

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

MAŁGORZATA SKUP

Zakład Neurofizjologii Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN Pasteura 3, 02-093 Warszawa e-mail: mskup@nencki.gov.pl

DENDRYTY TEŻ PRODUKUJĄ BIAŁKA: ROLA LOKALNEJ SYNTEZY W PLASTYCZNOŚCI POŁĄCZEŃ SYNAPTYCZNYCH

WPROWADZENIE

Neurony porozumiewają się za pomocą synaps. Na każdej komórce nerwowej są ich tysiące. To one łączą neurony w złożoną sieć, która przetwarza informacje docierające do układu nerwowego. Synapsa ciągle modyfikuje swoje właściwości, zmieniając wydajność przewodzenia impulsów nerwowych zależnie od poprzedzajacych ten przekaz zdarzeń. Ta niezwykła zdolność nazywa się plastycznością synaptyczną¹ i jest uważana, między innymi, za komórkowe podłoże uczenia się i pamięci (BLISS i COLLINGRIDGE 1993, BAILEY i współaut. 1996). Zdolność do przebudowy i rozbudowy złącza synaptycznego służy również doskonaleniu percepcji czuciowej i nabywaniu sprawności ruchowej. Plastyczność synaps ujawnia się też po uszkodzeniach tkanki nerwowej, kiedy to dochodzi do reorganizacji sieci neuronowych kory mózgu, ośrodków podkorowych i rdzenia kręgowego. Jest ona jednym z warunków odbudowy morfologicznej i czynnościowej tkanki nerwowej oraz kompensacji utraconych funkcji.

Od dawna zastanawiano się, jakie mechanizmy komórkowe kierują plastycznością synaps. Spekulowano, że plastyczność wiąże się z modyfikacją aktywności, składu synaptycznego i ilości białek, niezbędnych do czynności i budowy synaps, ale brakowało na to przekonujących dowodów. Odkrycie, że aktywowanie niektórych dróg nerwowych krótkimi seriami bodźców o wysokiej czę-

stotliwości powoduje długotrwałą zmianę efektywności tak pobudzanych synaps sprawiło, że zaczęto intensywnie badać podłoże molekularne tej zmiany plastycznej. Są dwie główne formy trwałej zmiany synaptycznej: LTP (długotrwałe wzmocnienie synaptyczne) i LTD (długotrwałe osłabienie synaptyczne), które reprezentują, odpowiednio, wzrost i spadek wydajności przewodzenia synaptycznego (neurotransmisji). Obie formy pobudzenia rozwijają się w ciągu minut i mogą trwać przez wiele godzin i dni. A więc, w komórce musi istnieć zapis molekularny tej utrzymującej się informacji. Wykazano, że w przebiegu LTP i LTD występują zasadniczo dwie fazy czasowe, z których każda ma inne "wymagania" molekularne. Zgromadzono liczne dowody na to, że krótkotrwałe formy plastyczności powstają głównie dzięki modyfikacji już istniejących białek synaptycznych, w tym przede wszystkim ich szybkich fosforylacji i defosforylacji (GOELET i współaut. 1986). Natomiast formy długotrwałe LTP wymagają wzmożenia syntezy białek; tych, już aktywnych w synapsie, jak też nowych, które włączane będą do procesu "uplastyczniania" synapsy. Białka synaptyczne są różnorodne; tworzą receptory, kanały błonowe, enzymy, należą do nich również białka strukturalne błony i szkieletu platformy aparatu podbłonowego oraz cząsteczki regulatorowe i sygnałowe. W komórce nerwowej wiele białek

¹Plastyczność synaptyczna – zdolność do zmiany reaktywności synapsy pod wpływem kolejnych pobudzeń; zespół zmian prowadzących do modyfikacji składu i organizacji synapsy, w wyniku czego dochodzi do zmiany wydajności połączenia synaptycznego



Ryc. 1. Synapsa.

Schemat ilustruje budowę synapsy chemicznej, w której informacja jest przekazywana z neuronu pre- do postsynaptycznego za pomocą neuroprzekaźnika (tu glutaminianu, Glu). W części postsynaptycznej połączenia wyróżniono dwa typy receptorów jonotropowych, rozpoznających glutaminian: AMPA i NMDA (receptory, pełniące funkcję kanałów jonowych, zależnych od neuroprzekaźnika) oraz kanały jonowe, zależne od napięcia i przewodzące jony wapnia i sodu. Nie uwzględniono receptorów metabotropowych mGluR dla Glu. Wyrzut Glu do przestrzeni synaptycznej i związanie Glu z NMDA lub AMPA powoduje zmianę układu przestrzennego podjednostek, z których zbudowane są te receptory, i otwarcie położonych centralnie kanałów jonowych. Napływ jonów do wnętrza neuronu przez te kanały inicjuje kaskadę zmian biochemicznych wewnątrz komórki.

gromadzi się wybiórczo w części postsynaptycznej złącza nerwowego, a więc w miejscu odbioru informacji przez neuron. W kolcach dendrytycznych (wyspecjalizowanych strukturach, które są uwypukleniami pnia wypustki dendrytycznej), białka receptorowe i kanały jonowe są gęsto osadzone w błonie postsynaptycznej i łączą się z uporządkowaną strukturą podbłonową, tzw. zagęszczeniem postsynaptycznym (Ryc. 1). Odgrywa ono decydującą rolę w funkcji komórki: wykrywa informację docierającą do błony komórkowej i przekazuje ją do wnętrza neuronu. Gdzie zachodzi synteza białek, niezbędna do zajścia długotrwałej zmiany plastycznej? Czy specyficznie dendrytyczne białka mogą być syntetyzowane w synapsach?

