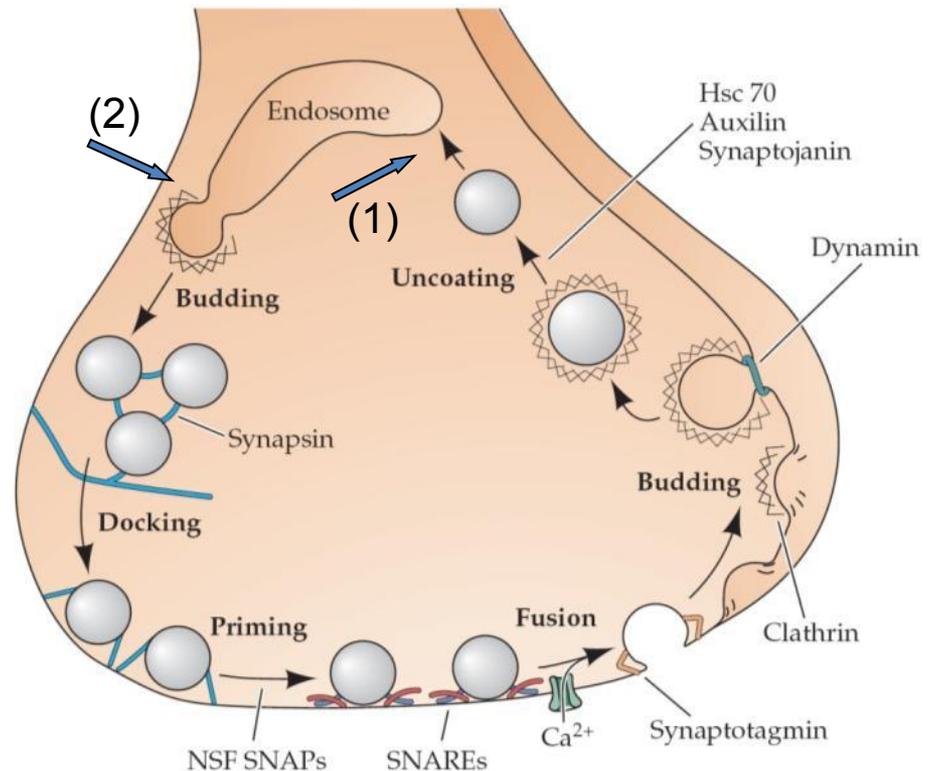
(3) **Синапсин** обратимо связывает везикулы с нитями цитоскелета и «привязывает» вновь образованные везикулы к цитоскелету, добавляя их в резервный пул.



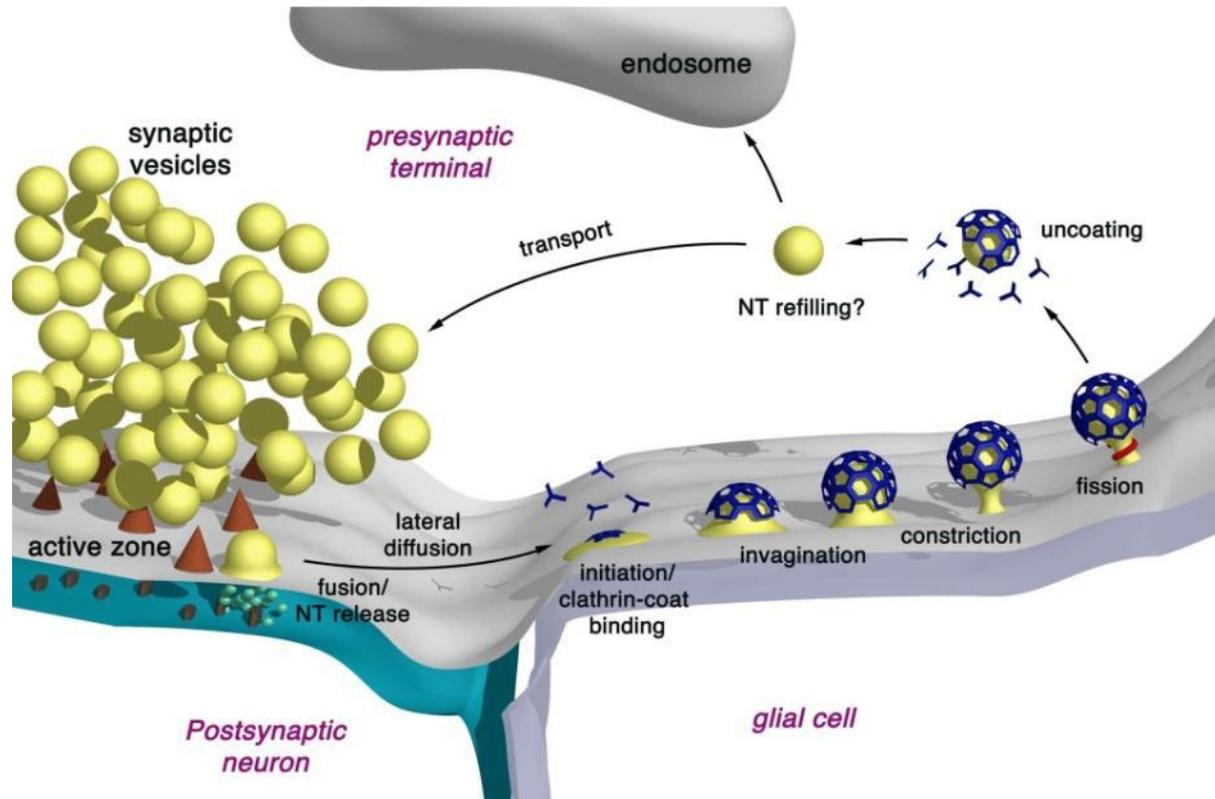
Молекулярный механизм экзоцитоза медиатора

