

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
Kemijski odsjek

# ULOGA NMDA RECEPTORA KOD TROVANJA ORGANOFOSFORNIM SPOJEVIMA

---

Naslovni rad:

Wang et al. (2021) TRPV4 Regulates Soman-Induced Status Epilepticus and Secondary Brain Injury via NMDA Receptor and NLRP3 Inflammasome. *Neurosci. Bull.* 10.1007/s12264-021-00662-3

**Dora Kolić**

Kemijski seminar 1

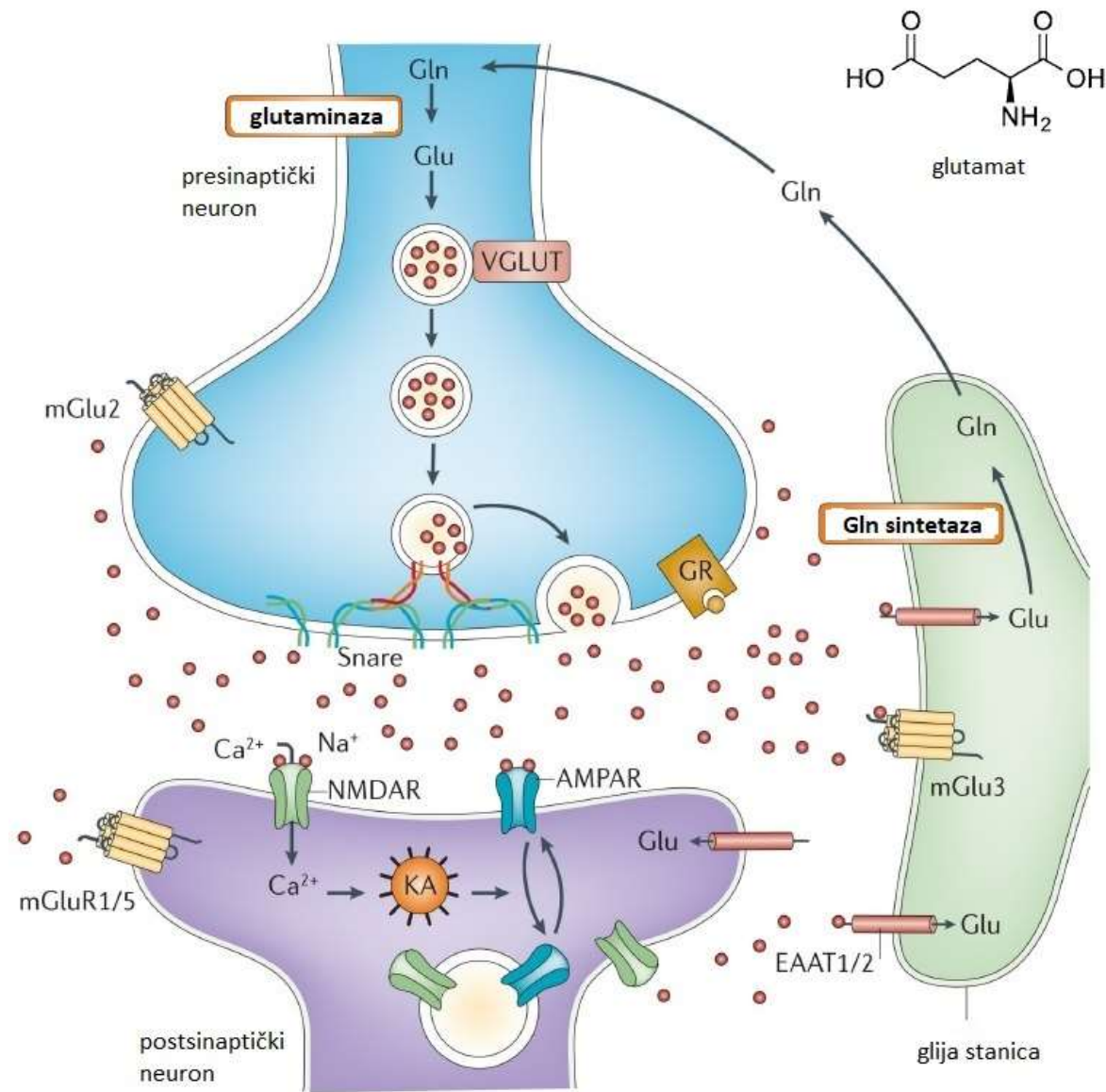
Poslijediplomski studij kemije, biokemija

# Trovanje organofosforanim spojevima

- OP spojevi su derivati fosfatne, fosfonske ili fosfinske kiseline
- pesticidi i bojni otrovi
- primarno neurotoksični - oralni i dermalni put unosa u organizam
- inhibicija acetilkolinesteraze (AChE) i butirilkolinesteraze (BChE) – kolinergički sustav
  - hiperaktivacija glutamatergičkog sustava
  - epileptični napadaji
  - oksidacijski stres i neuropala
  - degeneracija i apoptoza neurona
- standardna klinička terapija za trovanje ne sprječava nastanak dugotrajnih neuroloških oštećenja