Klasyczny pogląd zakłada, że białka są syntetyzowane w ciele komórki i stad transportowane do specyficznych rejonów dendrytu, między innymi do synaps (Ryc. 1). Jak jednak wytłumaczyć szybkie zmiany, zachodzące w pobudzonych synapsach w ciągu minut, jeśli położone są one w dużych odległościach od "centrum dowodzenia", jak przez długi czas postrzegano ciało neuronu? Transport białek w komórce nerwowej jest zbyt wolny, by w tak krótkim czasie zasilić pobudzone synapsy w nowozsyntetyzowane białka. Zrozumienie tego staje się możliwe, jeśli przyjmiemy, że jest możliwa lokalna synteza białek w dendrytach w pobliżu złącza synaptycznego. Te dwie hipotezy nie wykluczają się wzajemnie; obecny stan wiedzy skłania do poglądu, że oba proponowane mechanizmy są źródłem białek synaptycznych. Co więcej, najnowsze dane ugruntowują pogląd, że inne, niż LTP, formy aktywacji neuronu, również stymulują syntezę białek, i że właśnie lokalna synteza białek, która jest indukowana przez pobudzenie neuronu i zachodzi w dendrytach, a w szczególności w kolcach dendrytycznych, może umożliwiać komórce nerwowej zmienność czynnościową i plastyczność synaps. W niniejszym artykule podsumowuję najnowsze dane na ten temat.

ZNACZENIE LOKALNEJ SYNTEZY BIAŁKA

Lokalna synteza białka w dendrytach może, teoretycznie, służyć szybkiej kontroli siły synaps i ich innych właściwości. Gdyby neuron nie posiadał zdolności do lokalnej syntezy białek, to plastyczność neuronalna musiałaby się opierać na dwóch złożonych mechanizmach (SCHUMAN 1999):

1. mechanizmie, kierującym każdy odbierany na powierzchni komórki sygnał, który miałby powodować zwiększenie zasobów określonego białka dendrytycznego, z synapsy do ciała neuronu;

2. zabiegu precyzyjnego kierowania białek zsyntetyzowanych w ciele neuronu do aktywnych wypustek dendrytycznych.

Aby w krótkim czasie zaszła zmiana plastyczna, komunikacja między częścią obwodową neuronu i ciałem komórki musiałaby być sprawna i niezwykle szybka. Bardziej skuteczna powinna być synteza dendrytyczna², w której neuron konstruuje *in situ* cząsteczki wymagane do zajścia zmian plastycznych, bez nakładu energii związanej z transportem i czasu niezbędnego do dostarczenia ich do miejsca "akcji". Białka syntetyzowane w pniach dendrytów mogłyby przemieszczać się na niewielkie odległości do oznakowanych molekularnie, aktywnych synaps (FREY i MORRIS 1997) Taki mechanizm umożliwiałby przede wszystkim szybkie, lokalne zmiany plastyczne i dowodził pewnej autonomii synaps.

CO JEST NIEZBĘDNE DO DENDRYTYCZNEJ SYNTEZY BIAŁKA?

Do tego, by zaszła synteza białka, niezbędna jest matryca (matrycowy RNA – mRNA), zawierająca zapis struktury pierwszorzędowej przyszłej cząsteczki białka, i "wyposażenie molekularne", umożliwiające odczyt tej informacji: polirybosomy, na których dochodzi do odczytu, transferowy RNA, dostarczający aminokwasy do budowy cząsteczki białkowej, i enzymy inicjujące i regulujące odczyt (translację) i wydłużanie (elongację) powstającego łańcucha białkowego. W następnym kroku nowozsyntetyzowane łańcuchy białka ulegają obróbce i modyfikacji, do których dochodzi przy udziale cystern reticulum endoplazmatycznego i cystern aparatu Golgiego. Czy są dowody na występowanie tych organelli i cząsteczek w dendrytach?

DOWODY NA SYNTEZĘ BIAŁKA W DENDRYTACH

Choć odkrycia rybosomów w dendrytach dokonano już w latach 60. (BODIAN 1965), pozostało ono niezauważone do czasu, gdy STEWARD i LEVY (1982) zaobserwowali w dendrytach komórek ziarnistych i piramidalnych hipokampa pakiety rybosomów połączonych z cysternami reticulum endoplazmatycznego. Te obserwacje stały się znaczącą przesłanką do sformułowania tezy o lokalnej, dendrytycznej translacji mRNA i syntezy białka. Badania, które wykazały, że w korze mózgowej ok. 75% kolców dendrytycznych zawiera polisomy (SPACEK 1985), przemawiają za tym, że synteza białek w dendrytach może być zja-

²Dendrytyczna synteza białek – proces lokalnej syntezy białek w kolcach wypustek dendrytycznych, indukowany przez aktywność neuronalną. Umożliwia szybkie zmiany składu białek synaptycznych i odpowiada prawdopodobnie za krótkotrwałe zmiany plastyczne w synapsach, zmiany wydajności synaptycznej.

wiskiem powszechnym. Współwystępowanie mRNA i rybosomów i umiejscowienie mRNA i polirybosomów u podstawy kolców dendrytycznych wspierały pogląd, że w dendrytach są syntetyzowane specyficznie białka kluczowe dla budowy i czynności połączeń synaptycznych (PALACIOS-PRU i współaut. 1981, STE-WARD i REEVES 1988). W dalszych badaniach stwierdzono występowanie w dendrytach rybosomalnego RNA (rRNA), białek rybosomalnych, czynników translacyjnych regulujących inicjację i elongację łańcucha białkowego, a także błon retikulum endoplazmatycznego i aparatu Golgiego (TIEDGE i BROSIUS 1996, GARDIOL i współaut. 1999, PIERCE i współaut. 2000, WANG i współaut. 2002). Najnowsze badania wyjaśniają, że mRNA jest transportowane do dendrytów w postaci granul RNA, które są agregatami mRNA, białek rybosomalnych, rRNA i białek wiążących RNA, takich jak Staufen (KIM i współaut. 2005). Badania składu białkowego zagęszczeń postsynaptycznych dowodzą, że 11% wszystkich białek występujących w tym rejonie komórki, stanowią białka związane z translacją (PENG i współaut. 2004). Tym samym wykazano, że u ssaków, w dendrytach neuronów pochodzacych z różnych struktur mózgu, znajduje się pełna maszyneria niezbędna i wystarczająca do zsyntetyzowania i obróbki łańcucha białkowego.