(1) Вновь образованные везикулы могут сливаться с **внутриклеточными эндосомами** по механизму экзоцитоза.

(2) Образование новых везикул из эндосом, пополняющих резервный пул, происходит также как и отщепление везикул от плазматической мембраны после высвобождения медиатора (по механизму клатрин-зависимого эндоцитоза).



Model of clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis



Synaptic vesicles partially or completely fuse with the presynaptic membrane at the active zone and release neurotransmitter into the synaptic cleft. The membrane of the fused vesicles then diffuses laterally to the areas outside the active zone where it is retrieved by clathrin-mediated endocytosis. Clathrin-coated vesicle formation involves several morphologically distinct steps, from clathrin coat binding, invagination of the coated bud, constriction and fission of the pit 'neck' and the subsequent stripping of the clathrin coat from the newly formed vesicle. The vesicle is then either directly transported back to the cluster of synaptic vesicles or translocated to a primary endosomal compartment. During endocytosis and migration to the release site vesicles are refilled with transmitter (NT).

Альтернативный способ выделения медиатора из синаптических везикул

- При частичном выделении медиатора способом «поцеловал и убежал» не происходит полного слияния пресинаптической мембраны и везикулы.
- Везикулы быстро рециклируются с участием **динамина** без клатрин-зависимого эндоцитоза.
- После частичного и кратковременного выделения медиатора рециклированные везикулы остаются рядом с активной зоной и могут многократно использоваться в синаптической передаче.