# Glutamatergički sustav

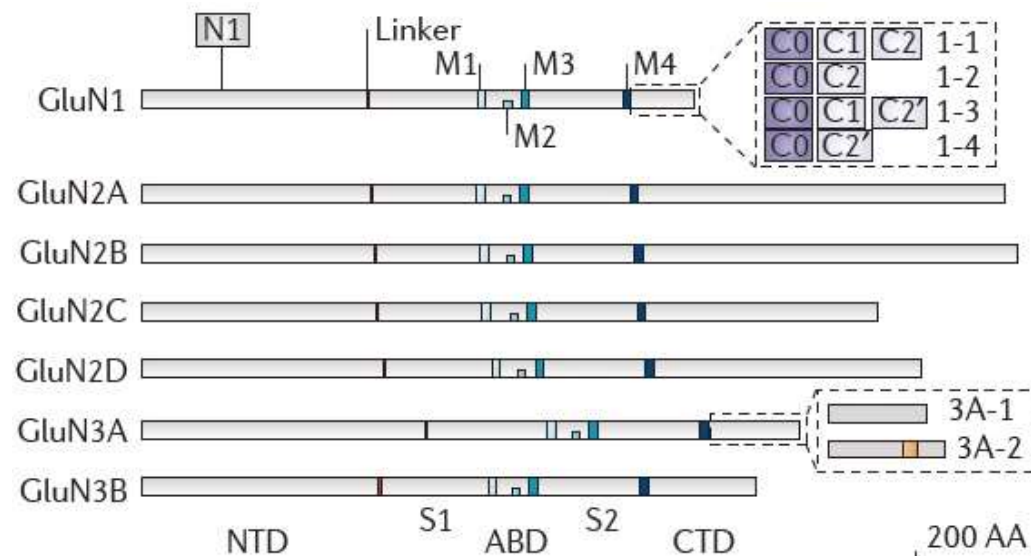
- homeostaza neurotransmitera glutamata u živčanom sustavu - ciklus glutamat/glutamin
- glutamatni transporteri lokalizirani u astrocitima
- ionotropni (iGluR) receptori:
  - NMDA receptor (NMDAR)
  - AMPA receptor (AMPA)
  - kainiski receptor (KAR)
  - $\delta$ -receptor
- metabotropni receptori (mGluR): mGluR1–mGluR8



Prikaz glutamatergičke sinapse.

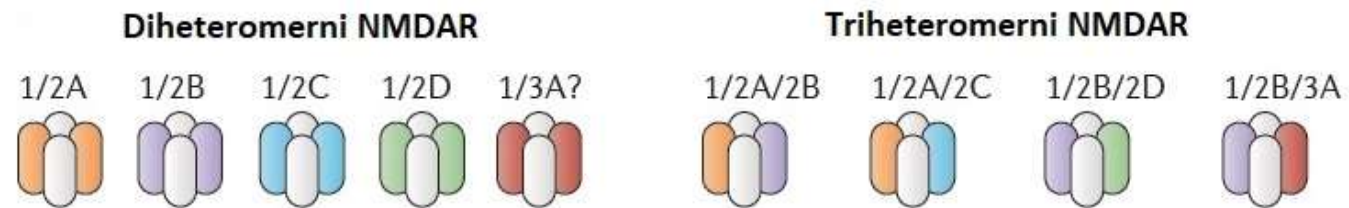
# NMDA receptor

- receptor N-metil-D-aspartata
- transmembranski ionski kanal za  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$  i  $\text{Na}^{+}$
- ekscitacijski živčani impulsi
- podtipovi se razlikuju u kompoziciji podjedinica, biofizičkim i farmakološkim svojstvima, staničnoj lokalizaciji...
- sastav podjedinica se mijenja ovisno o starosti, bolesti i živčanoj aktivnosti
- sedam podjedinica (na temelju homologije sekvenci):
  - 8 izoformi GluN1-1a-4a i GluN1-1b-4b
  - GluN2A, GluN2B, GluN2C and GluN2D
  - GluN3A i GluN3B



Shematski prikaz primarnih struktura podjedinica NMDA receptora.