Mimo to, do 2001 r. nie udało się uzyskać jednoznacznych dowodów na dendrytyczną syntezę białka. Pierwsze badania nad tym zagadnieniem przeprowadzono z użyciem radioaktywnej leucyny, znakowanej trytem [3H], którą wstrzykiwano przyżyciowo, do komór mózgu uśpionych zwierząt doświadczalnych. Wyniki tych badań pokazały, że nowozsyntetyzowane białka (zawierające wbudowana, znakowana leucynę), znajduja się w dendrytach (KISS 1977). Nie wyjaśniało to jednak ich pochodzenia. Istniała bowiem możliwość, że w tak przeprowadzonych doświadczeniach, w neuronach następowało przemieszczanie się białek powstałych w cytoplazmie ciała komórki do dendrytów.

Większość późniejszych danych, przemawiających za tym, że synteza białka może zachodzić w dendrytach i że ten proces jest niezbędny do zajścia zmian plastycznych uzyskano *in vitro*, analizując włączanie wyznakowanych izotopowo aminokwasów do nowych białek w preparatach synaptoneu-



Ryc. 2. Wpływ pobudzenia neuronu na gromadzenie się mRNA w dendrytach.

W neuronie niestymulowanym tylko ciało komórki i podstawne części dendrytów zawierają mRNA. Groty strzałek wskazują najdalej sięgające znakowanie mRNA. Pobudzenie neuronu jonami potasu (10 mM KCl) powoduje powstanie potencjału czynnościowego w pobudzanym neuronie i wzrost poziomu mRNA BDNF w szczytowym odcinku dendrytu (strzałki wskazują miejsca nasilonej akumulacji), w miejscach domniemanej lokalnej syntezy białka BDNF (wg TONGIORGI i współaut., 1977, zmodyfikowana).

rosomów³ (RAO i STEWARD 1991, WEILER i GREENOUGH 1993, WEILER i współaut. 1994). Również w hodowlach komórek nerwowych, w których wypustki dendrytyczne oddzielano od ciał neuronów, a następnie inkubowano w roztworze radioaktywnej leucyny lub transfekowano znakowanym mRNA, stwierdzono silne wyznakowanie preparatów, wskazujące na syntezę białek i ich glikozylację w wyizolowanych dendrytach (TORRE i STE-WARD 1992, 1996; CRINO i EBERWINE 1996). Ta wspaniała technika, opracowana przez Stewarda w 1992 r. (TORRE i STEWARD 1992), nie była jednak wolna od ryzyka kontaminacji preparatów dendrytów frakcjami niedendrytycznymi. Również wspólnym ograniczeniem wymienionych podejść doświadczalnych było ryzyko kontaminacji preparatów dendrytów

³Synaptoneurosom jest preparatem fragmentów dendrytów z kolcami dendrytycznymi, który uzyskuje się w procesie biochemicznego izolowania struktur komórkowych

frakcjami glejowymi (HENN i wsółaut. 1976), wyrwanie z fizjologicznego kontekstu oraz brak możliwości śledzenia zmian w funkcji czasu. Badania te nie uchroniły się więc od zarzutu, że obserwowany proces może być artefaktem. Bardziej przekonujących dowodów dostarczyły badania z laboratoriów Cattaneo (TONGIORGI i współaut. 1997) i Schuman (OUYANG i współaut. 1999). Grupa Cattaneo wykazała, że pobudzanie neuronów hipokampa roztworami jonów potasu w dużych stężeniach powoduje znaczący wzrost dendrytycznego poziomu mRNA dwóch białek: neurotrofiny BDNF⁴ i receptora błonowego BDNF, TrkB (Ryc. 2). Ci sami badacze wykazali, że akumulacji mRNA, która była największa w częściach dendrytów odległych od ich nasady, a więc z dala od ciała komórkowego, towarzyszy również dendrytyczny wzrost białka BDNF i TrkB (TONGIORGI i współaut. 2004). Doświadczenia nad wpływem silnego, elektrycznego pobudzania neuronów hi-

pokampa, na komórkowe stężenie CaMKII (enzymu, kinazy białkowej zależnej od wapnia i kalmoduliny, która reguluje czynność neuronu i występuje obficie w dendrytach) (STEWARD 1997), wykazały, że zaledwie w 5 minut po tzw. tetanicznej stymulacji włókien Schaffera w hipokampie, wykrywa się wzrost poziomu białka CaMKII w dendrytach komórek docelowych tej projekcji, w miejscach, które znajdują się w odległości 100-200 mikrometrów od ciał komórkowych. Transport tak dużych białek, jak CaMKII, z ciał komórek nerwowych do ich zakończeń, jest zbyt wolny, by mógł tłumaczyć tak szybki wzrost poziomu enzymu w dystalnych (odległych od podstawy) częściach dendrytów. Dlatego szczególnie ten wynik można było interpretować z dużym prawdopodobieństwem, jako skutek dendrytycznej syntezy białka. Jednak przełom w badaniach przyniosły dopiero następne doświadczenia Erin Schuman.

DOWÓD KORONNY: DOŚWIADCZENIA POCHODZĄCE Z LABORATORIUM ERIN SCHUMAN

W 2001 r. grupa Erin Schuman przeprowadziła niezwykłe doświadczenie na wyizolowanych neuronach hipokampa (AAKALU i współaut. 2001). Do badania lokalnej syntezy białka w dendrytach neuronów hipokampalnych użyto stworzonego przez tych badaczy konstruktu, złożonego z genu reporterowego białka zielonej fluorescencji (ang. green fluorescent protein, GFP) i rejonu UTR (ang. untranslated region) podjednostki alfa CaMKII. W takim konstrukcie GFP jest swoistym, bardzo wiarygodnym, fluorescencyjnym "wykrywaczem" syntezy białka CaMKII, a sekwencja UTR zawiera zapis, który powoduje ukierunkowywanie powstającego mRNA do dendrytów i jest miejscem regulacji translacji (MAYFORD i współaut. 1996, MORI i współaut. 2000). Transfekcja neuronów takim konstruktem umożliwiła więc śledzenie zmian lokalizacji i intensywności fluorescencji GFP, będącej miarą zachodzącej syntezy białka GFP po pobudzeniu neuronu.

