



**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS
UMH-CSIC**



Instituto de Neurociencias
Universidad Miguel Hernández
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

***LOS LÍPIDOS SEÑAL COMO REGULADORES DE LA EXOCITOSIS EN
CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS***

Memoria de tesis doctoral presentada por
Virginia García Martínez
San Juan de Alicante, Julio de 2013

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE ALICANTE

Unidad de Neurobiología Molecular
Universidad Miguel Hernández
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



TESIS DOCTORAL

***LOS LÍPIDOS SEÑAL COMO REGULADORES DE LA EXOCITOSIS EN
CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS***

VIRGINIA GARCÍA MARTÍNEZ

Directores de tesis

Prof. Luis Miguel Gutiérrez Pérez, Dr. José Heliodoro Villanueva Roig

San Juan de Alicante, Octubre de 2013



D. José Villalaín Boullón, Director del Departamento de Bioquímica y Biología de la Universidad Miguel Hernández,

Da su conformidad a la lectura de la Tesis Doctoral presentada por Dña. Virginia García Martínez que lleva por título “**LOS LÍPIDOS SEÑAL COMO REGULADORES DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**”.

Y para que así conste a los efectos oportunos, emite el siguiente informe en el Campus de San Juan en Alicante a 25 de Octubre de 2013

Dr. José Villalaín Boullón
Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



D. Luis Miguel Gutiérrez Pérez, Catedrático del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández; y **D. José Heliodoro Villanueva Roig**, Profesor Asociado del área de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Miguel Hernández.

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral que lleva por título: “**LOS LÍPIDOS SEÑAL COMO REGULADORES DE LA EXOCITOSIS EN CÉLULAS CROMAFINES BOVINAS**” presentada por Dña. Virginia García Martínez para aspirar al grado de Doctor, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Neurociencias de la Universidad Miguel Hernández-CSIC.

Y para que así conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en el Campus de San Juan en Alicante a 25 de Octubre de 2013.

Prof. Luis Miguel Gutiérrez

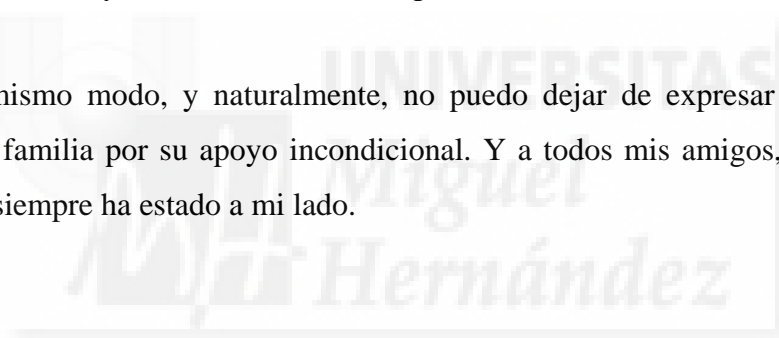
Dr. José Heliodoro Villanueva Roig

En primer lugar quisiera expresar mi agradecimiento al Profesor Luis Miguel Gutiérrez Pérez, por la oportunidad que me ha brindado de llevar a cabo la tesis doctoral bajo su dirección. Sin su ayuda nunca habría sido posible este proyecto.

También quisiera darle las gracias al Doctor José Heliodoro Villanueva Roig, por ayudarme en el laboratorio siempre que lo he necesitado. Así como al Profesor Salvador Viniegra por su apoyo.

No podría olvidarme de todos mis compañeros de laboratorio que siempre me han ayudado y apoyado: Cristina Torregrosa, Mar Francés, Inmaculada López, Mar Castillo, Pep Mullet, y como no Giovanna Expósito.

Del mismo modo, y naturalmente, no puedo dejar de expresar un millón de gracias a mi familia por su apoyo incondicional. Y a todos mis amigos, en especial a Marisol que siempre ha estado a mi lado.

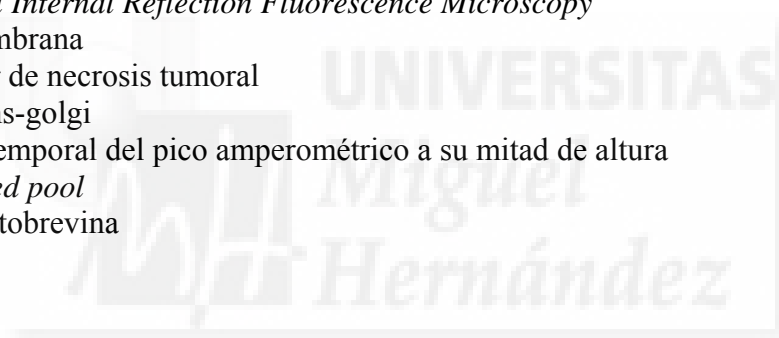


A Pedro Amadeo García Mellado, mi padre



AA ácido araquidónico
Ach acetilcolina
ADP bifosfato de adenosina
AMPc monofosfato cíclico de adenosina
APS persulfato amónico
ATP trifosfato de adenosina
BDNF *brain-derived neurotrophic factor*
BSA albúmina sérica bovina
CAPP *ceramide-activated protein phosphatase*
CAPS proteínas activadas por calcio para la secreción
CCDV canales de calcio dependientes de voltage
COX ciclooxigenasas
cPLA₂ PLA₂ citoplasmática sensible a Ca⁺²
CTP fosfocolina citidiltransferasa
DAG diacilglicerol
DHA ácido docohexanoico
DMEM medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO dimetil sulfóxido
DRMs membranas resistentes a detergentes
Fall (25-75) tiempo comprendido entre el 25 y 75 % de la fase de decaimiento de las espigas amperométricas
FBS suero bovino fetal
FRAP técnica de microscopía de fotoblanqueo
FRET transferencia de energía resonante de Förster ó transferencia de energía resonante fluorescente
FTY720 fingolimolide
GMP_C monofosfato cíclico de guanosina
GTP trifosfato de guanosina
HEPES 1-piperazina-etanosulfónico
IL-1β interleukina 1 beta
Imax altura máxima del evento, amplitud
IP₃ inositol trifosfato
iPLA₂ PLA₂ intracelular no sensible a Ca⁺²
IRP *immediately releasable pool*
LOX lipoxigenasas
MP membrana plasmática
MSD desplazamiento cuadrático medio
MV membrana vesicular
NA naranja de acridina
NF-kB factor nuclear kB
NPC1 enfermedad de Nieman–Pick tipo C1
NO óxido nítrico
NT neurotransmisor
PA ácido fosfatídico
PGI₂ prostagladina 2
Pi fosfato libre
PI fosfoinositoles
IP3 inositol 1,4,5-trifosfato
PIP2 fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PKA protein quinasa A

PKC proteína quinasa C
PLA₂ fosfolipasa A₂
PLA₂s fosfolipasas A 2
PLC fosfolipasa C
PLD fosfolipasa D
PUFAs ácidos grasos poliinsaturados
Q integral de la espiga
RIMs *Rab-interacting molecules*
Rise (25-75) tiempo comprendido entre el 25 y 75 % de la fase de crecimiento de las espigas amperométricas
ROS especies reactivas de oxígeno
RP *reserve pool*
RRP *ready release pool*
SDS dodecilsulfato de sodio
SMase esfingomielinasa
SNAP25 proteína de 25 kDa asociada a sinaptosomas
SRP *slowly releasable pool*
STED *Stimulated Emission Depletion Microscopy*
TEMED N, N, N', N'-tetrametiletildiamina
TIR reflexión total interna
TIRFM *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*
TM transmembrana
TNF- α factor de necrosis tumoral
TNG red trans-golgi
 $t_{1/2}$ anchura temporal del pico amperométrico a su mitad de altura
UPP *unprimed pool*
VAMP sinaptobrevina



ÍNDICE



INTRODUCCIÓN	1
1.1. La exocitosis	1
1.2. Acoplamiento excitación-secreción	3
1.3. Etapas de la exocitosis	5
1.4. Proteínas SNARE. Hipótesis SNARE	7
1.5. Proteínas reguladoras del complejo SNARE	11
1.5.1. Proteínas SM	11
1.5.2. Proteínas Munc-13 y Rab	15
1.5.3. CSP α y sinucleinas	17
1.6. Física de la fusión de membranas. El poro de fusión	19
2. Lípidos señal	28
2.1. Ácidos grasos poliinsaturados	28
2.2. La ceramida y sus metabolitos	32
2.2. Lípidos señal y exocitosis	34
2.2.1. Las fosfolipasas A ₂ , C y D en la exocitosis regulada	34
2.2.2. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs)	35
2.2.3. Lipasa RBO	36

2.2.4. Ceramida y sus metabolitos	37
OBJETIVOS	40
MATERIALES Y MÉTODOS	41
1. Preparaciones celulares	41
1.1. Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas	41
1.1.1. Obtención y preparación del tejido	41
1.1.2. Digestión de la médula con colagenasa	41
1.1.3. Dispersión mecánica de la médula	42
1.1.4. Gradiente de Percoll	42
1.1.5. Recuento celular	42
1.1.7. Siembra de las células	43
2. Microscopía confocal de células cromafines en cultivo	43
2.1. Marcaje de balsas lipídicas en células cromafines bovinas	43
2.2. Visualización de lípidos señal en la membrana plasmática de células cromafines bovinas	44
2.2. Microscopía confocal	45
2.3. Análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal	46

3. Técnicas básicas de manipulación y clonaje del ADN	46
3.1. Generación de los constructos pEGFP-C3-SNAP-25 y pDsRed-C3-SNAP-25, y transfección de células cromafines	46
3.2. Preparación y análisis del ADN	47
3.2.1. Preparación de células competentes	47
3.2.2. Transformación de células competentes	48
3.2.3. Chequeo de las colonias obtenidas	48
3.2.4. Purificación del ADN a pequeña escala	49
3.2.5. Cuantificación del ADN	49
3.2.6. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	49
3.2.7. Electroforesis del ADN	49
3.2.8. Amplificación y purificación del ADN a mayor escala	50
4. Transfección de células cromafines bovinas	51
5. Obtención de una variante no tóxica de lisenina en <i>E. coli</i> . (Venus-poliHis-Tag lisenin)	52
5.1. Expresión y purificación de Venus-poliHis-Tag lisenin en <i>E. coli</i> .	52
5.2. Comprobación de la expresión proteica	53
5.3. Determinación de la concentración de proteínas	54

5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS	54
5.5. Tinción de geles	55
5.6. Webstern blot e inmuohistoquímica	56
6. Microscopía de luz evanescente en células cromafines en cultivo: TIRFM	56
6.1. Estudio de la movilidad de los microdominios formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25 en células cromafines en cultivo	58
6.2. Estudio de la movilidad de las vesículas cromafines en células sin transfectar	59
6.3. Análisis del movimiento lateral de las vesículas y de los parches de expresión de las proteínas SNARE	59
6.4. Análisis del movimiento axial de las vesículas y de los parches de expresión de las proteínas SNARE	60
7. Análisis de las fusiones vesiculares	62
8. Determinación amperométrica de la exocitosis en células cromafines cultivadas	64
8.1. Características del equipo de registro	64
8.2. Fabricación de los electrodos de fibra de carbono	66
8.3. Análisis de los datos amperométricos	66

9. La técnica de FRET	68
9.1. Análisis de las imágenes de FRET	68
10. Análisis estadístico	69
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
1.1. Microdominios ricos en esfingomielina de la membrana plasmática colocan con clusters de SNAREs marcados por sobreexpresión de SNAP25-DsRed	70
1.2. Los lípidos señal colocan parcialmente con los microdominios de SNARE marcados por sobre-expresión de SNAP25-DsRed	75
1.3. El movimiento de los microdominios de SNAREs resulta afectado por la presencia de lípidos señal	81
1.4. La dinámica de vesículas cromafines en la proximidad de los sitios activos es alterada por los lípidos señal	84
1.5. La fusión de las vesículas cromafines estudiada por métodos ópticos resulta afectada por el tratamiento celular con lípidos señal	86
1.6. La fusión vesicular estudiada por amperometría es afectada por el tratamiento con lípidos señal	89
1.7. El FTY720 es un análogo de esfingosina que estimula la formación de complejos SNARE	93
1.8. El FTY720 afecta la dinámica de los complejos SNARE	97

1.9. FTY720 imita la acción de los lípidos señal sobre la fusión vesicular	100
CONCLUSIONES	106
BIBLIOGRAFÍA	108



INTRODUCCIÓN



1.1. La exocitosis.

En células eucariotas el tráfico de vesículas secretoras hacia la membrana plasmática es esencial para el funcionamiento de la célula. A su vez, el tráfico de vesículas es la base de la comunicación intracelular en organismos multicelulares, debido a la liberación de una amplia gama de moléculas señal y estructurales.