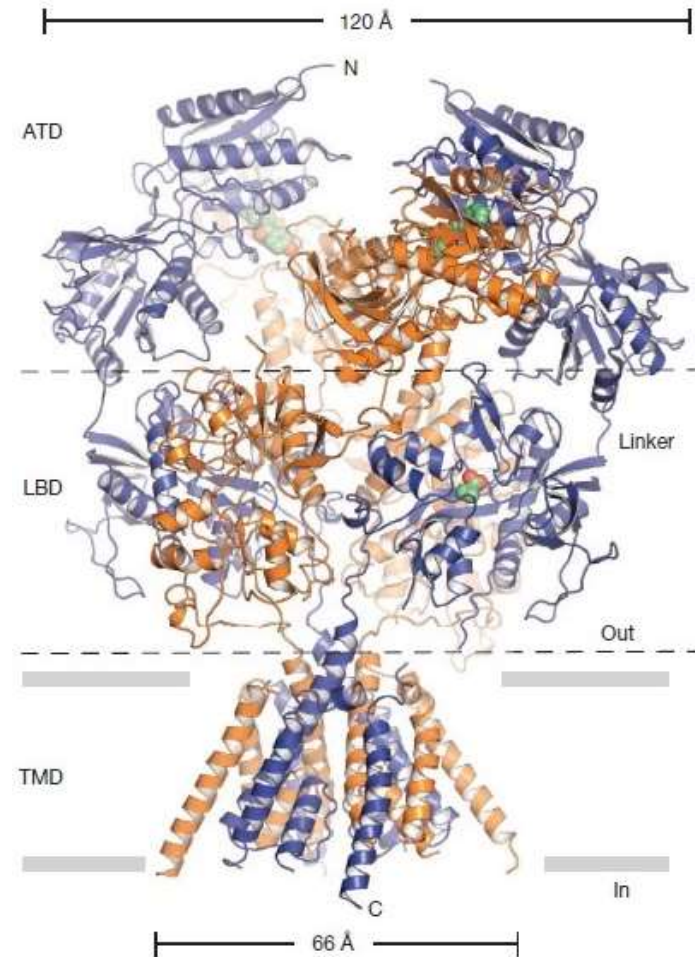
- svi su podtipovi NMDAR sastavljeni od 4 podjedinice:
  - dvije kopije GluN1 koje vežu glicin
  - dvije kopije GluN2 koje vežu glutamat ili GluN2/GluN3 podjedinice
- GluN3 podjedinice vežu D-serin ili glicin
- diheteromerni i triheteromerni receptori
- GluN1, GluN2A i GluN2B dominantne su podjedinice u odrasloj osobi



Različitošć podtipova NMDA receptora.

# Građa NMDA receptora

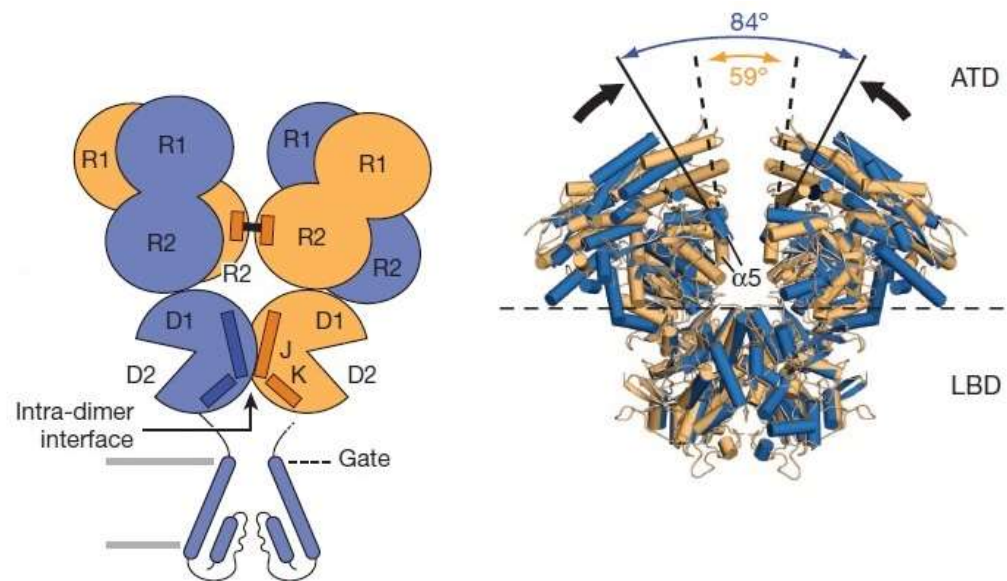
- amino (N)-terminalna domena (**ATD**) - uključena u sastavljanje podjedinica i alosteričku regulaciju
- ligand-vezujuća domena (**LBD**) - veže glutamat, glicin ili D-serin
- transmembranska domena (**TMD**) - čini poru ionskog kanala
- unutarstanična C-terminalna domena (**CTD**) – signalizacija i mobilizacija receptora
- tetramerni kompleks - domene ATD i LBD od dvije različite podjedinice spajaju se u dimere i cjeloviti receptor funkcionira kao „dimer dimera“



Konfiguracija podjedinica i domena GluN1/Glu2B NMDAR (GluN1 podjedinice u plavoj i GluN2B u narančastoj boji).