Prześledzimy pokrótce to doświadczenie. Neurony hipokampalne pozyskiwano z mó-

zgów 2-3 dniowych osesków szczurzych i utrzymywano je w hodowli przez 14-21 dni, do osiągnięcia dojrzałości. Dojrzałe neurony transfekowano konstruktem GFP--UTRCaMKII i po 6 godzinach od transfekcji sprawdzano, czy i w jakich rejonach komórkowych dochodzi do ekspresji konstruktu. Badano wzmożenie ekspresji białka GFP, czyli jego powstawania, pod wpływem BDNF. Wspomniany już wcześniej BDNF jest niskocząsteczkowym białkiem neurotroficznym, wydzielanym przede wszystkim przez neurony. Reguluje ono przeżywalność komórki nerwowej i pobudza jej czynność. W neuronach, które eksponowano na BDNF, następował kilkukrotny wzrost fluorescencji GFP w ciele neuronu i na całej długości dendrytów. Te doświadczenia dowiodły, że BDNF może stymulować syntezę białka w neuronach, ale nie pokazywały, w jakim przedziale komórkowym owa synteza ma miejsce. Badanie zmian intensywności fluorescencji GFP na przebiegu dendrytów pod wpływem BDNF wykazało znaczący wzrost fluorescencji po 60 minu-

⁴BDNF – Brain Derived Neurotrophic Factor, czynnik neurotroficzny pochodzenia mózgowego, niskocząsteczkowe białko troficzne wydzielane przez neurony, które reguluje przeżywalność komórki nerwowej i jej czynność za pośrednictwem receptorów błonowych TrkB i p75. *In vitro* BDNF ułatwia translokację czynnika regulującego inicjację translacji eIF4E do kolców dendrytycznych i łączenie się tego czynnika z ziarnistościami zawierającymi RNA, połączonymi z cytoszkieletem (SMART i współaut. 2003).



Ryc. 3. Przebieg translacji białka zielonej fluorescencji (GFP) w dendrytach, w różnym czasie od podania BDNF.

A – Fluorescencja GFP w dendrycie neuronu poddanego działaniu BDNF, po 60, 120 i 180 minutach od początku ekspozycji na neurotrofinę. Obraz w czasie "0" przedstawia fluorescencję GFP w dendrycie neuronu kontrolnego. W warunkach kontrolnych, gdy komórek nie stymulowano BDNF, ekspresja GFP była silna w ciele neuronu, ale słaba w dendrytach. **B** – Zmiany intensywności fluorescencji w dendrycie, będące miarą poziomu translacji mRNA GFP, w 2 godziny od podania BDNF. Wynik opracowano ilościowo, próbkując fluorescencję dendrytu w mikroskopie konfokalnym. Pomiary w danym miejscu wypustki, na różnej głębokości (w "skrawkach" o grubości 0.3 μ m) uzyskane z 3 do 7 "skrawków" sumowano, by uzyskać wartość średnią dla grubości dendrytu (1–2 μ m). Intensywność fluorescencji na przebiegu dendrytów przedstawiano w funkcji odległości od ciała komórki (wg AAKALU i współaut. 2001, zmodyfikowana).



Ryc. 4. BDNF stymuluje syntezę białka w mechanicznie izolowanych, sprawnych czynnościowo dendrytach.

Obrazy przeciętych neuronów (A) i ich trójwymiarowe odwzorowania (B), ilustrujące zmiany fluorescencji GFP w odciętych dendrytach przed (lewa strona rysunku) i w 120 minut po stymulacji za pomocą BDNF (po prawej). Intensywność zmian jest proporcjonalna do amplitudy i koloru wykresu (patrz skala na A). Strzałki wskazują miejsce przecięcia dendrytów (wg AAKALU i współaut. 2001, zmodyfikowana).

tach od ekspozycji na neurotrofinę, który był jednoczesny w ciałach komórek i dystalnych częściach dendrytów (Ryc. 3A). Ten wynik przemawiał za jednoczesną syntezą białka w ciele neuronu i syntezą lokalną, nie wykluczając udziału translokacji dodendrytycznej nowopowstałych białek. Wzrost był znaczący, bo oceniany dla całej długości i szerokości dendrytu wynosił 60%. Uzyskane obrazy wykazały również pojawianie się na przebiegu dendrytu tzw. gorących miejsc (ang. hot spots), w których wyznakowanie było znacznie silniejsze. Analiza stopnia wzmożenia sygnału fluorescencyjnego w tych miejscach ujawniła nawet ośmiokrotne wzrosty poziomu syntezy białka (Ryc. 3B). A więc mogły to być miejsca szczególnie aktywnej syntezy! To, że obserwowane zmiany były następstwem syntezy białka udowodniono, stosując inhibitor syntezy białka, anizomycynę, która hamowała efekt wywołany przez BDNF.

Żeby uzyskać niezbity dowód, że synteza zachodzi lokalnie, w następnym kroku odseparowano ciało komórki od dendrytu za pomocą szklanej mikroelektrody. Taki zabieg nie powinien był powodować upośledzenia funkcji i śmierci neuronu – w przeciwnym razie wynik doświadczenia mógł być artefaktem. Dlatego każdorazowo testowano przeżywalność neuronów, stosując jodek propydyny, który wykrywa martwe komórki. Na przestrzeni dwóch lat badań, spośród 300 komórek poddanych zabiegowi odcięcia dendrytu, tylko 10 spełniło wymagane kryteria. I właśnie zmiany w tych neuronach udowodniły, że w dendrytach odciętych i odseparowanych od pozostałej części komórki dochodzi pod wpływem BDNF do syntezy białka (Ryc. 4). Niemal w tym samym czasie, JOB i EBERWINE (2001) transfekując już odcięte dendryty mRNA GFP wykazali, że w dendrytach, tym razem pobudzanych za pośrednictwem glutaminianu, który oddziaływał na błonę dendrytu przez receptory metabotropowe mGluR, dochodzi do syntezy białka. Badania te udowodniły również, że inne, niż LTP, formy aktywacji neuronu, stymulują dendrytyczną syntezę białek.