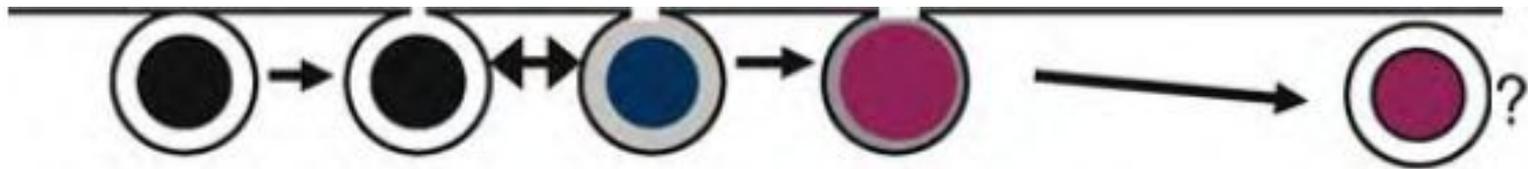


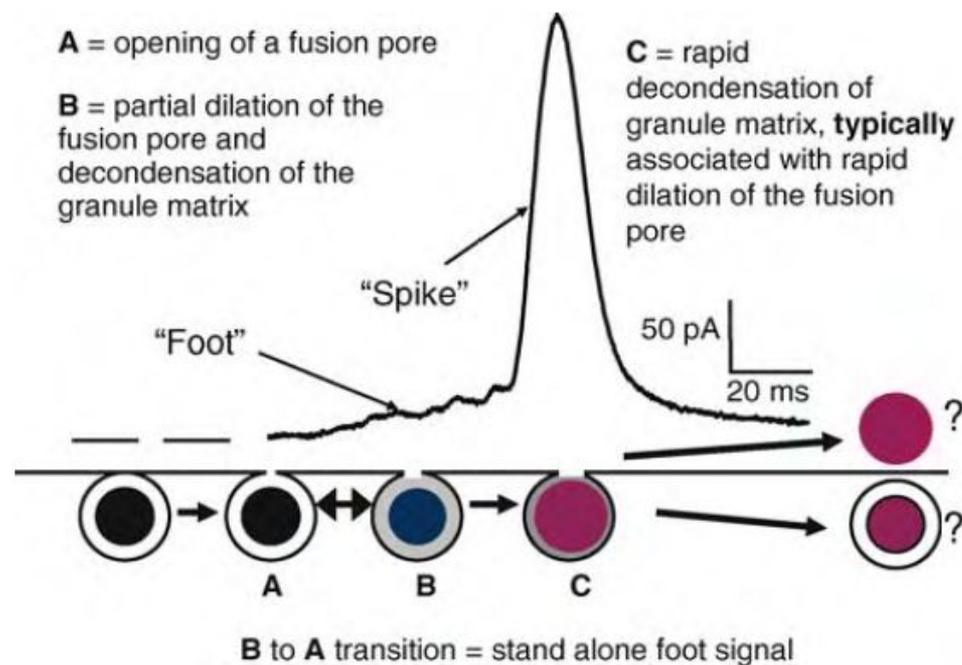
рисунок описан на следующем слайде

Альтернативный способ выделения медиатора из синаптических везикул

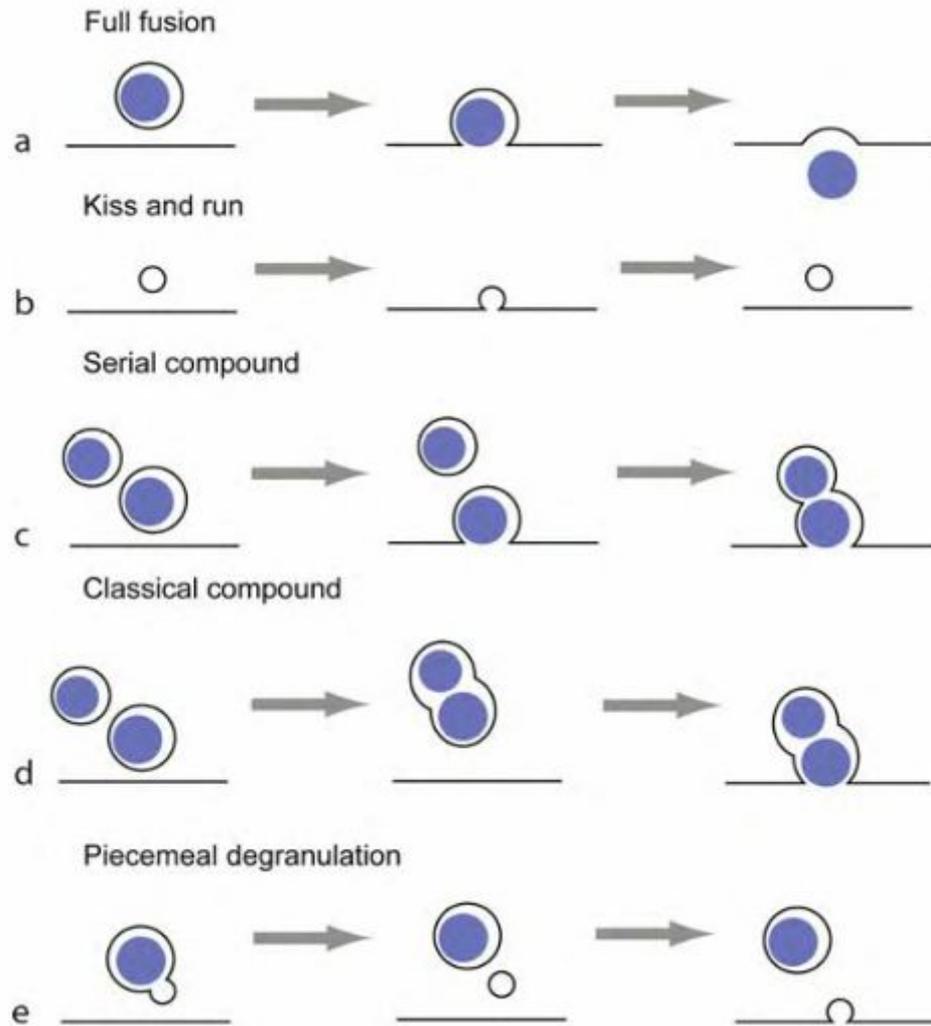
- Динамика тока, отражающего сложную кинетику высвобождения **катехоламина** из электронноплотной гранулы (везикулы) в хромаффинной клетке крысы. Полная кинетика высвобождения определяется сложным взаимодействием **поры** с компонентами цитоплазмы.