Existen dos tipos de exocitosis, la constitutiva y la regulada. La exocitosis constitutiva es esencial para la renovación de la membrana plasmática y por lo tanto se da en todos los tipos celulares. Además, mediante este tipo de exocitosis son secretadas un gran número de moléculas al medio extracelular, como por ejemplo las proteínas plasmáticas, los anticuerpos y los componentes de la matriz extracelular (Burgess y Kelly, 1987; Kelly, 1985). Por el contrario, la exocitosis regulada está sujeta a un estricto control celular, de modo que únicamente se produce la fusión de vesículas con la membrana plasmática tras el estímulo adecuado (Ca^{+2} , AMPc, GMPc, diacilglicerol, inositol fosfato, GTP) (Thomas y col., 1993).

La exocitosis regulada se da en neuronas, dónde nos encontramos con vesículas sinápticas de liberación rápida que median la neurotransmisión, y/o con gránulos electrodensos cuya exocitosis puede ser independiente del mecanismo por el que se liberan las vesículas sinápticas. Otros tipos celulares también presentan gránulos electrodensos para llevar a cabo una gran diversidad de funciones fisiológicas, como las células neuroendocrinas, endocrinas y exocrinas (Zucker, 1996). Éstos tipos celulares han sido empleados como sistemas modelo para el estudio de la exocitosis regulada debido a su importancia fisiológica y a ventajas a la hora de realizar experimentos con ellos.

Actualmente, los tipos celulares más estudiados han sido las células cromafines de la médula adrenal como modelo experimental tanto bioquímico como electrofisiológico, así como la línea PC12, las células beta-pancreáticas, células hematopoyéticas como los mastocitos, las plaquetas y los neutrófilos (Stinchcombe y Griffiths, 1999). También existen células especializadas en la secreción en tejidos predominantemente no secretores, como es el caso de el corazón, el pulmón y los riñones. Así como, encontramos un tipo inusual de exocitosis especializada en el esperma y ovocitos.

Ciertos tipos de células neuroendocrinas y endocrinas se encuentran en tejidos especializados para la secreción, cómo la pituitaria, las glándulas adrenales y el

páncreas. En otros casos son las células menos abundantes de un tipo concreto de tejido como ocurre con las células G de la mucosa gástrica que secretan gastrina, las células juxtaglomerulares de los riñones que secretan renina, las células alveolares de tipo II de los pulmones, responsables de la secreción de surfactantes, las células calciformes de pulmones e intestino que secretan mucosas. También hay células con una función principal diferente a la secreción que presentan exocitosis regulada, como es el caso de las células epiteliales para la liberación de los cuerpos de Weibel-Palade. Otro tipo celular que presenta secreción son las células epiteliales mamarias. Éstas células producen y secretan grandes cantidades de proteínas que contiene la leche, como la caseína, mediante exocitosis constitutiva y regulada por Ca^{+2} .

La vía de la exocitosis regulada es diferente de la vía de la exocitosis constitutiva, ya que si no las sustancias que deben liberarse bajo un estricto control fisiológico, mediante la exocitosis regulada, pasarían a exocitarse de forma constitutiva. Para ello las células presentan los gránulos secretores. En el caso concreto de células neuronales, neuroendocrinas y exocrinas los gránulos inmaduros se forman en el trans-Golgi (TGN), y posteriormente se produce la maduración de dichos gránulos. A diferencia de las vesículas de transporte, el proceso de formación de gránulos secretores en el TGN parece no estar mediado por proteínas de cubierta (clatrina). La formación de gránulos secretores esta mediada por la deformación de la membrana como consecuencia de la agregación de proteínas de secreción. En el caso de las células cromafines la cromogranina A es imprescindible para la formación de los gránulos. La capacidad de agregación de la cromogranina, junto con su tendencia a interactuar con las membranas, contribuye al mecanismo de formación de gránulos en el TNG. Sin embargo la cromogranina A únicamente se expresa en células neuronales y endocrinas, por lo que otro tipo de proteínas llevan a cabo esta función en el resto de tipos celulares (proteoglicanos asociados a la membrana del gránulo formando una matriz glucídica interna, capaz de acumular altas concentraciones sin generar un excesivo efecto osmótico). Otro compuesto esencial para la formación de gránulos es el colesterol. El colesterol facilita la curvatura negativa en las membranas y por lo tanto la gemación/formación de apéndices en la membrana (Wang y col., 2000). Por otro lado, el colesterol es el componente principal de los *lipid rafts*, y juega un papel directo ó indirecto en el reclutamiento de proteínas asociadas a los *lipid rafts* que llevan a cabo la escisión de la membrana. Una vez formado el gránulo inmaduro, éste pasa por un proceso de remodelación para dar lugar a un gránulo secretor maduro. En células

endocrinas y neuroendocrinas este proceso consiste en la fusión de unos gránulos inmaduros con otros, y la eliminación de material por gemación (Tandon y col., 1998), lo que se denomina fusión homotípica. En células PC12 la fusión entre gránulos inmaduros lleva a la formación de gránulos maduros de mayor tamaño y más densos, este proceso es llevado a cabo por las proteínas SNAREs (Urbe y col., 1998). Para que un gránulo pueda fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al medio extracelular, fusión heterotípica, las SNAREs responsables de la fusión homotípica deben ser excluidas de la membrana para que se forme el gránulo maduro (Eaton y col., 2000). La fusión del gránulo maduro con la membrana plasmática se producirá como respuesta a un estímulo de Ca^{+2} .

1.2. Acoplamiento excitación-secreción.

El término estímulo-secreción fue asentado hace 50 años mediante la experimentación con células cromafines. Las células cromafines se encuentran en el interior de las glándulas suprarrenales. En respuesta al estrés, estas células son las responsables de liberar al torrente sanguíneo adrenalina y noradrenalina para mantener el cuerpo en estado de alerta. Este tipo celular se ha empleado durante décadas como modelo en el estudio del mecanismo de la secreción, pudiendo extrapolarse los resultados a células neuronales ya que derivan del mismo tejido embrionario que las cromafines (Fujita, 1977).

La secreción de catecolaminas por las glándulas suprarrenales se encuentra regulada por el sistema nervioso parasimpático, concretamente las glándulas suprarrenales están inervadas por el nervio esplácnico. Las terminaciones nerviosas del nervio esplácnico liberan acetilcolina (ACh), que es el neurotransmisor que excita a las células cromafines (Feldberg y col., 1934; Feldberg & Mintz, 1932). A principios de los años 60 Douglas y sus colaboradores observaron que la respuesta secretora de las glándulas suprarrenales se inhibía en ausencia de Ca^{+2} en el medio extracelular, a su vez comprobaron que la secreción iba siempre acompañada de la entrada de Ca^{+2} al espacio intracelular. Estos experimentos, junto con otras observaciones, llevaron a Douglas y sus colaboradores a acuñar el término “estímulo-secreción” como la respuesta a un estímulo del tejido neuronal, neuroendocrino y endocrino para liberar neurotransmisores y/u hormonas (Douglas, 1968). La ya mencionada exocitosis regulada que es mediada por Ca^{+2} .

Debido a la fácil disponibilidad de las células cromafines, sobretodo de la especie bovina, a que derivan del mismo tejido embrionario que las células nerviosas parasimpáticas, y a la facilidad con la que se aíslan para realizar un cultivo primario (Livett, 1984), las células cromafines se han empleado en infinidad de estudios bioquímicos, electrofisiológicos y farmacológicos. Otro motivo por el que las células cromafines se han empleado tanto en la investigación de la fusión es debido a su gran tamaño. El gran tamaño de las células cromafines permite cuantificar la cantidad de neurotransmisor liberado por capacitancia directamente en la membrana presináptica, mientras que en la mayor parte de sinapsis del sistema nervioso central únicamente se pueden detectar los potenciales postsinápticos (Becherer y Rettig, 2006). Además, el gran tamaño de los gránulos cromafines permite realizar experimentos de TIRFM (Total Internal Reflexion Microscopi) (Steyer y Almers, 2001). Los resultados obtenidos en células cromafines se han extrapolado con éxito a mecanismos básicos de neurotransmisión tanto en el sistema nervioso central como periférico (García y col.; 2012).

Debido a que en las células cromafines la respuesta a un estímulo es mediada por Ca^{+2} , éste tipo celular se ha empleado como modelo de referencia para estudiar la exocitosis dependiente de Ca^{+2} (Neher, 1998). Además, la célula cromafín contiene todos los elementos requeridos para un estricto control, tanto espacial como cinético, de la exocitosis mediada por Ca^{+2} (Burgoyne & Morgan, 2003). En este sistema celular Neher y colaboradores establecieron, mediante experimentos de flash-fotólisis combinados con capacitancia, los diferentes estados de las vesículas secretoras (Neher & Zucker, 1993).

La Ach estimula receptores colinérgicos nicotínicos (ionotrópicos) y muscarínicos (metabotrópicos). Sin embargo, en la célula cromafín la respuesta secretora está dominada por la acción de la ACh sobre el receptor nicotínico (Douglas & Rubin., 1961). La activación del receptor nicotínico implicará la despolarización de la membrana, y el potencial de acción generado activará la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) (García y col., 1984). Por estos canales se producirá una entrada masiva de Ca^{2+} desde el espacio extracelular que disparará la secreción de catecolaminas (Artalejo y col., 1994). El Ca^{+2} intracelular se redistribuye tanto en el citosol como en el resto de orgánulos celulares, por lo que para comprender el mecanismo de la exocitosis se tiene que conocer cómo funciona la homeostasis del Ca^{+2} intracelular (Garcia-Sancho & Verkhratsky, 2008).

1.3. Etapas de la exocitosis.

Durante la exocitosis en la membrana presináptica la formación, el tráfico, la fusión y el reciclado de las vesículas sinápticas se encuentra bajo el control de numerosos sistemas de señalización intra y extracelulares (Südhof, 2004; Becherer & Rettig, 2006). Las etapas de la exocitosis comprenden los siguientes estadios (Figura 1):

- Generación de las vesículas en el aparato de Golgi.
- El neurotransmisor es transportado de forma activa al interior vesicular.
- Las vesículas son transportadas a la zona activa.
- Las vesículas atracan en la zona activa (*docking*).
- Las vesículas se preparan para la fusión, lo que se denomina maduración (*priming*).
- Apertura del poro de fusión inducida por Ca^{+2} .
- Endocitosis y reciclado de las vesículas que han fusionado.

Dependiendo del estado en el que se encuentra un grupo de vesículas, así como dependiendo del estímulo que las hace ser excitadas y de su cinética de fusión, las vesículas se han clasificado en poblaciones (Südhof, 2004; Becherer y Rettig, 2006):

- RP (*reserve pool*): se corresponde con la población mayoritaria de vesículas, el conjunto de vesículas más alejado de la membrana plasmática. Su migración hacia la membrana es lenta y requiere la ayuda del citoesqueleto.
- UPP (*unprimed pool*): son vesículas que ya están en la membrana plasmática (*docked*) pero que todavía no han pasado por el proceso de maduración (*priming*) y por lo tanto no son competentes para la fusión.
- SRP (*slowly releasable pool*): son vesículas que se encuentran atracadas en la membrana plasmática y que han comenzado con el proceso de maduración.
- IRP (*immediately releasable pool*) o RRP (*ready release pool*): son vesículas maduras preparadas para la fusión exocitótica. Ha sido propuesto que IRP y RRP forman una población homogénea con idéntica competencia para la fusión pero con distinta proximidad a agrupaciones de canales de calcio, en otras palabras, IRP sería

una población de RRP localizada cerca de agrupaciones de CCDV (canales de calcio dependientes de voltage).