Ze względu na bardzo trudny technicznie zabieg izolowania dendrytów, a w konsekwencji duże ryzyko upośledzenia ich funkcji, narastające w czasie od momentu izolacji, doświadczenia z preparatami dendrytów nie są optymalnym rozwiązaniem w intensywnych badaniach nad lokalną syntezą białek. Opracowano więc alternatywne podejście, które polegało na tzw "optycznej izolacji"

ciała komórkowego od dendrytów z jednoczesnym zastosowaniem zmodyfikowanego konstruktu GFP, wzbogaconego o sekwencję zgodności myristylacji (ang. myristoylation concensus sequence). "Optyczna izolacja" polega na fotowybielaniu (ang. photobleaching) fluorescencji, powodowanym przez naświetlanie wybranej części komórki wiązką laserową o dużej mocy. Zabieg niszczy więc sygnał fluorescencyjny, pochodzący z niepożądanego przedziału komórkowego. Z kolei sekwencja myristylacji zmniejsza prawdopodobieństwo dyfuzji nowozsyntetyzowanego GFP, gdyż reszta mirystylowana "nakazuje" zawierającemu ją białku wbudowywanie się do błon. Ta modyfikacja zmniejsza więc udział GFP zsyntetyzowanego w ciele komórki w puli białka dendrytycznego. W doświadczeniu Schuman ciała neuronów naświetlano przez godzinę wiązką o długości fali 488 nm i mocy 5 mW. W tak izolowanych (optycznie, ale nie fizycznie) od ciała komórkowego dendrytach, dodanie BDNF powodowało gwałtowny i duży, niekiedy nawet 17-krotny wzrost translacji mRNA GFP. Wielokrotne obrazowanie izolowanych optycznie dendrytów pozwoliło ustalić precyzyjnie miejsca, w których dochodziło do wzmożenia translacji mRNA GFP w czasie i wykazać, że "gorące miejsca" syntezy białek pojawiają się w dość stałych miejscach dendrytu, stabilnych w czasie kilku godzin trwania doświadczenia. Wymapowanie tych miejsc za pomocą przeciwciał, rozpoznających białka swoiste dla struktur zagęszczenia postsynaptycznego (takich jak PSD-95) lub presynaptycznych (synapsyna I), pozwoliło ustalić, że miejsca syntezy dendrytycznej znajdują się przede wszystkim w tzw. pniach kolców dendrytycznych i że znajdowany sygnał GFP bardzo często współwystępuje z białkami synaptycznymi. Był to kolejny, mocny dowód na to, że lokalnie zsyntetyzowane białka mogą być dostępne przede wszystkim dla synaps sąsiadujących z miejscami syntezy i że może to być mechanizm kształtujący specyficzność synaps (AAKALU i współaut. 2001).

Najnowsze badania grupy Schuman wskazują, że dendrytyczną syntezę białek można wywołać również przez pobudzenie elektryczne neuronu, które powoduje powstanie potencjałów czynnościowych. Co ciekawe, miniaturowe potencjały synaptyczne (tzw. minis), powodowane przez bodźce podprogowe, które nie prowadzą do powstania potencjału czynnościowego, hamują dendrytyczną syntezę białek, a więc regulują ją na poziomie synaps (SUTTON i współaut. 2004).

Dendrytyczna lokalizacja	Funkcja białka	Grupa badawcza, która opisała
mRNA		zjawisko
Podjednostka NR1 receptora	Receptor jonotropowy sprzężony	BENSON 1997, GAZZALEY i współaut.
jonotropowego NMDA dla	z kanałem wapniowym; pośredniczy	1997
glutaminianu	w pobudzeniu neuronu przez gluta-	
	minian	
Podjednostka alfa receptora	Poéredniczy w hamowaniu aktywy	PACCA i wepółaut 1007
alicynergicznego	ności neuropu przez glicyne	RACCA I wspolaut. 1997
gitcynergicznego	noser neuronu przez gneynę	
Podiednostka rho1 i rho2 re-	Receptor ionotropowy sprzeżony	Rozzo i współaut. 2002
ceptora GABAC	z kanałem chlorkowym: pośredniczy	
L.	w pobudzeniu neuronu przez GABA	
	* *	
Podjednostka alfa kinazy biał-	Kinaza – fosforyluje receptory AMPA	BURGIN i współaut. 1990; STEWARD
kowej zależnej od wapnia	i NMDA podczas LTP; brak kinazy po-	1997; OUYANG i współaut. 1997,
i kalmoduliny (CaMKII)	woduje zaburzenia LTP i uczenia się	1999; BAGNI i współaut. 2000
Arc/arg 3.1 – białko "natych-	Reguluje utrzymanie i konsolidację	Lyford i współaut. 1995;
miastowej odpowiedzi" zwią-	LTP; aktywowane przez BDNF	STEWARD i współaut. 1998, 2001
zane z cytoszkietem		
Novesterfing (DDNE)	Populuio przeżywalność pouropu ak	Ducicu Dioppinuc i wanálout 1002
Neurotronnia (BDNF)	travator neuroprzekaźnictwa regu	WETMORE i wepółaut 100/
	luie wyrzut neuroprzekaźników i ak-	CPINO i EREPWINE 1994,
	tywuje receptory dla glutaminianu	i współaut 1997
	of the generation of the gramming	1
Receptor neurotrofin BDNF/	Pośredniczy w przekazie sygnału	Tongiorgi i współaut. 2004, 1997
NT-4 (TrkB)	BDNF i NT-4	· · · · ·
Receptor IP3	Pośredniczy w przekazie sygnału tri-	FURUICHI i współaut. 1993, BANNAI
	fosforanu inozytolu do reticulum en-	i współaut. 2004
	doplazmatycznego	
		C (1 1 1000 D
Białko związane z mikrotu-	Wspołtworzy cytoszkielet dendrytow	GARNER 1 WSpołaut. 1988, BLICHEN-
Dulami (MAP-2)		BERG 1 WSporaut. 1999
	Regulator translacii białek: podle-	WEILER i współaut 1997 FENG
Fragile X mental retardation	ga regulacij przez BDNF brak tego	i współaut 1997
protein	białka powoduje zaburzenia rozwoju	i wopoliuu. 1997
Protein	umvsłowego	
	Regulator ciśnienia naczyniowego	Prakash i współaut. 1997
Wazopresyna	i neuromodulator	
	Niezidentyfikowana	HERB i współaut. 1997
Dendryna		