Описание рисунка в оригинале

- An amperometric signal showing the complex kinetics of catecholamine release from a large dense core granule (of a rat chromaffin cell). The overall release kinetics was determined by the complex interactions between the fusion pore and the gel matrix.



Разные формы экзоцитоза медиатора

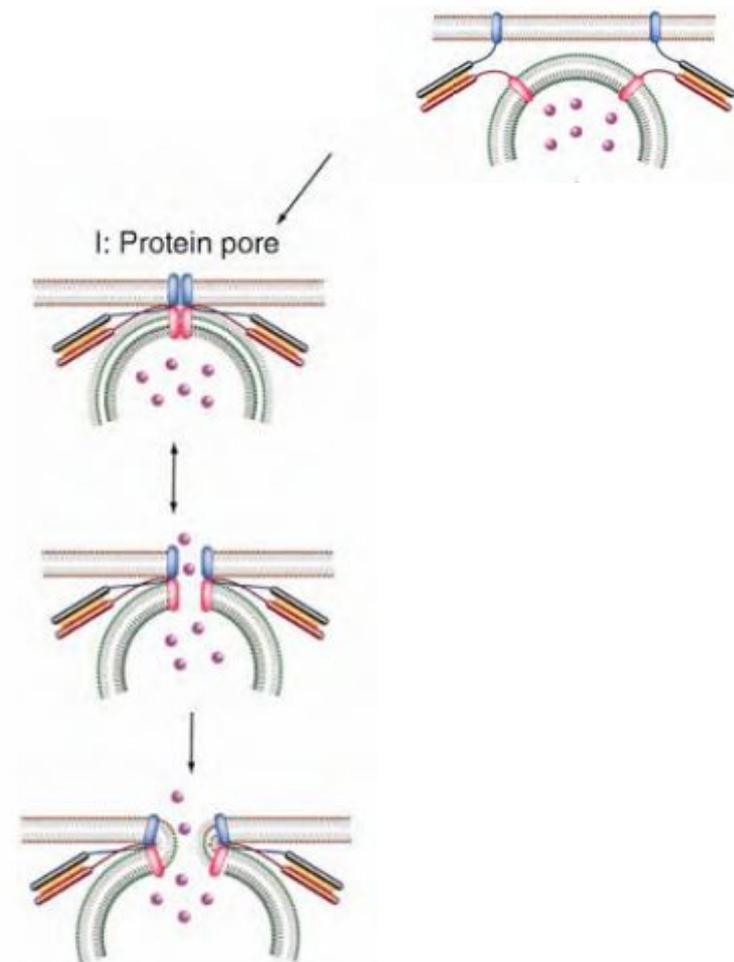


Несинаптическое выделение медиаторов по механизму экзоцитоза

Медиаторы могут выделяться из клеток и за пределами синаптической щели. При этом механизмы экзоцитоза могут варьировать. Такие вариации касаются особенностей мембранной поры, которую формируют везикула и плазматическая мембрана.

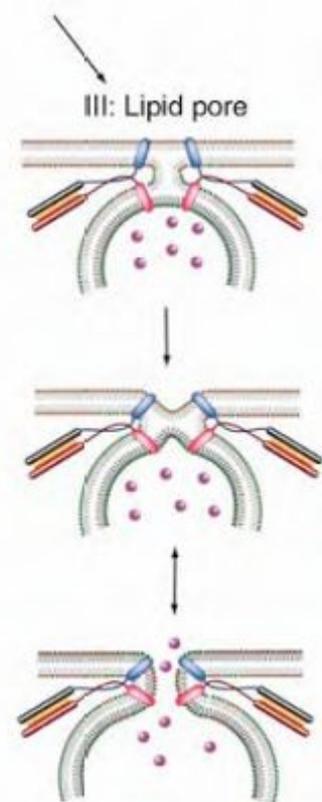
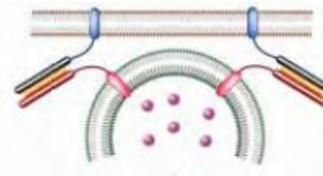
В настоящее время обсуждаются две модели строения поры при экзоцитозе.