# Amino terminalna domena

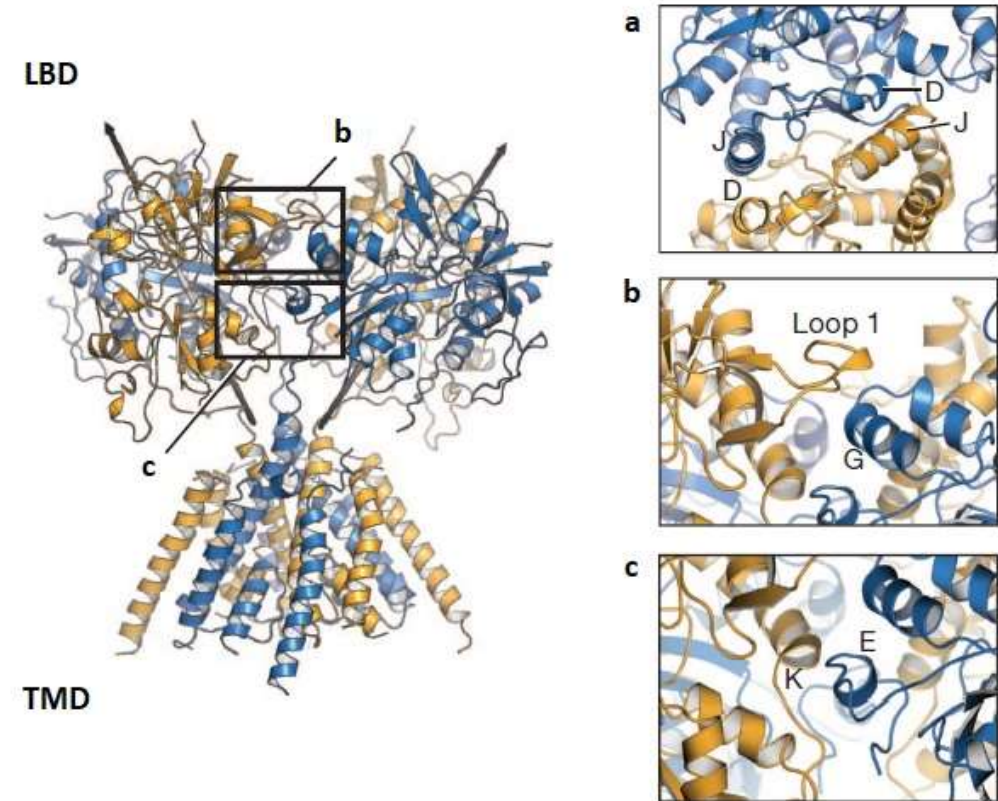
- režnjevi R1 i R2 smješteni iznad LBD
- heterodimeri nalikuju obliku školjke
- kut između dva heterodimera varira od  $59^\circ$  do  $84^\circ$  oko osi simetrije - alosterička modulacija ionskog kanala



Slikovni prikaz sadrži dva heterodimera ATD, jedan heterodimer LBD i TMD GluN1 podjedinice.

# Ligand-vezujuća domena

- sadrži mjesta vezanja liganada
- važne regije uključene u promjenu konformacije “školjke”:
  - intradimerne regije D1-D1 – hidrofobne aminokiseline zavojnica D i J
  - dvije interdimerne regije:
    - zavojnica G podjedinice GluN1 prvog dimera i omča 1 na podjedinici GluN2B drugog dimera
    - zavojnica K podjedinice GluN2B prvog dimera i zavojnica E podjedinice GluN1 drugog dimera

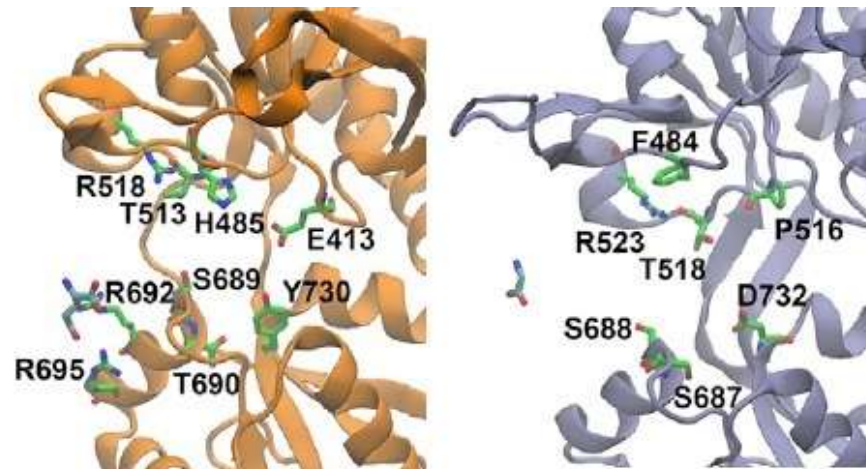


Prikaz regija LBD i TMD receptora GluN1/GluN2B; uokvirena područja a, b i c predstavljaju redom intradimernu regiju D1-D1 i dvije interdimerne regije LBD.