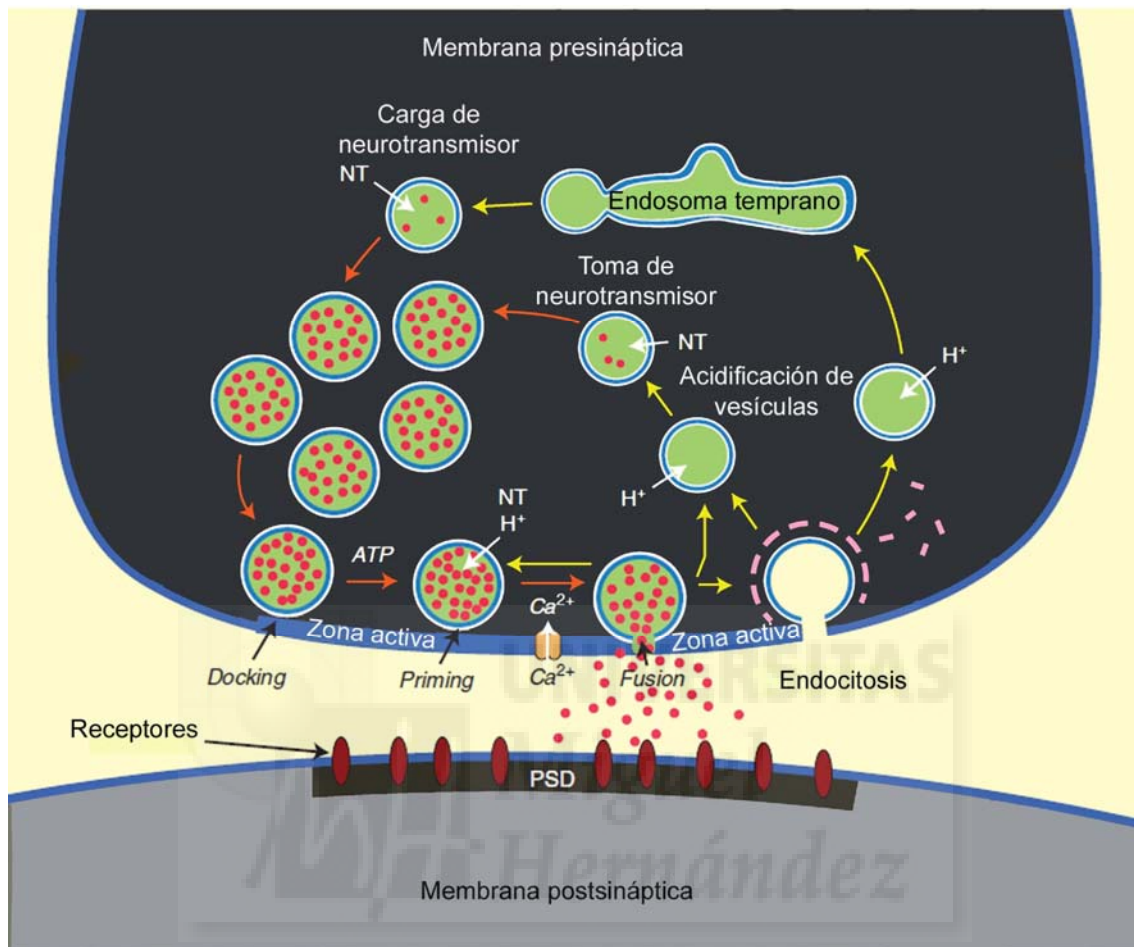


Figura 1. Etapas de la exocitosis regulada. Representación de los nueve pasos que componen el ciclo vesicular sináptico que se desarrolla en el terminal nervioso presináptico (Südhof & Rizo, 2011).

Estas poblaciones han sido establecidas a partir de estudios realizados en sistemas donde la presinapsis es anormalmente grande, como el cáliz de Held (Schneggenburger y col., 2002) y la sinapsis bipolar del pez dorado (Gersdorff & Matthews, 1999), así como en estudios de sistemas neuroendocrinos, donde podemos destacar los estudios realizados con células cromafines (Rettig & Neher, 2002; Sørensen J.B., 2004).

1.4. Proteínas SNARE. Hipótesis SNARE.

Desde que se descubrieron los receptores de proteínas SNAP (SNARE), éstas han sido reconocidas como componentes clave de los complejos proteicos que median la fusión entre membranas. Crecientemente las evidencias muestran que las proteínas SNARE median la fusión en todos los pasos del mecanismo secretor. De acuerdo con el modelo actual, las SNAREs se encuentran en las membranas opuestas que van a fusionar, y se considera que dirigen la fusión empleando la energía que se libera durante la formación del complejo cuaternario (*four-helix bundle*). Como consecuencia de la formación del complejo SNARE las membranas destinadas a fusionar se aproximan al máximo, comenzando la fusión de membranas (Jahn & Scheller, 2006).

Las proteínas SNARE pertenecen a una superfamilia de proteínas con 36 miembros en el genoma humano, y todas ellas comparten el característico motivo SNARE formado por una estructura en hélice α con secuencia de 60-70 aminoácidos muy conservada que consiste en la repetición de ocho heptadas (Figura 2 A). El motivo SNARE es el responsable de mediar las interacciones entre distintas proteínas SNARE (Terrian & White, 1997). En el extremo C-terminal la mayoría de las proteínas SNARE tienen un dominio transmembrana. Sin embargo, otras carecen de este dominio transmembrana, dentro de las pocas excepciones que no contienen este dominio transmembrana se encuentra SNAP-25 (media la fusión en neuronas y sistemas neuroendocrinos), y están dotadas de dos motivos SNARE unidos por un puente ó lazo, *linker*. Esta variedad de SNARE se ancla a la membrana mediante la palmitoilación del *linker* (Hong, 2005).

En principio las proteínas SNARE se clasificaron según de qué compartimento se habían aislado, por lo que se dividieron en v-SNAREs (*vesicle membrane SNAREs*) y tSNAREs (*target membrane SNAREs*) (Söllner y col., 1993). Ya que el primer complejo SNARE neuronal identificado por Söllner y colaboradores sigue siendo el más estudiado (Söllner y col., 1993), muchas de las posibles funciones propuestas para estas proteínas se sustentan en este modelo basado en 3 proteínas: dos residentes en la membrana plasmática, syntaxina (Bennett y col., 1992) y SNAP-25 (Oyler y col., 1989), clasificadas como t-SNAREs, y una proteína de membrana vesicular denominada sinaptobrevina o VAMP (Trimble y col., 1988), clasificada como v-SNARE.

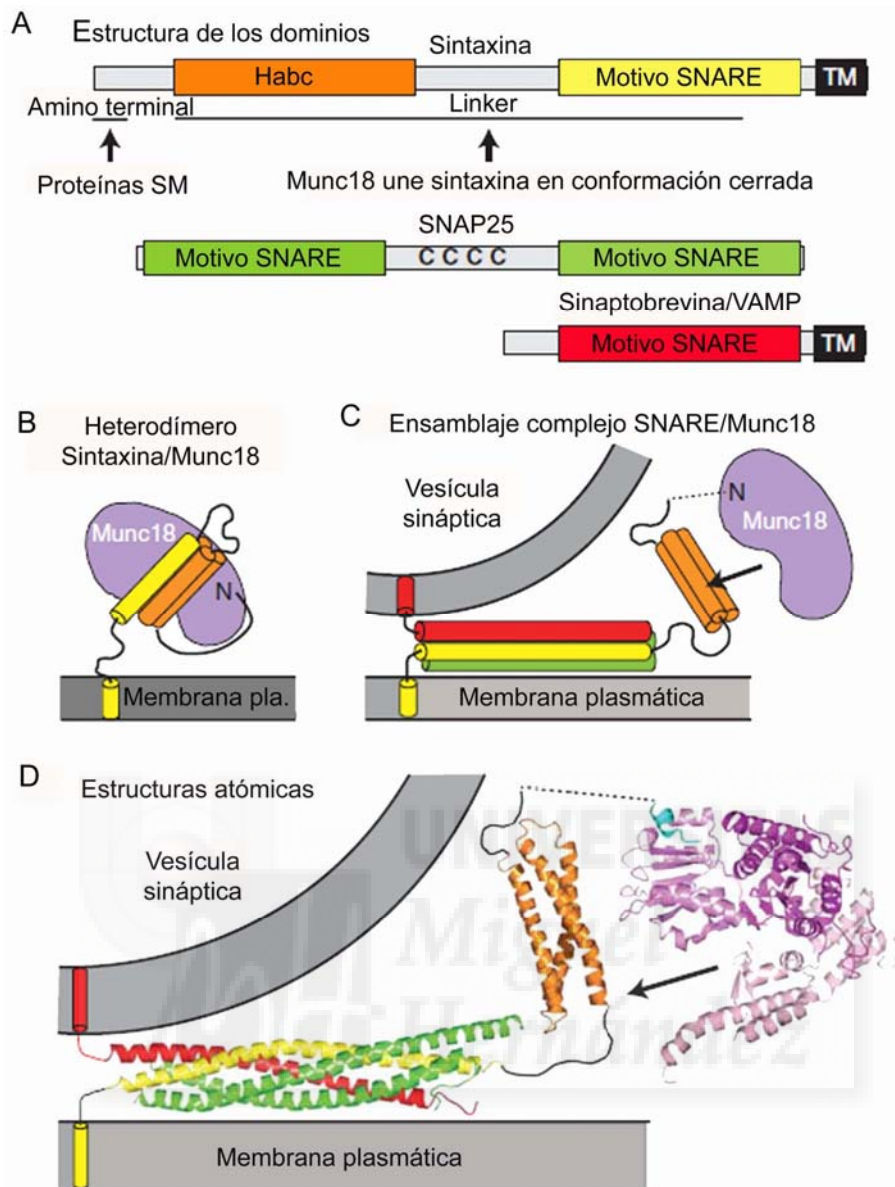


Figura 2. Estructura de las proteínas SNARE y del complejo cuaternario que media la fusión entre membranas. **A.** Estructura de las proteínas SNARE que forman el complejo cuaternario sintaxina, SNAP25 y sinaptobrevina. **B.** y **C.** Los dos tipos de interacción de la proteína SM Munc18 con sintaxina, una en conformación cerrada (**B**) ocultando el motivo SNARE, y la otra en conformación abierta (**C**) uniéndose al complejo SNARE a través del extremo amino terminal de sintaxina. **D.** Estructura atómica de un complejo cuaternario trans-SNARE. La sintaxina aparece en naranja y amarillo, el extremo amino terminal que una Munc18 en azul, en verde SNAP25, con dos motivos SNARE, uno de unión a sintaxina y otro de unión a sinaptobrevina, y en rojo la sinaptobrevina (Südhof & Rizo, 2011).