1) Первая модель постулирует, что пора сходна со щелевым контактом и представляет собой кольцо из белкового комплекса, соединяющего просвет везикулы с внеклеточным пространством через отверстие с полностью белковыми стенками.



Несинаптическое выделение медиаторов по механизму экзоцитоза

2) Вторая модель постулирует, что кольцо из белкового комплекса сначала обеспечивает слияние липидных цитозольных листков мембран везикул и терминали. Затем сливаются другие мембранные монослои (внеклеточный листок плазматической мембраны и внутренний монослой везикулы). При этом стенки поры образованы полностью **липидными молекулами**.



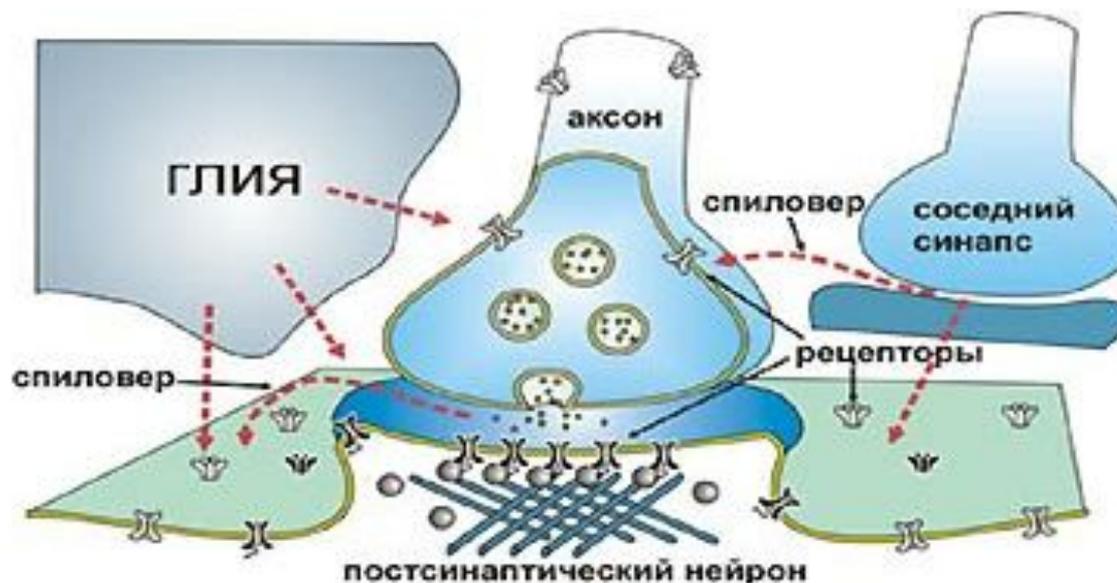
Для обеих моделей существование первичного белкового кольца исходит из предположения, что пора имеет радиальную симметрию, а белковый комплекс включает, вероятно, SNARE белки с некоторыми дополнительными ассоциированными белками.

Несинаптическая диффузная передача

В отличие от синаптической, **несинаптическая диффузная передача** в большей степени зависит от скорости диффузии медиатора в межклеточном пространстве.

Несинаптическая диффузная передача может изменять состояние большой группы нейронов, обладающих несинаптическими рецепторами, чувствительными к диффундирующему медиатору.

Несинаптические рецепторы для некоторых медиаторов обнаружены на мембранах различных частей нейрона. Диффузное распространение медиатора из синаптической щели на некоторое расстояние называют **спиловером** (англ., *spillover*, *spill* – разливаться, *over* - перелив).



Несинаптическая диффузная передача

Описано несколько **источников** сигнала диффузной несинаптической передачи.

Например, транспорт глутамата, ГАМК и глицина является **симметричным** и может происходить в **обоих направлениях**.

В зависимости от электрохимического градиента ионов, самих медиаторов и потенциала мембраны медиаторы могут либо поглощаться внутрь клетки, либо **высвобождаться во внеклеточное пространство**. Обратный направленный транспорт медиаторов обеспечивает увеличение их внеклеточной концентрации.

Кроме самих нейронов **глиальные клетки** также обладают механизмом высвобождения медиаторов посредством экзоцитоза.

Такой экзоцитоз является Ca^{2+} -зависимым процессом и может запускаться при активации глиальных рецепторов.