# Vežanje glutamata i glicina

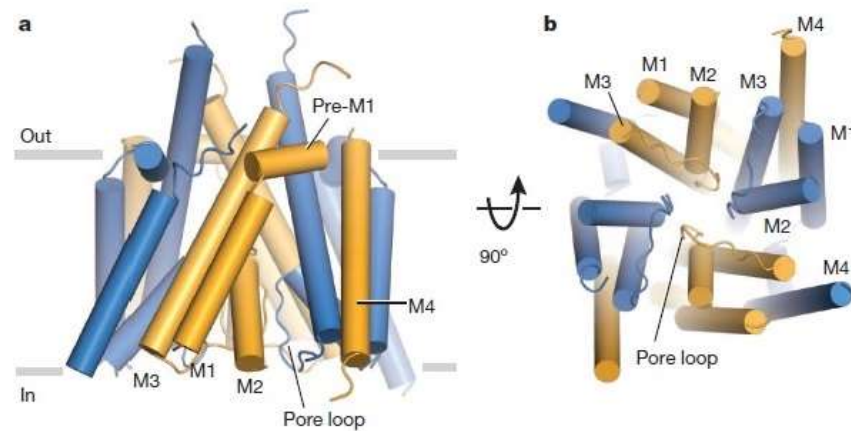
- vežu se na receptor različitim mehanizmima unatoč sličnosti struktura podjedinica GluN1 i GluN2A
- glutamat: interakcije s Arg na pozicijama 692 i 518 zavojnice E GluN2A, zatim ulazak u džep za vežanje i stvara interakcije s Arg 518, Ser 511, Thr 513 i His 485
- glicin: interakcije s Arg 523, a zatim Phe 484 i Thr 518 podjedinice GluN1



Vežna mjesta glutamata (lijevo) i glicina (desno) i aminokiseline s kojima stvaraju interakcije.

# Transmembranska i C-terminalna domena

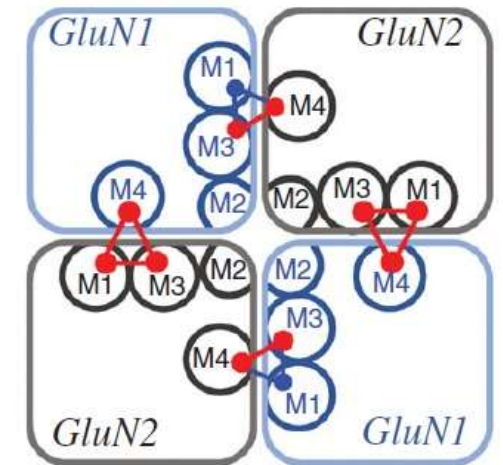
- četverostruka simetrija TMD - četiri zavojnice M1-M4 + regija pre-M1 koja formira „ogrlicu“ oko zavojnice M3
- zavojnice M3 imaju piramidalni oblik i čine fizičku prepreku pri prolasku iona kroz poru
- CTD - služi za signalizaciju sekundarnim glasniciima, mobilizaciju i usidrenje receptora, eksport iz ER...
- regija velike raznolikosti među podjedinicama NMDAR – alternativno prekrajanje



Prikaz transmembranske domene. a: pogled na TMD paralelno s membranom; b: pogled duž osi pore, sa citoplazmatske strane membrane.

# Mehanizam otvaranja kanala

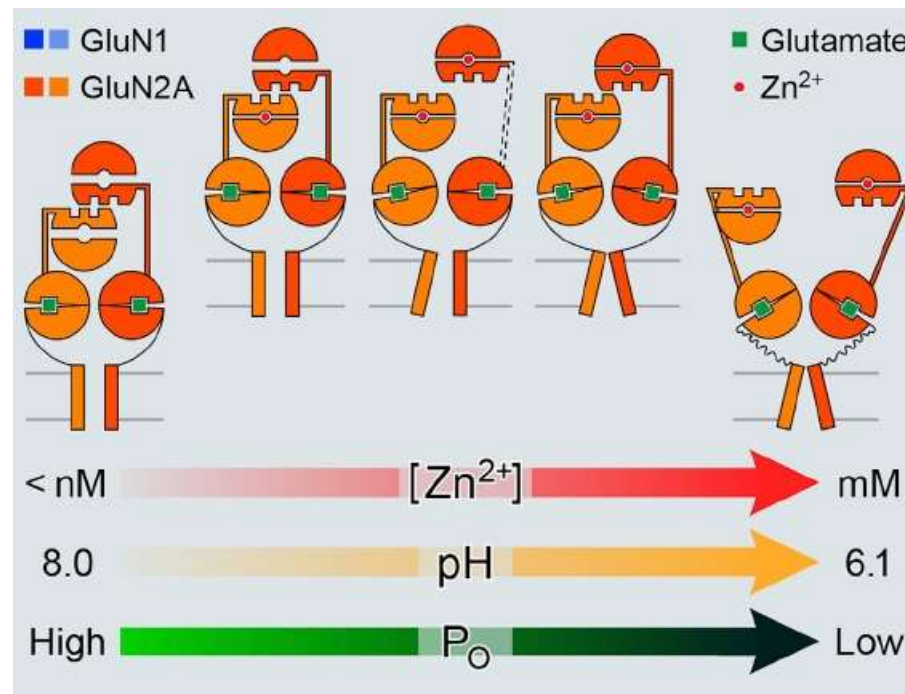
- potrebno vezanje i glicina i glutamata
- ion  $Mg^{2+}$  blokira kanal ovisno o naponu– potrebna prethodna depolarizacija stanice
- ulaz kationa u stanicu uzrokuje depolarizaciju i dodatni ulaz iona  $Ca^{2+}$  u neuron putem aktivacije kalcijevih kanala ovisnih o naponu (VGCC) → propagacija živčanog impulsa duž aksona
- $Ca^{2+}$  djeluje i kao sekundarni glasnik koji aktivira nizvodne signalne kaskade
- spora konformacijska promjena receptora - tri motiva unutar dvije konzervirane trijade
  - korak koji ograničava brzinu aktivacije