Pero esta clasificación no engloba la fusión homotípica (como por ejemplo la fusión de dos vesículas), por lo que se implantó una nueva clasificación de acuerdo con la existencia de residuos altamente conservados de glutamina (Q-SNAREs) y de

arginina (R-SNAREs) en el motivo SNARE. Y basándose en la contribución de distintos motivos SNARE, estas proteínas se reclasificaron en Qa-, Qb-, Qc- y R-SNAREs. Los complejos SNARE funcionales están formados de uno de cada tipo de los motivos que se incluyen en la clasificación, Qa-, Qb-, Qc- y R-SNAREs (Fasshauer y col., 1998). En neuronas el motivo Qa es aportado por syntaxina, Qb y Qc por SNAP-25, y el motivo R-SNARE por sinaptobrevina. Las SNAREs de la membrana plasmática (t-SNAREs según la clasificación antigua) no se distribuyen uniformemente en la membrana, sino que forman *clusters* en *lipid rafts* (también conocidos como nanodominios ricos en colesterol) (Chamberlain y col., 2001; Lang y col., 2001; Lopez-Font y col., 2010), excluyendo a los gangliósidos (Goncalves y col., 2008). De hecho, los *clusters* de t-SNAREs parecen estar organizados de una forma dinámica y son capaces de moverse en la membrana plasmática (Lopez-Font y col., 2010). Además, se sabe que las vesículas secretoras atracan y fusionan en estos *clusters* de SNAREs (Lang y col., 2001).

Por lo tanto un *cluster* con una alta concentración de SNAREs probablemente lleve a cabo la fusión de modo más eficiente (Jahn & Scheller, 2006).

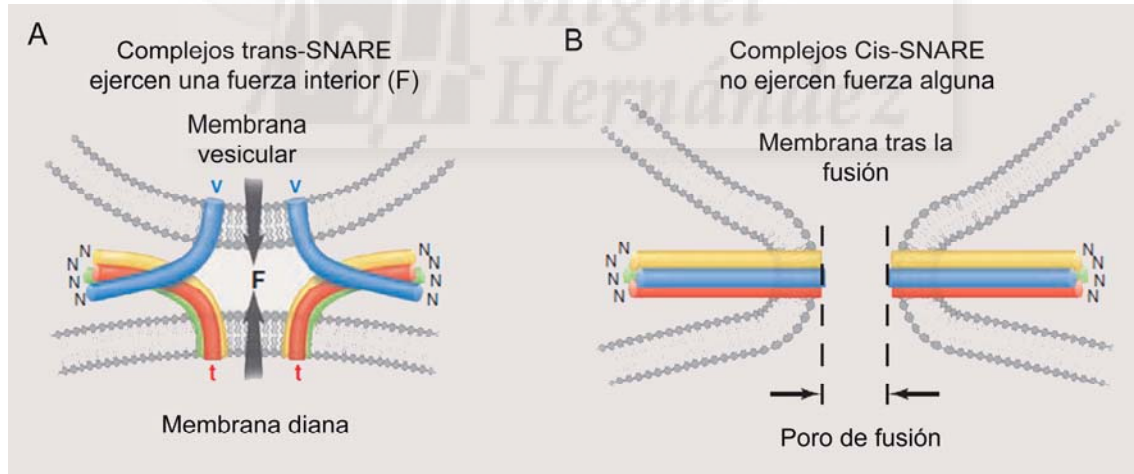


Figura 3. Mecanismo de la fusión. **A.** Los complejos trans-SNARE ejercen una fuerza que hace que las membranas a fusionar se aproximen y se doblen. **B.** Formación del poro de fusión y la consecuente formación de complejos cis-SNARE inactivos (Südhof&Rothman, 2009).

El primer paso en el mecanismo de fusión consiste en la formación del complejo *trans*-SNARE (Figura 3 A). De acuerdo con la hipótesis de la cremallera de leucina, las SNAREs deben ensamblarse en configuración *trans*, con al menos una de las proteínas

SNARE con un dominio transmembrana en las dos membranas que van a fusionar. El ensamblaje comienza en el extremo N-terminal de los motivos SNARE y continúa simulando el cierre de una cremallera hasta el anclaje en C-terminal (Jahn & Scheller 2006). Después del cierre de la cremallera de leucina se forman varios intermediarios que dan como resultado la formación del poro de fusión, mediante un proceso denominado *stalk pore formation* (Chernomordik & Kozlov, 2003), seguido de un evento de fusión ó un fenómeno denominado *kiss and run* (apertura reversible del poro de fusión) (Heuser & Reese, 1973; Ceccarelli y col., 1973; Vardjan y col., 2007).

Sin embargo, esta teoría fue cuestionada ya que muchas evidencias sugieren que la reacción de cierre de la cremallera de leucina no libera la suficiente energía como para llevar a cabo la fusión por sí sola (Wiederhold & Fasshauer, 2009; Chen y col., 2006; Coorssen y col., 2003; Dennison y col., 2006; Williams y col., 2009).

Algunos autores sugieren que la energía que falta puede ser generada por dominios C-terminales de membranas yuxtapuestas, ó tanto por la proteína de membrana plasmática SNARE syntaxina, como por la proteína SNARE sinaptobrevina de vesículas de transporte que típicamente contienen un exceso de residuos con carga positiva, los cuales pueden interactuar con lípidos de carga negativa de la bicapalipídica (Williams y col., 2009; Lam y col., 2008). Además, el papel de las proteínas SNARE puede ser aun más complejo, ya que el ensamblaje y el consecuente desensamblaje del complejo SNARE parecen estar asociados con el periodo de transición entre la formación del poro de fusión y la fusión total (An y col., 2010).

Tras la fusión los complejos SNARE pasan a la configuración *cis* y son considerados biológicamente inactivos (Jahn & Scheller, 2006) (Figura 3 B). El desensamblaje de los complejos *cis* es llevado a cabo por el factor sensible a N-etilmaleimida (NSF), el cual no interacciona con las SNAREs pero requiere cofactores conocidos como SNAPs, que no están relacionados con SNAP-25 (Söllner y col., 1993).

La exocitosis debe estar regulada en cada paso antes de la fusión. Probablemente los complejos *trans*-SNARE persistan algún tiempo tras la entrada de Ca^{+2} , señal que desencadena el proceso de fusión de membrana (Jahn y col., 2003). Por lo tanto, los complejos *trans*-SNARE deben estar estrechamente controlados por otros factores, como la sinaptotagmina I, una proteína transmembrana sensible a Ca^{+2} (Chapman, 2002); las complexinas, proteínas que involucradas en el inicio dependiente de Ca^{+2} de la exocitosis (Reim y col., 2001). Además, se ha demostrado que tanto la sinaptotagmina como la complexina están involucradas en estados preparatorios de la

exocitosis, facilitando el atraque (*docking*) y el anclaje (*priming*) de vesículas (Cai y col., 2008; Chasserot-Golaz y col., 2005; Rickman y col., 2006).

1.5. Proteínas reguladoras del complejo SNARE.

Además de las sinaptotagminas y las complexinas, existen un gran número de proteínas que regulan el tráfico de membranas en el interior de la célula. De esta manera tendrá lugar la fusión homotípica o heterotípica dependiendo de las necesidades metabólicas de la célula.

1.5.1. Proteínas SM.

Las proteínas Sec1/Munc-18-*like* (SM) son proteínas hidrofílicas, con un tamaño molecular de 60-70 kDa, y que carecen de dominios de reconocimiento. En vertebrados se han descrito tres tipos de proteínas SM que actúan en la membrana plasmática (Munc-18-1,-2 y -3) (Südhof & Jahn, 1999). Además, se han identificado cuatro genes más en el genoma del *Homo sapiens*. Las proteínas SM presentan una gran homología a lo largo de toda su secuencia de aminoácidos, lo que sugiere que en conjunto deben tener estructuras muy similares (Toonen & Verhage, 2003). Como las SNAREs, las proteínas SM son esenciales para la fusión intracelular. Un ratón *knockdown* para Munc-18-1 conlleva la pérdida total de secretar neurotransmisores de las vesículas sinápticas (Verhage y col., 2000).

Se sabe que durante la exocitosis de vesículas sinápticas, la proteína SM Munc-18-1 se une estrechamente a la proteína SNARE sintaxina-1 (Figura 2 B), pero únicamente cuando sintaxina-1 está en conformación cerrada, un estado incompatible con la formación del complejo SNARE (Dulubova y col., 1999). Esta función parece ser consecuencia de una especialización evolutiva, que surgió como consecuencia de los requerimientos espaciotemporales de la exocitosis neuronal. Sin embargo, algunos autores indican que esta forma de unión también debe ser importante para permitir el paso de sintaxina-1 al retículo endoplasmático y al aparato de Golgi, previniendo la formación de complejo SNARE intracelular (Rickman y col., 2007). Recientemente se ha demostrado, a nivel de célula única, que Munc18-1 también se une a complejos SNARE ensamblados que contienen sintaxina-1 (Figura 2 C) además de unirse a sintaxina-1 libre (Rickman y col., 2007; Dulubova y col., 2007). Aunque aún no se ha

probado a nivel de vesícula única, parece ser que Munc18-1 se une en dos tipos distintos de interacción (Rickman y col., 2007).

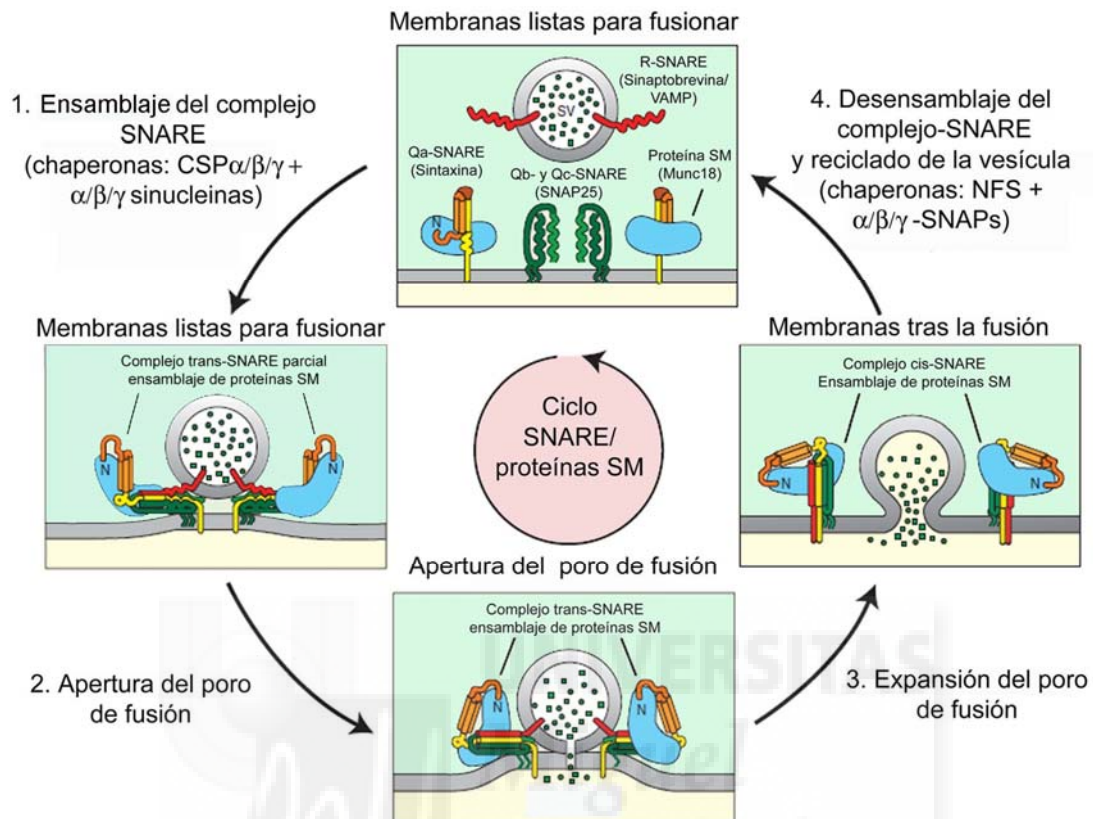


Figura 4. El ciclo de las proteínas SNARE y las proteínas SM en la fusión. En este diagrama se representan las proteínas SNARE y las proteínas SM antes de la fusión, localizándose en la membrana en su forma nativa no plegada (como es el caso de la v-SNARE sinaptobrevina/VAMP), o como proteínas plegadas en complejos diferentes a los complejos SNARE finales (por ejemplo la unión de la proteína SM Munc18-1 en conformación cerrada con syntaxina como se muestra en esta figura, o en el caso de los heterodímeros syntaxina/SNAP25). Durante el anclaje y maduración (*priming*), las proteínas SNARE se cierran formando un complejo trans-SNARE, y las proteínas SM se asocian con los complejos trans-SNARE uniéndose al extremo amino-terminal de syntaxina (diagrama de la izquierda). Los complejos SNARE completamente ensamblados empujan a las membranas abriendo el poro de fusión (diagrama de abajo), que se expande hasta que la membrana de la vesícula colapsa por completo con su membrana diana, pasando los complejos trans-SNARE a conformación cis-SNARE (diagrama de la derecha). Entonces los complejos cis-SNARE son disociados por la acción de la ATPasa NSF en conjunción con sus adaptadores $\alpha/\beta/\gamma$ -SNAPs, comenzando el reciclado de las vesículas para dar comienzo a otro ciclo (Südhof & Rizo, 2011).