Tabela 1. Białka, których mRNA zlokalizowano w dendrytach

Na początku tego roku opublikowano wyniki pracy wskazujące, że aktywacja neuronów hipokampa neuroprzekaźnikiem dopaminą, która odgrywa pierwszorzędowa rolę w zachowaniu zwierząt – tak w fizjologii, jak i w patofizjologii – powoduje pobudzenie lokalnej syntezy białka za pośrednictwem receptorów dopaminowych D1-D5. W następstwie pobudzenia dochodzi do wzrostu syntezy podjednostek GluR1 receptora AMPA dla glutaminianu (Ryc. 1) i ich wbudowywanie do błony postsynaptycznej (SMITH i współaut. 2005). Uruchomienie tego mechanizmu może prowadzić do aktywacji uprzednio nie-

czynnych, "milczących" synaps i do zwiększenia czułości połączeń synaptycznych.

CZY SYNTEZA BDNF ZACHODZI W DENDRYTACH IN VIVO?

Jak już opisano, czynnik neurotroficzny BDNF stymuluje dendrytyczną syntezę białek i sam jest syntetyzowany w pobudzonych dendrytach hodowanych komórek nerwowych (AAKALU i współaut. 2001). Ostatnio wykazano (TONGIORGI i współaut. 2004), że również w następstwie aktywacji neuronów w mózgu żywego zwierzęcia, BDNF nagromadza się w dendrytach. Do dendrytycznego wzrostu BDNF potrzebny jest szczególny rodzaj pobudzenia. Proces jest aktywowany przez jonotropowe receptory NMDA dla glutaminianu (Ryc. 1). Stymulacja epileptogenna pilokarpiną lub kwasem kainowym, a także tzw. rozniecanie (ang. kindling) za pomoca drażnienia elektrycznego hipokampa prowadzi do szybkiego nagromadzania się mRNA i białka BDNF w ściśle określonych warstwach dendrytycznych tej struktury mózgu. Tego zjawiska nie obserwowano, gdy stosowano silne bodźce nieepileptogenne, takie jak stymulacja elektryczna o wysokiej częstotliwości lub elektrokonwulsje. Nagromadzanie się BDNF jest wynikiem najprawdopodobniej dwóch procesów: dodendrytycznego transportu samego białka z ciała komórki nerwowej (ang. dendritic targeting) oraz dodendrytycznego transportu mRNA BDNF i następczej lokalnej syntezy BDNF na tej matrycy. A więc dendrytyczny BDNF jest prawdopodobnie zaangażowany w inicjację zmian komórkowych, które prowadzą do nadpobudliwości komórek i powstania epilepsji. Nie wyklucza to odmiennego mechanizmu działania BDNF w innych strukturach mózgu, np. korze mózgowej.

Do dziś udało się zidentyfikować w dendrytach mRNA kilkunastu białek, których funkcja jest ściśle związana z aktywnością neuronu: są to białka receptorowe, przekazujące impulsy pobudzeniowe do wnętrza neuronu, jak też białka-egzekutory przekazu sygnału w komórce (Tabela 1).

Tak więc bardzo istotnym aspektem regulacji ekspresji białek w komórce nerwowej jest przemieszczanie się matryc zapisu ich struktury z ciała neuronu do wypustek dendrytycznych, w których dochodzi do regulowanej lokalnie syntezy białek. Lokalna synteza białka odgrywa rolę zależnej od aktywności modyfikacji synaps. Znamy zjawisko lokalnej syntezy białek w stożkach wzrostu rosnących aksonów, w których proces ten służy wydłużaniu i ukierunkowywaniu wzrostu włókna nerwowego (ZHENG i współaut. 2001, VERMA i współaut. 2005). Najnowsze wyniki badań wykazują, że lokalnie, w dendrytach i aksonach, może dochodzić również do degradacji białek (STEWARD i SCHUMAN 2003). Te nowe dane odsłaniają potencjał dendrytów i aksonów w dwukierunkowej kontroli składu białkowego synaps.

Autorka serdecznie dziękuje mgr Matyldzie Macias za opracowanie rycin, ilustrujących artykuł. Publikacja powstała przy wsparciu finansowym Min. Nauki i Informatyzacji, z funduszy przyznanych na działalność statutową Instytutu im. M. Nenckiego PAN i na realizację polsko-niemieckiego proj. badawczego PBZ-MIN-001/P05/13.

LOCAL PROTEIN SYNTHESIS IN NEURONAL DENDRITES: FUNCTION IN SYNAPTIC PLASTICITY?

Summary

The article summarizes the most meaningful studies which have provided evidence that protein synthesis in the neuron can occur not only in cell perikarya but also locally in dendrites. Dendrites contain the complete machinery required to synthesize proteins. Until now 12 different mRNAs coding the proteins involved in neurotransmission and modulation of synaptic activity have been identified in dendrites. Among these molecules is a BDNF neurotrophic factor which is a strong regulator of neuronal activity. It is postulated that the phenomenon of local synthesis provides the mechanism of fast changes in the strength of neuronal connections and is the molecular background of synaptic plasticity. Local protein synthesis points to some autonomy of dendrites which makes them "the brains of the neurons" (Jim Eberwine).