Shematski prikaz tri ključna motiva u trijadama regije TMD.

# Alosterički modulatori

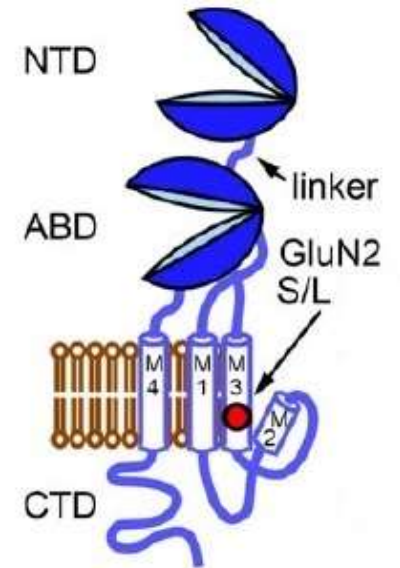
- vezanje niza fiziološki relevantnih koncentracija iona cinka i protona izaziva strukturne promjene koje utječu na vjerojatnost otvorenosti receptora ( $P_o$ ) i suženje vrata ionskog kanala



Slikovni prikaz konformacija podjedinice GluN2A.

# Važnost podjedinice GluN2

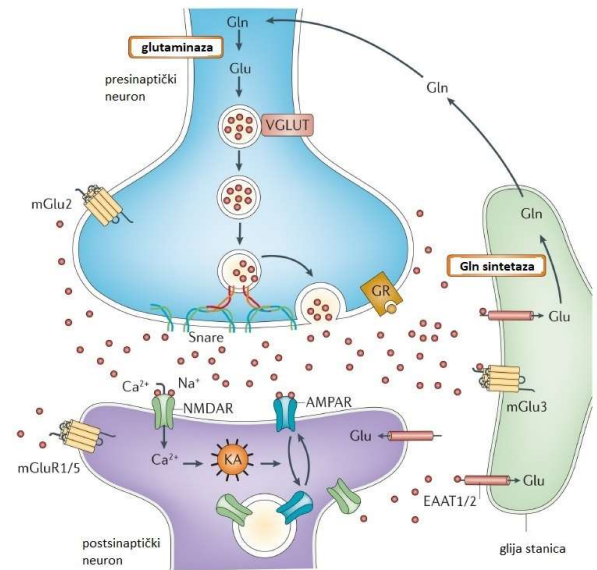
- malo je poznato o mehanizmima koji uvjetuju raznolikost svojstava podtipova NMDAR
- kinetika deaktivacije, potencija agonista, propusnost iona  $\text{Ca}^{2+}$ , ovisnost otvaranja kanala o naponu, osjetljivost na blok ionom  $\text{Mg}^{2+}$ ...
- čini se da najviše ovise o podjedinici GluN2:
  - varijacije na domeni ATD i poveznici regija ATD i LBD (engl. *ATD-LBD linker*) -  $\text{Zn}^{2+}$  u GluN2A koordiniran s His i Glu, a u GluN2B s dva His i Asn
  - mjesto GluN2 S/L na zavojnici M3 TMD – receptori sa Ser 632 pokazuju svojstva GluN2A, a s Leu 657 GluN2D



Shematski prikaz jedne podjedinice GluN2 NMDA receptora s ključnim funkcionalnim domenama.