Es como si, durante la exocitosis de vesículas sinápticas, Munc-18-1 se uniese inicialmente a syntaxina-1, ayudando de esta manera a la organización y ensamblaje de

complejos SNARE, pero al mismo tiempo impusiera una barrera energética a la formación del complejo SNARE (Burgoyne y col., 2009), oponiéndose de esta manera a cualquier interacción aberrante con SNAREs intracelulares ó de tráfico de membranas hasta que alcancen la membrana plasmática (Rickman y col., 2007).

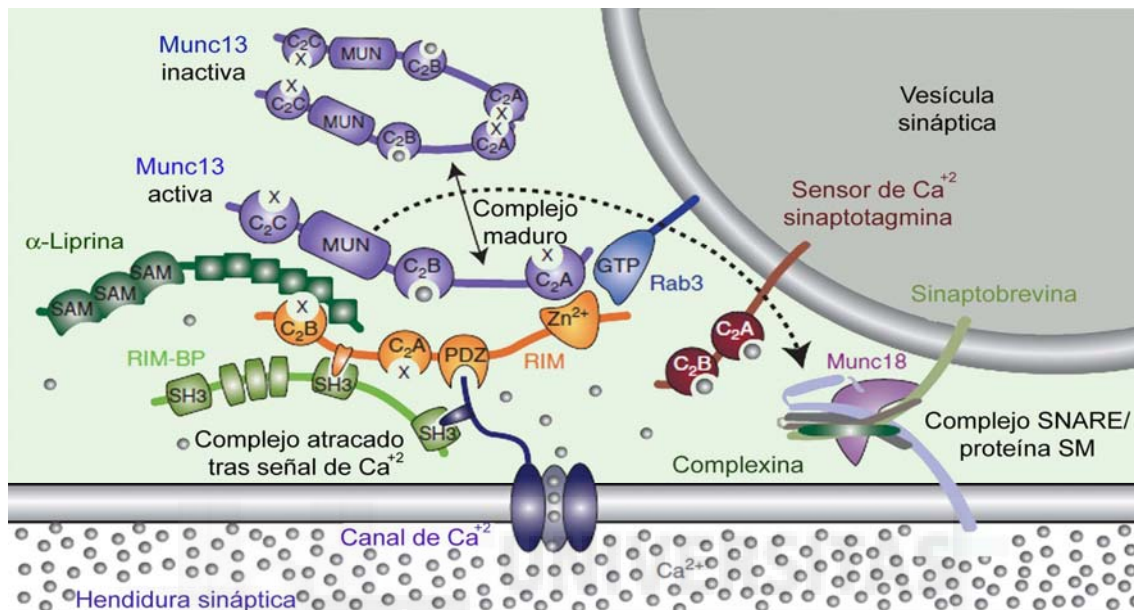


Figura 5. Modelo de las proteínas de la zona activa que intervienen en la fusión. Un complejo compuesto por cuatro componentes conocidos de las zonas activas (Munc13, α-liprina, RIMs, y RIM-BPs) se muestra en la figura; el resto de proteínas conocidas que intervienen en las zonas activas (ELKS y Piccolo/Bassoon), se unen en la periferia del complejo, y no se muestran en el esquema. El complejo de la zona activa se constituye por la interacción en cremallera de leucina del dominio amino terminal de la proteína RIM con el dominio amino terminal C2A de Munc13, mediante una interacción de una secuencia rica en prolina de RIM con el dominio SH3 de RIM-BP, y mediante la unión de las α-liprinas con el dominio C2B de RIM. El complejo se ancla a la membrana de la vesícula mediante la unión de RIM con Rab3, y muy posiblemente mediante la unión de RIM con sinaptotagmina (no mostrado), y se une a la membrana plasmática mediante la unión directa de RIM y RIM-BP a canales de Ca²⁺ de tipo N y P/Q. Es de hacer notar que existen otras interacciones entre varias de las proteínas de la zona activa, y entre estas proteínas y la membrana plasmática. Los iones Ca²⁺ se muestran como puntos; la mayoría de las proteínas de la zona activa contienen un dominio C2 similar al de sinaptotagmina, pero únicamente parte de estos dominios C2 unen Ca²⁺ (Südhof & Rizo, 2011).

Por lo tanto, para que las vesículas sinápticas puedan anclarse y formar un hipercomplejo Munc18-1-SNARE (Figura 4), una célula debe vencer esta barrera energética mediante un mecanismo que le permita tener la sintaxina-1 en conformación

abierta. Este proceso es asistido por otros cofactores como Munc-13, RIMs (*Rab-interacting molecules*), ácido araquidónico (AA) y esfingosina (Richmond y col., 2001; Connell y col., 2007; Camoletto y col., 2009) (Figura 5).

A pesar de estas consideraciones, el papel de las proteínas SM aún no está definido. Algunos autores indican que las proteínas SM forman una parte esencial de la maquinaria de fusión (Hata y col., 1993), mientras que otros sugieren que pueden actuar como inhibidores de la exocitosis (Wu y col., 1998).

Sin embargo, la última hipótesis fue cuestionada desde que descubrieron que una mutación *knockdown* de la proteína Munc-18-1 bloqueaba completamente la liberación de neurotransmisores (Verhage y col., 2000). De hecho, recientemente se ha demostrado que en células PC12 la ausencia de Munc-18-1 conlleva a una reducción de vesículas atracadas (*docking*), así como de la capacidad de secreción (Arunachalam y col., 2008).

Además, Munc-18-1 parece jugar un papel importante en el tráfico de syntaxina, ya que la syntaxina-1 presenta una deslocalización dramática en células Munc-18-1 *knock-out*. Éste efecto es revertido mediante la transfección de Munc-18-1 para su expresión, quedando patente que la función de Munc-18-1 es crítica para que el tráfico de syntaxina-1 se lleve a cabo correctamente (Arunachalam y col., 2008). Otra hipótesis establece que Munc-18-1 y otras proteínas SM deben formar una plataforma que facilite el ensamblaje de las SNARE (Jahn y col., 2003), ó incluso asistan a los complejos SNARE en su organización espacial para que no difundan al centro del espacio intermembrana, interfiriendo físicamente en la fusión de membrana (Rizo y col., 2006). Ésta última hipótesis se encuentra avalada por experimentos genéticos que las proteínas SM actúan tras la formación del complejo SNARE (Grote y col., 2000).

Recientemente se han hallado evidencias que sugieren que Munc-18-1 se une a proteínas Rab3. Las proteínas Rab3 están asociadas a las vesículas secretoras, por lo que Munc-18-1 debe tener un papel en la regulación de la exocitosis (Burgoyne y col., 2009; Van Weering y col., 2007). Incluso se ha llegado a demostrar que ésta interacción es imprescindible para el atraque (*docking*) de vesículas en la membrana plasmática (Van Weering y col., 2007). De modo que Munc-18-1 debe actuar como unión entre dos pasos iniciales de la exocitosis, el atraque dependiente de Rab3 y el posterior paso dependiente de syntaxina, así como en la expansión del poro de fusión, liderando las alteraciones en la cinética de fusión y la liberación quantal (Burgoyne y col., 2009). Sin embargo, se requieren estudios a nivel de poro de fusión único para confirmar esta teoría.

1.5.2. Proteínas Munc-13 y Rab.

La zona activa es una región especializada de la membrana presináptica donde las vesículas atracan y fusionan. La proteína efectora de Rab3 RIM y la proteína de unión a ésteres de forbol Munc-13, son componentes estructurales de las zonas activas (Zhai y col., 2001), y llevan acabo funciones importantes tanto en el *priming* de vesículas como en la plasticidad presináptica (Rizo y col., 2008).

Munc-13 tiene un papel clave en el *priming* de las vesículas sinápticas que van a fusionar. Se ha demostrado mediante estudios de delección, que la isoforma Munc-13-1 es absolutamente imprescindible para que las vesículas sinápticas glutamatérgicas se anclen y maduren (*priming*) en neuronas de hipocampo. Sin embargo, una pequeña población de las sinapsis de una célula nerviosa es independiente de Munc-13-1. En estas sinapsis la isoforma Munc-13-2 es la responsable del anclaje y maduración (*priming*). En ausencia de las proteínas Munc-13 la fusión espontánea y evocada se bloquean completamente (Varoqueaux y col., 2002).

De acuerdo con estudios bioquímicos y genéticos, las proteínas Munc-13 actúan sobre la fase de anclaje y maduración (*priming*) regulando la disponibilidad de syntaxina en la formación del complejo SNARE (Rosenmund y col., 2003; Betz y col., 1997). Betz y colaboradores sugieren que Munc-13-1 media su efecto sobre el anclaje uniéndose a la proteína de membrana plasmática syntaxina (Betz y col., 1997). Sin embargo, nuevos datos indican que Munc-13-1 no se une a syntaxina-1 aislada, pero sí se une a heterodímeros de syntaxina/SNAP-25 anclados a la membrana (Guan y col., 2008). Esto nos lleva a pensar que syntaxina-1 es activada por un mecanismo diferente al que se pensaba en principio. Es como si Munc-13 actuara junto a Munc-18-1 en la formación de heterodímeros syntaxina-1/SNAP-25 promoviendo el anclaje de las vesículas (Guan y col., 2008).

Las proteínas Munc-13 son reguladas por diacilglicerol (Bauer y col., 2007). DAG se une a todas las isoformas de Munc-13 con una afinidad muy alta (Brose y col., 2002). Una mutación en el primer residuo de histidina del motivo de Munc-13-1 C1 anula la capacidad de unión a diacilglicerol (DAG) (Betz y col., 1998). Los ratones con esta mutación mueren inmediatamente después de nacer, de lo que se concluye que las proteínas Munc-13 son imprescindibles en la cascada de señalización del segundo mensajero DAG (Rhee y col., 2002). Estudios en mutantes Munc-13-1 con una unión

deficiente a DAG sugieren que la activación dependiente de DAG de Munc-13-1, permite ajustar a las células nerviosas la maquinaria de anclaje de vesículas (*priming*) para aumentar los niveles de actividad sináptica. La entrada de Ca^{+2} debida a una estimulación de alta frecuencia, ó a la activación de receptores presinápticos, activa las isoenzimas de fosfolipasa C específica de fosfoinositoles (PI-PLC), dando lugar a un aumento transitorio de los niveles sinápticos de DAG. El DAG se une al dominio C1 de Munc-13-1 aumentando su capacidad de anclaje (*priming*) (Brose & Rosenmund, 2002; Rhee y col., 2002; Rosenmund y col., 2002).

Las proteínas RIM se caracterizan por ser proteínas específicas de la zona activa y por tener un gran tamaño (180 kDa). RIM1a se une a las isoformas Munc-13-1 y 13-2, y de esta forma regula la actividad de anclaje de vesículas (*priming*) (Betz y col., 2001). Estudios genéticos muestran que hay cuatro genes para proteínas RIM en el genoma de mamíferos, que codifican las seis principales proteínas RIM (Wang y col., 2000).