- AAKALU G., SMITH W. B., NGUYEN N., JIANG C., SCHU-MAN E. M., 2001. Dynamic visualization of local protein synthesis in hippocampal neurons. Neuron 30, 489-502.
- BAGNI C., MANNUCCI L., DOTTI C. G., AMALDI F., 2000. Chemical stimulation of synaptosomes modu-lates alpha-Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase II mRNA association to polysomes. J. Neurosci. 20, RC76.
- BAILEY E. A., IYER R. S., STONE M. P., HARRIS T. M., ES-SIGMANN J. M., 1996. Mutational properties of the primary aflatoxin B1-DNA adduct. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 1535-1539.
- BANNAI H., FUKATSU K., MIZUTANI A., NATSUME T., IE-MURA S., IKEGAMI T., INOUE T., MIKOSHIBA K., 2004. An RNA-interacting protein, SYNCRIP (heteroge neous nuclear ribonuclear protein Q1/NSAP1) is a component of mRNA granule transported with inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 mRNA in neuronal dendriftes. J. Biol. Chem. 279, 53427-53434.
- BENSON D. L., 1997. Dendritic compartmentation of NMDA receptor mRNA in cultured hippocampal neurons. Neuroreport 8, 823-828.
- BLICHENBERG A., SCHWANKE B., REHBEIN M., GARNER C. C., RICHTER D., KINDLER S., 1999. Identification of a cis-acting dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. J. Neurosci. 19, 8818-8829.
- BLISS T. V., COLLINGRIDGE G. L., 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. Nature 361, 31-39.
- BODIAN D., 1965. A suggestive relationship of nerve cell RNA with specific synaptic sites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53, 418-425.
- BURGIN K. E, WAXHAM M. N, RICKLING S., WESTGATE S. A. MOBLEY W. C., KELLY P. T., 1990. In situ hybridization histochemistry of Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase in developing rat brain. J. Neurosci. 10, 1788-1798.
- CRINO P. B., EBERWINE J., 1996. Molecular characterization of the dendritic growth cone: regulated mRNA transport and local protein synthesis. Neuron 17, 1173-1187
- DUGICH-DJORDJEVIC M. M., TOCCO G., LAPCHAK P. A., PASINETTI G. M., NAJM I., BAUDRY M., HEFTI F., 1992. Regionally specific and rapid increases in brain-derived neurotrophic factor messenger RNA in the adult rat brain following seizures induced by systemic administration of kainic acid. Neuroscience 47, 303-315.
- FENG Y., GUTEKUNST C. A., EBERHART D. E., YI H., WARREN S. T., HERSCH S. M., 1997. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shut-tling and association with somatodendritic ribosomes. J. Neurosci. 17, 1539-1547. FREY U., MORRIS R. G., 1997. Synaptic tagging and
- long-term potentiation. Nature 385, 533-536.
- FURUICHI T., SIMON-CHAZOTTES D., FUJINO I., YAMADA N., HASEGAWA M., MIYAWAKI A., YOSHIKAWA S., GUENET J. L., MIKOSHIBA K., 1993. Widespread expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1 gene (Insp3r1) in the mouse central nervous system. Receptors Channels 1, 11-24.
- GARDIOL Ă., RACCA C., TRILLER A., 1999. Dendritic and postsynaptic protein synthetic machinery. J. Neurosci. 19, 168-179.
- GARNER C. C., TUCKER R. P., MATUS A., 1988. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. Nature 336, 674-677
- GAZZALEY A. H, BENSON D. L, HUNTLEY G. W, MORRI-SON J. H., 1997. Differential subcellular regula-

tion of NMDAR1 protein and mRNA in dendrites of dentate gyrus granule cells after perforant path transection. J. Neurosci. 17, 2006-2017.

- GOELET P., CASTELLUCCI V. F., SCHACHER S., KANDEL E. R., 1986. The long and the short of long-term memory a molecular framework. Nature 322, 419-422.
- HENN F. A., ANDERSON D. J., RUSTAD D. G., 1976. Glial contamination of synaptosomal fractions. Brain Res. 101, 341-344.
- HERB A., WISDEN W., CATANIA M.V., MARECHAL D., DRESSE A., SEEBURG P. H., 1997. Prominent dendritic localization in forebrain neurons of a novel mRNA and its product, dendrin. Mol. Cell Neurosci. 8, 367-374. JOB C., EBERWINE J., 2001. *Identification of sites for*
- exponential translation in living dendrites. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 13037-13042.
- KIM H. K., KIM Y. B., KIM E. G., SCHUMAN E., 2005. Measurement of dendritic mRNA transport us-ing ribosomal markers. Biochem. Biophys. Res.
- Commun. 328, 895-900. Kiss J., 1977. Synthesis and transport of newly formed proteins in dendrites of rat hippocampal pyramid cells. An electron microscope autoradiographic study. Brain Res. 124, 237-250.
- LYFORD G. L., YAMAGATA K., KAUFMANN W. E., BARNES C. A., SANDERS L. K., COPELAND N. G., GILBERT D. J., JENKINS N. A., LANAHAN A. A., WORLEY P. F., 1995. Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. Neuron 14, 433-445.
- MAYFORD M., BARANES D., PODSYPANINA K., KANDEL E. R., 1996. The 3'-untranslated region of CaMKII alpha is a cis-acting signal for the localization and translation of mRNA in dendrites. Proc. Natl. Acad. Sci. USĂ 93, 13250-13255.
- MORI Y., IMAIZUMI K., KATAYAMA T., YONEDA T., TO-HYAMA M., 2000. Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. Nat. Neurosci. 3, 1079-1084
- OUYANG Y., KANTOR D., HARRIS K. M., SCHUMAN E. M., KENNEDY M. B., 1997. Visualization of the distribution of autophosphorylated calcium/calmodulin-dependent protein kinase II after tetanic stimulation in the CA1 area of the hippocam-pus. J. Neurosci. 17, 5416-5427.
- OUYANG Y., ROSENSTEIN A., KREIMAN G., SCHUMAN E. M., KENNEDY M. B., 1999. Tetanic stimulation leads to increased accumulation of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II via den-dritic protein synthesis in hippocampal neurons. J. Neurosci. 19, 7823-7833.
- PALACIOS-PRU E. L., PALACIOS L., MENDOZA R. V., 1981. Synaptogenetic mechanisms during chick cerebellar cortex development. J. Submicrosc. Cytol. 13, 145-167.
- PENG J., KIM M. J, CHENG D., DUONG D. M., GYGI S. P., SHENG M., 2004. Semiquantitative proteomic analysis of rat forebrain postsynaptic density fractions by mass spectrometry. J. Biol. Chem. 279, 21003-11.
- PIERCE J. P., VAN LEYEN K., MCCARTHY J. B., 2000. Translocation machinery for synthesis of integral membrane and secretory proteins in den-
- *dritic spines.* Nat. Neurosci. 3, 311-313. PRAKASH N., FEHR S., MOHR E., RICHTER D., 1997. Dendritic localization of rat vasopressin mRNA: ultrastructural analysis and mapping of targeting elements. Eur. J. Neurosci. 9, 523-532.