# Stanična lokalizacija

- sastav podjedinica se razlikuje ovisno o regijama mozga i razvojnim fazama
- NMDAR uobičajeno unutar sinaptičkog terminala, no može biti i peri- i ekstrasinaptički
- presinaptički i postsinaptički
- različite uloge u neurotransmisiji, razvoju neurona, učenju i pamćenju, kao i neurološkim poremećajima
  - mikrookoliš uvjetuje interakcije s različitim adaptornim, citoskeletnim i signalnim proteinima
- lateralna difuzija receptora između sinaptičkih i ekstrasinaptičkih mjesta (GluN2B)
- „bazeni“ s atipičnim (GluN2C ili GluN3) podjedinicama u astrocitima i oligodendrocitima



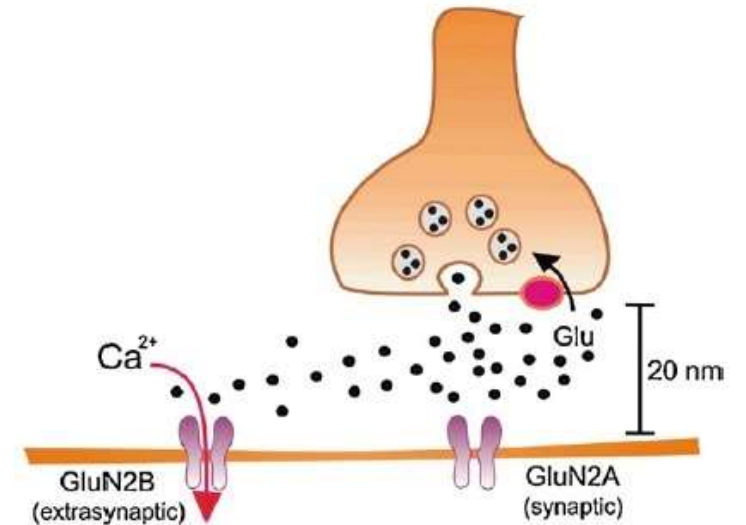
# Uloga NMDA receptora

---

u epileptičnom statusu  
u oksidacijskom stresu  
u neuropeptidnim procesima

# U epileptičnom statusu

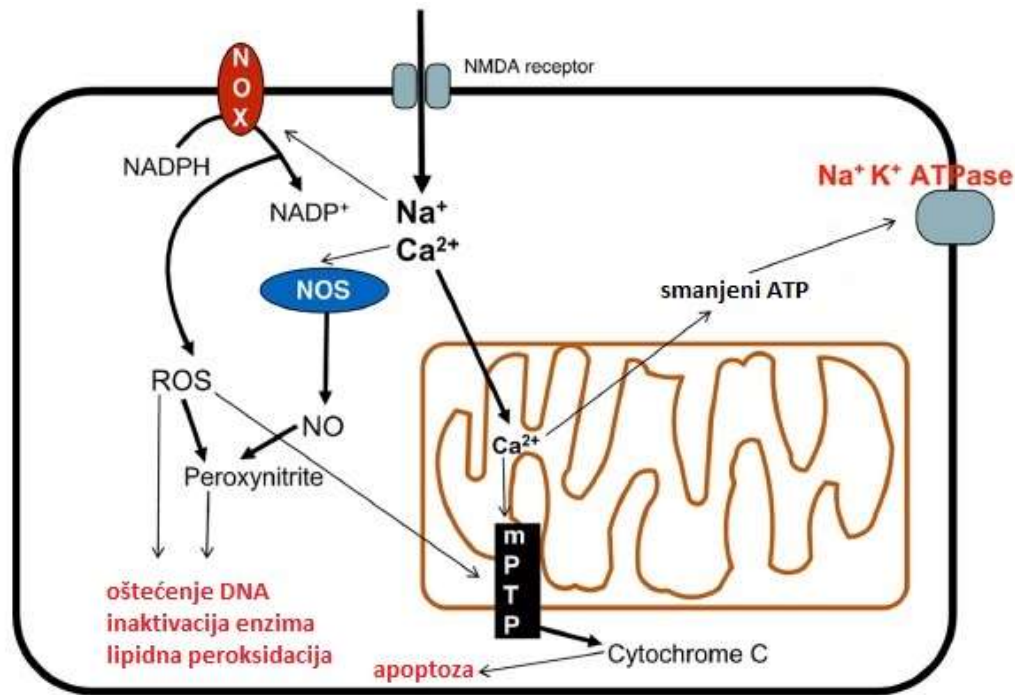
- napadaj koji traje od 5 do 10 minuta ili više napadaja zaredom prilikom kojih osoba ne dolazi k svijesti
- mehanizmi povezanosti kolinergičkog i glutamatergičkog sustava još nisu razjašnjeni
- progresivni razvoj farmakorezistencije – smanjena učinkovitost terapije
- internalizacija inhibitornih GABA receptora i povećanje broja NMDAR
- ekscesivni glutamat uzrokuje ulazak  $\text{Ca}^{2+}$  i kroz ekstrasinaptičke NMDAR koji sadrže podjedinicu GluN2B
- indukcija apoptoze
- **blokatori NMDAR** ostaju vrlo učinkoviti u zaustavljanju napadaja - ketamin



Sinaptička (GluN2A) i ekstrasinaptička (GluN2B) lokalizacija NMDA receptora.