Las proteínas RIM están constituidas por múltiples dominios plegados de forma independiente, y se cree que regulan la liberación de neurotransmisores interactuando con distintos tipos de proteínas sinápticas (Südhof, 2004). Originariamente RIM1a fue identificada como efector de la proteína Rab3, fue más tarde cuando se descubrió que las proteínas RIM tienen muchas más funciones (Rizo & Rosenmund, 2008). De hecho, la delección de RIM1a produce una inhibición mucho mayor de la liberación de neurotransmisor que la delección de los genes Rab3 (Kaeser & Südhof, 2005). También se ha demostrado que los ratones *knockout* para RIM1a producen niveles menores de Munc 13-1 (Schoch y col., 2002), lo que conlleva al mal funcionamiento de la etapa de anclaje a la membrana de vesículas (*priming*) (Betz y col., 2001; Dulubova y col., 2005). Además, los ratones con falta en RIM1a presentan una deficiencia severa de memoria y de la capacidad de aprendizaje (Powell y col., 2004).

En la actualidad, los datos aportan dos funciones básicas para las proteínas RIM. Las proteínas RIM organizan las fases de atraque y anclaje de las vesículas sinápticas para su exocitosis (junto con otras proteínas de la zona activa como Munc-13-1). Las proteínas RIM median cambios dependientes de la actividad en la liberación durante la plasticidad a corto y largo tiempo (Kaeser & Südhof, 2005).

1.5.3. CSP α y sinucleinas.

En la sinapsis cada evento de fusión está asociado con el ensamblaje de complejos SNARE y su posterior desensamblaje mediado por las proteínas NSF y SNAPs. Por lo tanto, en una membrana presináptica se encontrarán cientos de proteínas SNARE sin plegar o parcialmente plegadas, de modo que los motivos SNARE estarán expuestos pudiendo dar lugar a interacciones inespecíficas y/o a un plegado erróneo de la proteína. Para que esto no ocurra las células han desarrollado dos sistemas de chaperonas que se encargan de mantener la conformación funcional de las SNAREs y del ensamblaje de los complejos. Dos de estas chaperonas son el complejo formado por CSP α , Hsc70, y SGT (Tobaben y col., 2001) y las sinucleinas (Burré y col., 2010), ambas se encuentran relacionadas con enfermedades neurodegenerativas (Figura 6). De lo que se deduce que la exposición de residuos de una proteína SNARE mal plegada y/o un mal ensamblaje de los complejos SNARE debe conducir a la muerte neuronal.

CSP α es una proteína de vesículas sinápticas muy conservada a lo largo de la evolución, contiene un dominio DNA-J típico de cochaperonas. Cuando forma un complejo con el dominio DNA-K de la proteína Hsc70 y con (*tetrotricopeptide repeat*) la proteína SGT, la CSP α media el plegado de la luciferasa desnaturalizada mediante un mecanismo dependiente de ATP (Sharma y col., 2011). La delección de CSP α en ratón no tiene un efecto inmediato en la liberación de neurotransmisores, pero permite un aumento de la ubiquitinación y degradación de SNAP-25, por lo que disminuyen los niveles de complejo SNARE ensamblado. Esto conduce a una neurodegeneración fulminante que causa la muerte en ratones en 2-3 meses (Fernández-Chacón y col., 2004; Sharma y col., 2011).

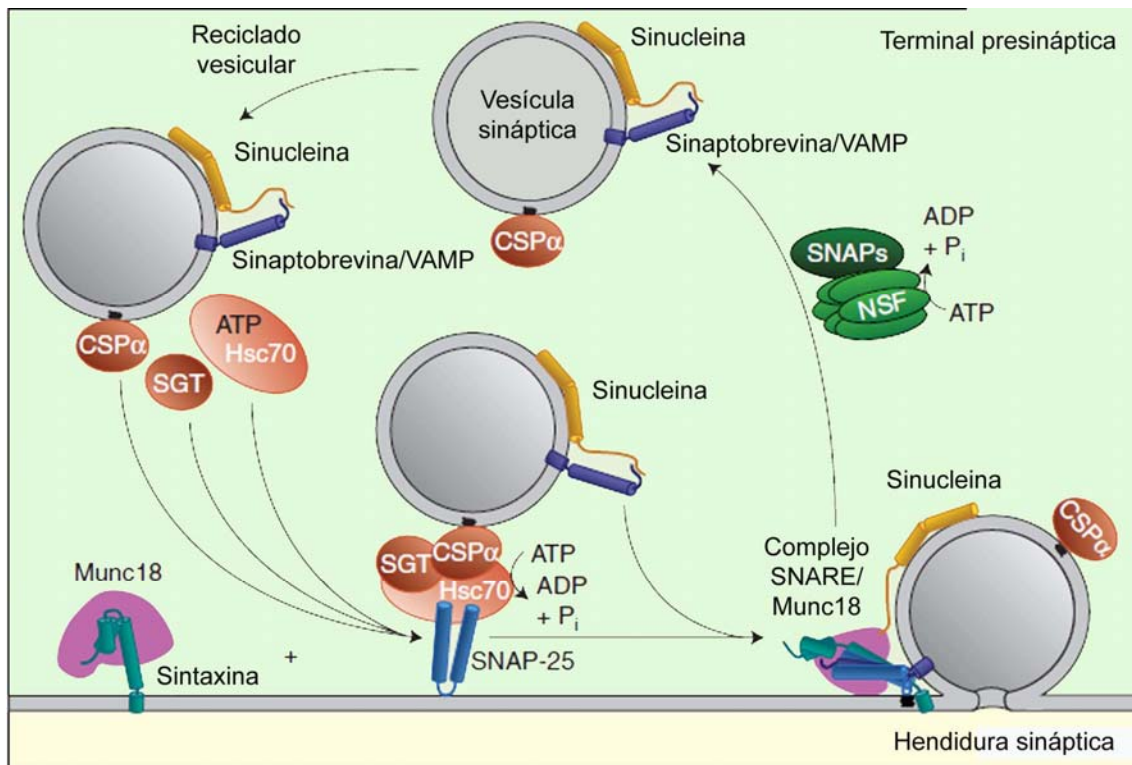


Figura 6. Intervención de las proteínas CSP α , Hsc70, SGT, y las sinucleínas en la fusión. Dos tipos de chaperonas intervienen en la función de las proteínas SNARE. Se sabe que las proteínas SNARE están sometidas a un continuo plegado y desplegado, dando lugar a un complejo potencial desplegado que es mediado por al menos dos tipos de chaperonas que intervienen en la neurodegeneración: el complejo chaperona clásico contiene CSP α (para la cadena de cisteínas de la proteína α), Hsc70, y SGT (en color rojo), y las chaperonas no clásicas $\alpha/\beta/\gamma$ -sinucleínas (en color amarillo). Las CSP α y las sinucleínas son proteínas de la vesícula que actúan mediante mecanismos diferentes. La CSP α forma un complejo con la Hsc70 y la SGT en la vesícula que se une a SNAP25 para enrolarse en los complejos SNARE, mientras que las sinucleínas se unen a los fosfolípidos y a sinaptobrevina (sinaptobrevina/VAMP) en las vesículas, uniéndose a complejos SNARE ensamblados para llevar a cabo su plegado (Südhof & Rizo, 2011).

Por otro lado, las sinucleínas constituyen una familia de tres proteínas, la α -, la β -, y la γ -sinucleína (Figura 4.1.). Las sinucleínas cobraron un papel muy importante en investigación ya que la α -sinucleína se encuentra mutada en pacientes con la enfermedad de Parkinson, produciendo la formación de unos cuerpos de inclusión denominados cuerpos de Lewy que contienen α -sinucleína y son causantes de numerosos desórdenes neurológicos (Galvin y col., 2001). Las sinucleínas son unas proteínas pequeñas que se unen a fosfolípidos con carga negativa mediante motivos α -hélice. A diferencia de las CSP α , las sinucleínas solo se encuentran en vertebrados. Una

de las funciones más importante de las sinucleínas en la formación del complejo SNARE se descubrió como consecuencia de un experimento en el que se determinó que la sobreexpresión de α -sinucleína revierte por completo la neurodegeneración letal producida por una mutación *knockout* de CPSa (Chandra y col., 2005). La α -sinucleína puede recuperar el ensamblado de complejos SNARE pero no el número de SNAP-25 que se han perdido por ubiquitinación y degradación. Mediante experimentos *in vitro* se ha determinado que la α -sinucleína produce un aumento de la formación de complejos SNARE (Burré y col., 2010). Es más, la delección de todas las isoformas de sinucleína, aún no siendo letales, conducen a la desestabilización del complejo SNARE *in vivo*, y a una neurodegeneración que aumenta con el tiempo, incapacitando a los ratones que tienen este fenotipo al cabo de un año (Burré y col., 2010).

Como la α -sinucleína normalmente promueve la formación del complejo SNARE, Eriksen y sus colaboradores han lanzado dos hipótesis para explicar cómo pacientes que presentan el gen de la α -sinucleína duplicado o triplicado desarrollan una enfermedad neurodegenerativa. En primer lugar, un aumento de las chaperonas que facilitan el ensamblaje del complejo SNARE puede resultar perjudicial, interfiriendo en el balance de la fusión en las terminales nerviosas. Por otro lado, una α -sinucleína mal plegada puede causar daño neuronal, ya que se trata de una proteína muy reactiva en una conformación inadecuada y por lo tanto tóxica. La segunda hipótesis deriva del hecho de que únicamente la mutación de α -sinucleína, pero ni la β - ni la γ -sinucleína, han sido identificadas en la enfermedad de Parkinson, aun desempeñando una función similar en la célula. El mecanismo mediante el cual la sinucleína es tóxica aún no se conoce. (Südhof & Rizo, 2011).

1.6. Física de la fusión de membranas. El poro de fusión.

Las membranas biológicas son entidades complejas compuestas por diferentes tipos de lípidos y proteínas. Estas estructuras en bicapa son muy dinámicas. La fusión implica la reorganización espacial y conformacional de lípidos y proteínas. El mecanismo molecular de la fusión ha sido estudiado empleando diversos sistemas biológicos, entre los que se incluyen la fusión viral, la fusión entre dos células, y la fusión intracelular.

A la hora de que fusionen dos bicapas opuestas (enfrentadas) en primer lugar deben aproximarse, por lo que deben vencerse fuerzas electrostáticas de repulsión y/o

fuerzas de hidratación (Kinnunen & Holopainen, 2000), lo que representa una gran barrera de energía a niveles atómicos que impide la fusión. Una vez superada esta barrera energética (Figura 8), se forma una estructura en forma de tallo (*stalk-like*), seguida del estado de transición de hemifusión, posteriormente se forma el poro de fusión y se da la fusión completa de las dos bicapas (en el caso de una fusión completa) (Gingell y col., 2002; Chernomordik & Kozlov, 2003). Los poros de fusión crean una conexión acuosa a través de las capas que se están fusionando (Sørensen, 2009).