- RACCA C., GARDIOL A., TRILLER A., 1997. Dendritic and postsynaptic localizations of glycine receptor alpha subunit mRNAs. J. Neurosci. 17, 1691-1700.
- RAO A., STEWARD O., 1991. Evidence that protein constituents of postsynaptic membrane specializations are locally synthesized: analysis of proteins synthesized within synaptosomes. J. Neurosci. 11, 2881–2895.
- ROZZO A., ARMELLIN M., FRANZOT J., CHIARUTTINI C., NISTRI A., TONGIORGI E., 2002. Expression and dendritic mRNA localization of GABAC receptor rho1 and rho2 subunits in developing rat brain and spinal cord. Eur. J. Neurosci. 15, 1747--1758.
- SCHUMAN E. M., 1999. mRNA trafficking and local protein synthesis at the synapse. Neuron 23, 645-648.
- SMART F. M, EDELMAN G. M., VANDERKLISH P. W., 2003. BDNF induces translocation of initiation factor 4E to mRNA granules: evidence for a role of synaptic microfilaments and integrins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, 14403-14408.
- SMITH W. B, STARCK S. R, ROBERTS R. W, SCHUMAN E. M., 2005. Dopaminergic stimulation of local protein synthesis enhances surface expression of GluR1 and synaptic transmission in hippocampal neurons. Neuron 45, 765-779.
- SPACEK J., 1985. Three-dimensional analysis of dendritic spines. II. Spine apparatus and other cytoplasmic components. Anat. Embryol. (Berl.) 171, 235-243.
- STEWARD O., 1997. mRNA localization in neurons: a multipurpose mechanism? Neuron 18, 9-12.
- STEWARD O., LEVY W. B., 1982. Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. J. Neurosci. 2, 284–291.
- STEWARD O., REEVES T. M., 1988. Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. J. Neurosci. 8, 176-184.
- STEWARD O., WORLEY P. F., 2001. Selective targeting of newly synthesized Arc mRNA to active synapses requires NMDA receptor activation. Neuron 30, 227-240.
- STEWARD O., SCHUMAN E. M., 2003. Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. Neuron 40, 347-359.
- STEWARD O., WALLACE C. S, LYFORD G. L., WORLEY P. F., 1998. Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. Neuron 21, 741-751.
- SUTTON M.A., WALL N. R., AAKALU G. N., SCHUMAN E. M., 2004. Regulation of dendritic protein synthesis by miniature synaptic events. Science 304, 1979-1983.

- TIEDGE H., BROSIUS J., 1996. *Translational machinery in dendrites of hippocampal neurons in culture.* J. Neurosci. 16, 7171–7181.
- TONGIORGI E., RIGHI M., CATTANEO A., 1997. Activity-dependent dendritic targeting of BDNF and TrkB mRNAs in hippocampal neurons. J. Neurosci. 17, 9492-9505.
- TONGIORGI E., ARMELLIN M., GIULIANINI P. G., BREGOLA G., ZUCCHINI S., PARADISO B., STEWARD O., CATTA-NEO A., SIMONATO M., 2004. Brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein are targeted to discrete dendritic laminas by events that trigger epileptogenesis. J. Neurosci. 24, 6842-6852.
- TORRÉ E. R., STEWARD O., 1992. Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. J. Neurosci. 12, 762-772.
 TORRE E. R., STEWARD O., 1996. Protein synthesis wi-
- TORRE E. R., STEWARD O., 1996. Protein synthesis within dendrites: glycosylation of newly synthesized proteins in dendrites of hippocampal neurons in culture. J. Neurosci. 16, 5967–5978.
- VERMA P., CHIERZI S., CODD A. M., CAMPBELL D. S., MEY-ER R. L., HOLT C. E., FAWCETT J. W., 2005. Axonal protein synthesis and degradation are necessary for efficient growth cone regeneration. J. Neurosci. 25, 331-342.
- WANG H., IACOANGELI A., POPP S., MUSLIMOV I. A., IMA-TAKA H., SONENBERG N., LOMAKIN I. B., TIEDGE H., 2002. Dendritic BC1 RNA: functional role in regulation of translation initiation. J. Neurosci. 22, 10232-10241.
- WEILER I. J., GREENOUGH W. T., 1993. Metabotropic glutamate receptors trigger postsynaptic protein synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7168– 7171.
- WEILER I. J., WANG X., GREENOUGH W. T., 1994. Synapse-activated protein synthesis as a possible mechanism of plastic neural change. Prog. Brain Res. 100, 189-194.
- WEILER I. J., IRWIN S. A., KLINTSOVA A. Y., SPENCER C. M., BRAZELTON A. D., MIYASHIRO K., COMERY T. A., PATEL B., EBERWINE J., GREENOUGH W. T., 1997. Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 5395-5400.
- WETMORE C., OLSON L., BEAN A. J., 1994. Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression and release from hippocampal neurons is mediated by non-NMDA type glutamate receptors. J. Neurosci. 14, 1688-1700.
 ZHENG J. Q., KELLY T. K., CHANG B., RYAZANTSEV S., RA-JASEKARAN A. K., MARTIN K. C., TWISS J. L., 2001.
- ZHENG J. Q., KELLY T. K., CHANG B., RYAZANTSEV S., RA-JASEKARAN A. K., MARTIN K. C., TWISS J. L., 2001. A functional role for intra-axonal protein synthesis during axonal regeneration from adult sensory neurons. J. Neurosci. 21, 9291–9303.