# U oksidacijskom stresu

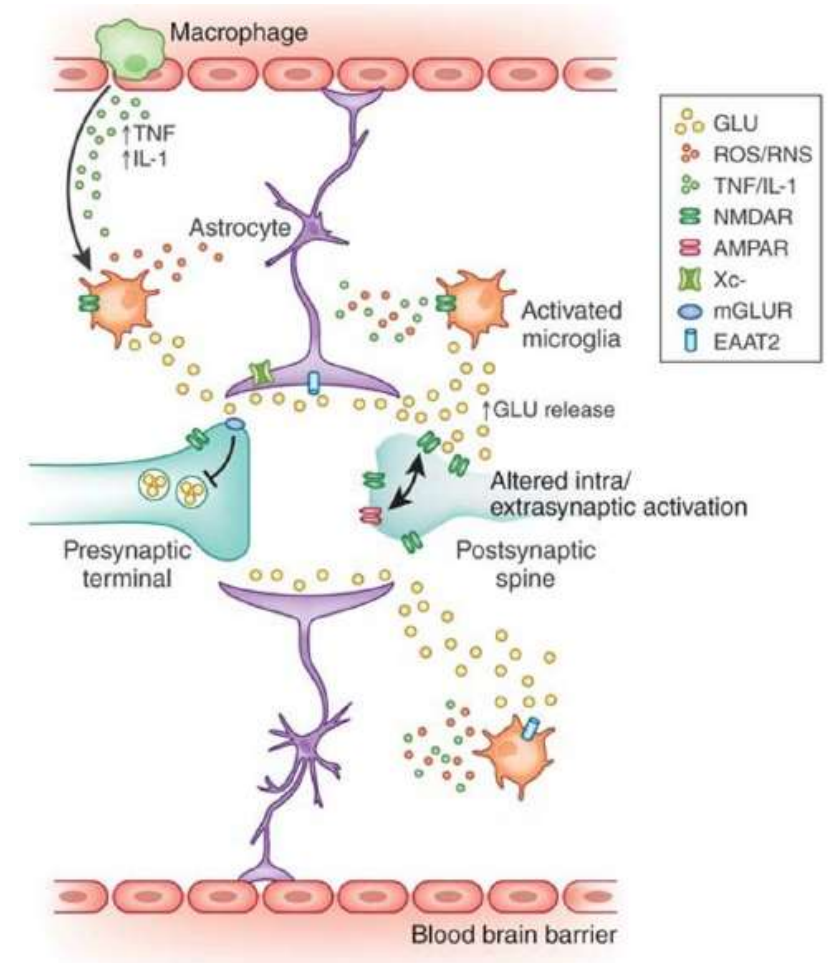


Prikaz mehanizama koji vode sintezi reaktivnih vrsta i apoptozi stanice nakon povećanog ulaska kalcija putem NMDA receptora.

- **ekscitotoksičnost** - pretjerana ekscitacija glutamatom vodi do oksidacijskog stresa i degeneracije neurona
- sinteza reaktivnih kisikovih i dušikovih vrsta (ROS/RNS)
- izvori: mitohondriji (putem lanca transporta elektrona), NADPH oksidaza (NOX) i sintaza dušikovog oksida (NOS)
- PSD-95 je poveznica NOS i NMDAR - veže se na CTD podjedinice GluN2B putem domene PDZ1 i na NOS putem domene PDZ2
- nova terapija katalitičkim antioksidansom - **AEOL 10150**

# U neuroupalnim procesima

- dugotrajne posljedice - kognitivne disfunkcije i spontani ponavljajući napadaji
- interleukin 1 (IL-1 $\beta$ ) i faktor nekroze tumora alfa (engl. *tumour necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ )
- aktivacija glija stanica, oslobađanje signalnih molekula NO i arahidonske kiseline, stvaranje drugih upalnih citokina
- interakcije receptora interleukina 1 (IL-1RI) i NMDAR
- ionski kanal **TRPV4** (engl. *transient receptor potential vanilloid 4*) – nova meta za terapiju



Prikaz sinapse i međudjelovanja astrocita, mikroglia i neurona u neuroupalnom odgovoru.

# Zaključak

- jedan od najtežih simptoma akutnog trovanja je pojava teških epileptičnih napadaja – intenzivna aktivnost jednog od najbrojnijih receptora glutamata, NMDAR
- Pretjerana ekscitacija glutamatom uzrokuje ekscitotoksičnost i aktivaciju neuroupalnog odgovora koji vode do dugotrajnih neuroloških oštećenja i pojave ponavljajućih epileptičnih napadaja
- djelotvornost terapija se smanjuje kako vrijeme odmiče od trenutka trovanja i razvija se farmakorezistencija
- nasuprot benzodiazepinima, antagonisti NMDAR ostaju vrlo učinkoviti u zaustavljanju napadaja
- brojne nepoznanice o mehanizmima otvaranja receptora i veznim mjestima antagonista NMDAR
- razvoj efikasnih terapija za liječenje trovanja OP spojevima

**HVALA NA PAŽNJI!**

---