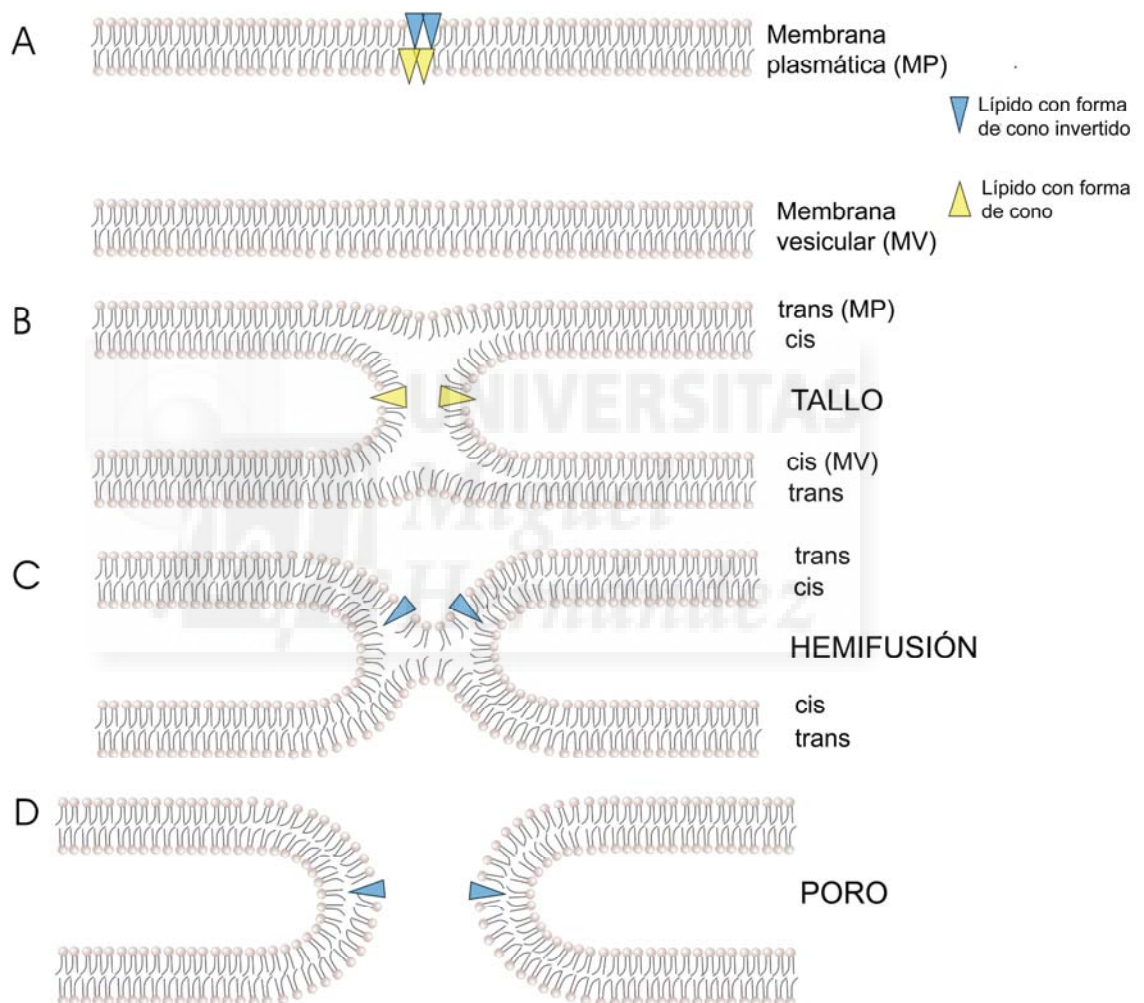


Figura 7. Modelo del poro de fusión. El modelo del tallo en la formación del poro de fusión pone de manifiesto la importancia de la geometría de los lípidos para la formación del tallo y el poro de fusión. **A.** Membrana plasmática y de la vesícula antes de la fusión. **B.** El surgimiento de las caras cis de las bicapas permite la formación del tallo de fusión. Los fosfolípidos en forma de cono en las caras cis de las membranas favorecen la formación del tallo (se muestran en amarillo). El contacto entre las caras trans de las dos bicapas promueve el estado de hemifusión (C) y la formación del poro (D). Los lípidos en forma de cono invertido (se muestran en azul) en las caras trans de las bicapas facilitan la formación del estado de hemifusión así como del poro de fusión (Salaün y col., 2004).

Como se ha observado en procesos de exocitosis, los poros de fusión pueden abrirse repentinamente, en cuestión de microsegundos, con un diámetro aproximado de unos 2 nm. En los 10-20 ms siguientes pueden incrementar su conductancia ó contraerse, dando como resultado diferentes estados intermedios moderadamente estables con distintas conductancias (Breckenridge & Almers, 1987). De este modo, con frecuencia se observan aperturas y cierres de los poros de fusión que van desde unos pocos milisegundos a varios segundos (Fernández y col., 1984). En algunos casos, el poro de fusión se expande de manera irreversible (Lindau & Almers, 1995), mientras que en otros se vuelve a cerrar dando lugar al denominado *kiss and run* (Alés y col., 1999).

La evidencia más clara de que la hemifusión es un paso obligatorio en la exocitosis proviene de experimentos realizados en huevos de erizo de mar, en esta especie pueden observarse unos gránulos corticales de gran tamaño alineados con la membrana cortical que fusionan durante la fertilización. Mediante la técnica de microscopía de fotoblanqueado (FRAP), se ha observado que estos gránulos intercambian lípidos con la membrana plasmática en una escala de tiempo de minutos, pero no intercambian proteínas, lo que indica que los gránulos se encuentran retenidos en un estado de hemifusión previo a la fusión (Wong y col., 2007). Mediante tomografía electrónica (*Conical electron tomography*) de terminales sinápticas, se ha concluido que la mayoría de las vesículas sinápticas atrapadas en las zonas activas para la fusión se encuentran en estado de hemifusión (Zampighi y col., 2006).

Durante mucho tiempo la comunidad científica creía que la exocitosis estaba únicamente orquestada por proteínas, proteínas que doblaban y daban forma a las bicapas lipídicas a su antojo. Esta es la denominada teoría proteocéntrica, la cual asume que son proteínas las únicas encargadas de estabilizar las bicapas lipídicas y sus intermediarios, así como de catalizar el proceso de fusión (Lang y col., 2008). De hecho, algunos autores sugieren que el poro de fusión está formado única y exclusivamente por proteínas (Han y col., 2004), ya que dos bicapas lipídicas no pueden fusionarse de forma espontánea, ni siquiera cuando se encuentran separadas únicamente por 2-3 nm (Rand & Parsegian, 1989). Esto se debe a las fuerzas hidrofóbicas que es necesario vencer para deformar y remodelar una bicapa lipídica (Tanford, 1978). Además, las membranas biológicas mantienen una distancia de 10-20 nm debido a la repulsión electrostática entre los grupos polares de los fosfolípidos y a la presencia de

proteínas en la membrana. Únicamente mediante la aplicación de fuerzas de tensión pueden fusionarse dos bicapas (Chernomordik y col., 1987 a; Chernomordik y col., 1987 b; Zimmerberg y col., 1980; Lentz y col., 1999). Son proteínas especializadas las encargadas de aproximar las membranas, provocando que éstas se doblen y/o se forme un parche de membrana dónde la concentración de proteínas sea reducida, y se permita la formación de un poro de fusión (Lang y col.; 2008). El papel de las proteínas es clave en la estabilización de cada uno de los pasos que conducen a la formación del poro de fusión, ya que son proteínas las que (Figura 8):

1. Inician la formación del *stalk* mediante la perturbación de la membrana.
2. Estabilizan el estado de hemifusión, así como otros estados de transición de la formación del poro de fusión.
3. Forman parte del poro de fusión.

Por otro lado, se ha demostrado cómo vesículas lipídicas son capaces de fusionar *in vitro* en ausencia total de proteínas (Papahadjopoulos y col., 1976), así como otros autores han afirmado que la fusión requiere proteínas únicamente en una de las membranas a fusionar (Vogel y col., 1992). Cuando el poro se ha expandido ambos modelos son indistinguibles. La gran variabilidad en la conductancia inicial de los poros de fusión y sus movimientos rápidos de apertura y cierre observados en fusiones de liposomas libres de proteínas (Chanturiya y col., 1997), apoyan la idea de que incluso en reacciones de fusión mediadas por proteínas los poros de fusión son esencialmente lipídicos. Sin embargo, las proteínas influyen fuertemente en sus propiedades como se ha podido observar con mutagénesis de proteínas de fusión viral (Chernomordik y col., 1999), sobre-expresando sinaptotagmina I y IV (Wang y col., 2001), complexina (Archer y col., 2002) y con mutantes de Munc18 en células PC12 (Fisher y col., 2001).

La teoría de la formación del poro de fusión se sustenta en observaciones realizadas sobre el efecto de diferentes lípidos en la estructura de una bicapa lipídica. Se ha demostrado que los fosfolípidos que generan una curvatura positiva de la membrana (tienen forma de cono invertido, *inverted-cone*) inhiben la transición al estado de hemifusión, mientras que los fosfolípidos que dan lugar a una curvatura negativa (tienen forma cónica, *cone-shaped*) promueven el estado de hemifusión actuando en las monocapas que contactan, que se están uniendo (membranas en configuración *cis*). Estas conclusiones nacieron a raíz de numerosos experimentos que identificaban a los lisofosfolípidos como inhibidores de la fusión (Chernomordik y col., 1993; Reese y col.,

2005; Reese & Mayer, 2005; Vogel y col., 1993). Por el contrario, en el caso de monocapas enfrentada (configuración *trans*) los fosfolípidos con forma de cono invertido promueven la fusión, mientras que los fosfolípidos con forma de cono la inhiben, este hecho ha sido demostrado en células cromafines adicionando fosfolípidos al medio extracelular (Amatore y col., 2006). Sin embargo, estas conclusiones no son del todo correctas, ya que es esencial, pero a la vez muy complicado, establecer en qué lado de la membrana está actuando un lípido concreto. Además, algunos lípidos ejercen sus efectos sobre el mecanismo de fusión de membranas independientemente de la curvatura que generen en la membrana (Sørensen, 2009).

Rigoni y sus colaboradores realizaron una serie de experimentos que apoyan la teoría lipídica del poro de fusión. Observaron que el efecto de neurotoxinas de veneno de serpiente que tienen una función de fosfolipasa A₂ (PLA₂), es mimetizado por la adición al medio extracelular de una mezcla de lisofosfatidilcolina miristoilada y ácido oleico. La lisofosfatidilcolina, un fosfolípido con forma de cono invertido, permanece en la cara externa de la membrana, mientras que el ácido oleico, que tiene forma de cono, se redistribuye hacia la cara interna de la membrana provocando una exocitosis masiva (Rigoni y col., 2005). Sin embargo, resultados más recientes atribuyen el aumento de la exocitosis al menos en parte a la entrada de Ca⁺² (Rigoni y col., 2007). La teoría proteocéntrica también apoya el modelo del poro de fusión. Recientemente numerosos laboratorios han encontrado evidencias que apuntan a que las proteínas SNARE suscitan la formación del poro de fusión a través del estado de transición de hemifusión (Lu y col., 2005; Lu y col., 2006; Lu y col., 2008). Sin embargo estos experimentos no realizan medidas directas sobre el estado de hemifusión, ya que emplean una población de vesículas. Además, varios grupos de investigación han llegado a diferentes conclusiones sobre la habilidad de las SNAREs y la sinaptotagmina para inducir el estado de hemifusión o la fusión completa (Bhalla y col., 2006; Lu y col., 2006; Schaub y col., 2006; Lu y col., 2005). Se han obtenido evidencias más directas que apoyan esta teoría al estudiar la fusión en vesículas individuales, tanto mediante el estudio de la fusión de una vesícula con otra, así como observando la fusión de una vesícula individual con una bicapalipídica (Yoon y col., 2006; Liu y col., 2008). A pesar de que estos sistemas de estudio son artificiales, se acepta que las proteínas SNARE orquestan la fusión de membranas mediante la generación de un estado de transición de hemifusión.

Un aumento del calcio intracelular lleva a la ruptura del estado de hemifusión, y por lo tanto a un poro de fusión abierto. En este punto la exocitosis puede abordarse de forma directa mediante métodos electroquímicos, como la capacitancia y la amperometría. La amperometría es el método elegido a la hora de estudiar la cinética del poro de fusión (Chow y col., 1992; Albillos y col., 1997; Zhou y col., 1996). En la mayoría de las investigaciones realizadas sobre la exocitosis, se ha combinado la amperometría con la sobreexpresión ó anulación de proteínas. Las proteínas que cambian en mayor medida las propiedades del poro de fusión son las SNAREs (Borisovska y col., 2005; Criado y col., 1999; Gil y col., 2002; Graham y col., 2004; Han & Jackson, 2005; Han & Jackson. 2006; Han y col., 2004; Kesavan y col., 2007; Lam y col., 2008; Sørensen y col., 2003) y las sinaptotagminas (Bai y col., 2004; Lynch y col., 2008; Wang y col., 2001; Wang y col., 2003; Wang y col., 2006; Zhu y col., 2007). Meyer y sus colaboradores, mediante este tipo de experimentos, llegaron a la conclusión de que el poro de fusión estaba inicialmente formado por seis dominios transmembrana provenientes de ocho moléculas de syntaxina. Los dominios transmembrana deben formar una estructura en forma de anillo, que da lugar a la mitad de un poro acuoso similar a una unión tipo *gap*, mientras que la otra mitad del poro acuoso debe estar formada por dominios transmembrana de moléculas de sinaptobrevina (Han y col., 2004).

Otros experimentos de amperometría apoyan el modelo lipídico del poro de fusión. Se ha observado que el poro de fusión puede presentar grandes fluctuaciones reversibles (Kesavan y col., 2007; Zhou y col., 1996), estas variaciones en el poro de fusión son características de una bicapalipídica libre de proteínas (Chanturiya y col., 1997). Por otro lado, tanto el tamaño como la carga de las vesículas influyen en el poro de fusión (Montesinos y col., 2008; Sompers y col., 2004). Por lo que no es posible que un canal acuoso constituido únicamente por proteínas sea el estado de transición previo a la formación del poro de fusión.

Mediante la sobreexpresión de isoformas de sinaptotagmina, y mutaciones C2A y C2B en células PC12, se ha visto que la sinaptotagmina está involucrada tanto en la apertura del poro de fusión, como en el tiempo que éste permanece abierto (Wang y col., 2001; Wang y col., 2003). Sin embargo, la sobreexpresión de proteínas puede cambiar directa o indirectamente las propiedades del poro de fusión, por esta razón los experimentos realizados mediante la sobreexpresión de Munc18-1 y de complexinas no

han podido ser confirmados en células *knock-out* para dichas proteínas (Archer y col., 2002; Cai y col., 2008; Fisher y col., 2001; Gulyas-Kovacs y col., 2007).

Además, con independencia de si el poro de fusión es de naturaleza lipídica o proteica, el papel de los lípidos parece ser fundamental para permitir la función de la maquinaria exocitótica. El colesterol junto con el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) tienen una importancia crítica para el reclutamiento y la funcionalidad de las proteínas SNARE (Holz y col., 2000; Chamberlain y col., 2001; Lang y col., 2001; Churchward & Coorssen 2009; Wang y col., 2010; Chasserot-Golaz y col., 2010).

El PIP₂ se concentra en zonas activas de fusión de la membrana, y un aumento o descenso del PIP₂ en la membrana incide directamente sobre el *pool* de vesículas sinápticas atracadas (*primed*) en células cromafines (Aoyagi y col., 2005; Milosevic y col., 2005). Por otro lado, y no menos interesante es el hecho de que una substancial fracción de los microdominios de PIP₂ colocaliza con las proteínas activadas por calcio para la secreción (CAPS) (Aoyagi y col., 2005).

Las CAPS son unas proteínas citoplasmáticas que se unen a las vesículas secretoras y están implicadas en etapas tardías de la exocitosis (Grishanin y col., 2004), mediando la exocitosis rápida de vesículas peptidérgicas (Rupnik y col., 2000).

Por lo tanto, el PIP₂ es un componente clave para establecer la relación entre lípidos y proteínas con dominios de unión a lípidos (Lang y col., 2008). La concentración de PIP₂ existente en los microdominios lipídicos se estima que es relativamente más elevada que en las regiones circundantes (James y col., 2008). A estos niveles, el PIP₂ inhibe la fusión en ausencia de las proteínas CAPS ya que produce curvatura positiva de membrana debido a su forma en cono invertido, lo que antagoniza la gran curvatura negativa necesaria en la etapa de formación del tallo, un estado de transición necesario para que se dé la fusión completa (James y col., 2008; Chernomordik & Zimmerberg, 1995). Sin embargo, las regiones que contienen las SNAREs se encuentran cargadas positivamente, y necesitan secuestrar PIP₂ lo que conlleva a un aumento transitorio de la curvatura de la membrana durante la fusión (Melia y col., 2006). James y colaboradores sugieren dos mecanismos mediante los cuales el PIP₂ regula la fusión de membrana (James y col., 2008). Uno de los mecanismos es inhibitorio PIP₂ debido a la curvatura intrínseca del PIP₂. Por otro lado, el PIP₂ facilita la fusión regulando proteínas que unen PIP₂ como las CAPS, la sinaptotagmina o la rabfilina, las cuales poseen propiedades adicionales que promueven la función de las SNARE en la fusión (James y col., 2008). El fosfatidilinositol 4,5-

bifosfato también es un donador de IP₃, el cual modula la sinapsis por regular los niveles de Ca⁺² en la célula (Wenk y col., 2004). El IP₃ es una molécula soluble que difunde por el citoplasma, hasta para unirse a receptores específicos del retículo endoplasmático, disparando así la entrada de Ca⁺² en el citosol (Bootman y col., 2001). El calcio se une a proteínas como la sinaptotagmina (Chapman, 2002), las complexinas (Reim y col., 2001) y la PKC (Wakelam, 1998), iniciándose el proceso de fusión.

El DAG también contribuye directamente en el proceso de fusión debido a su elevada curvatura negativa (Churchward y col., 2008). El DAG se produce cuando la PLC rompe el PIP₂ en IP₃ y DAG (Poccia & Larijani, 2009). El DAG tiene al menos seis tipos de proteínas diana diferentes, una de las cuales pertenece a la familia de las PKC. La PKC es activada por DAG mediante unión a su dominio C1, o directamente por Ca⁺² (Brose & Rosenmund, 2002; Wakelam, 1998), y se ha demostrado que potencia la transmisión sináptica (Francis y col., 2002). Durante la despolarización, la PKC rápidamente fosforila a Munc-18-1 (Burgoyne y col., 2009; Craig y col., 2003), cambiando su afinidad por syntaxina (Barclay y col., 2003), y convirtiendo a Munc-18-1 en una diana muy importante para la potenciación de la sinapsis dependiente de PKC (Wierda y col., 2007). La proteína Munc-13 contiene un dominio C1 y su papel en el anclaje de vesículas sinápticas es muy importante. Una mutación en el dominio C1 de Munc-13 hace que pierda su capacidad de unirse a DAG, e insensible a los ésteres de forbol (que estimulan el *priming*), induciendo un defecto en el aumento de la neurotransmisión (Rhee y col., 2002).

El colesterol también juega un papel muy importante en la dinámica del poro de fusión. Se cree que el colesterol regula la persistencia del poro de fusión semiestable, como se ha demostrado en estudios de vesícula única en vesícula peptidérgica de la pituitaria (Jorgacevski, 2010). El colesterol localizado en la cara citosólica de la membrana es el que facilita la estabilización del poro de fusión, y no el situado en la cara externa de la membrana (Wang y col., 2010). Wang y colaboradores indican todas estas propiedades del colesterol, la viscosidad/rigidez que hace tener a una monocapa lipídica, su curvatura negativa y su capacidad de modular proteínas del ciclo de la fusión, contribuyen a este hecho (efecto). Este mecanismo genera un microambiente de estructura anisótropa requerido para que exista una elevada curvatura negativa en las zonas activas (Jorgacevski y col., 2010). Este conjunto de propiedades le hacen capaz de formar la estrecha cintura del poro de fusión de una forma energéticamente favorable. Por lo tanto, la retirada del colesterol de la cara citoplasmática del poro de fusión

disminuye totalmente la probabilidad de una fusión exitosa. El colesterol también ha sido implicado en la enfermedad de Nieman–Pick tipo C1 (NPC1), que se caracteriza por la pérdida de la función de la proteína NPC1 (Wasser y col., 2007). La enfermedad causa la pérdida progresiva de neuronas y la acumulación de colesterol no esterificado en la vía endocítica. En neuronas, la deficiencia en NPC1 resulta en la disminución de colesterol en axones distantes debido al deficiente tráfico de colesterol. De hecho, ratones que padecen la enfermedad NPC1 de forma natural son un modelo excelente para el estudio de la alteración de la homeostasis del colesterol y su impacto en la neurotransmisión.

En las últimas dos décadas los experimentos llevados a cabo en el campo de la fusión indican claramente que los lípidos son biomoléculas con una amplia gama de funciones, no una simple barrera que permite a las células mantener un medio interno adecuado para sus funciones. Los lípidos juegan un papel muy importante en el tráfico de vesículas, en la señalización, y tanto en la localización de proteínas como en su función (Rohrbough & Broadie, 2005; Donaldson, 2009; Wickner, 2010; Lippincott-Schwartz & Phair 2010). Las células han desarrollado un mecanismo complejo y fascinante mediante el cual lípidos y proteínas se regulan mutuamente, por lo que es la interacción entre lípidos y proteínas lo que permite una fusión eficiente, oportuna y precisa de dos bicapas opuestas (Jackson & Chapman, 2006). De todo lo expuesto se concluye que los lípidos regulan la fusión en cuatro fases:

1. Influyen en la probabilidad de que dos membranas fusionen según su composición lipídica.
2. Reclutan proteínas implicadas en la fusión.
3. Desempeñan un papel clave en el reclutamiento de proteínas implicadas en la fusión.
4. Regulan directamente proteínas implicadas en la fusión afectando a su conformación.

2. Lípidos señal.

2.1. Ácidos grasos poliinsaturados.

Para que en el cerebro se den las estructuras y funciones correctas el balance entre los ácidos grasos omega-3 y omega-6 debe ser el adecuado (Lands, 1989). La proporción de ácido docohexanoico (DHA) y ácido araquidónico (AA) en los fosfolípidos de las membranas neuronales varía entre las distintas subclases de fosfolípidos. El DHA es abundante en las membranas sinápticas, mientras que el AA se distribuye más uniformemente en la materia gris y en la sustancia blanca entre los distintos tipos de células del cerebro.

La PLA₂ es la responsable de la liberación de DHA y de AA de los fosfolípidos (Figura 8), si bien el DHA es preferentemente liberado por la acción de la iPLA₂ (PLA₂ intracelular no sensible a Ca⁺²) mientras que el AA es liberado principalmente por la cPLA₂ (PLA₂ citoplasmática sensible a Ca⁺²) (Yang y col., 1999; Rao y col., 2008; Strokin y col., 2003). Probablemente ambas enzimas se encuentren reguladas por mecanismos diferentes, ejerciendo funciones opuestas (Contreras & Rapoport, 2002).

Ninguno de estos ácidos grasos pueden ser sintetizados *de novo* en células de mamífero, y sus precursores deben ser aportados en la dieta. El ácido α -linoléico es el precursor del DHA, mientras que el ácido linoleico es el precursor del AA. Para que en el cerebro se den de forma adecuada fenómenos como la apoptosis, el crecimiento de neuritas, la excitabilidad de las membranas, la formación de prostaglandinas, la desaturación y elongación de ácidos grasos, y la fluidez y flexibilidad de la membrana es imprescindible la existencia de una adecuada concentración de DHA y AA, así como de una adecuada interacción entre los ácidos grasos omega-3 y omega-6 (Contreras & Rapoport, 2002; Rapoport, 2003; Yamashima, 2008; Simopoulos & Artemis, 2009).

El AA es un ácido graso poliinsaturado mayoritario en las membranas celulares, representa el 20% de los ácidos grasos de los fosfolípidos en el cerebro (Lapillonne y col., 2002). Regula actividades enzimáticas como la proteínquinasa A, proteínquinasa C, NADPH oxidasa, acetilcolina transferasa y caspasa 3. Además modula canales iónicos, la liberación de neurotransmisores, la inducción de la potenciación a largo plazo (*long-term potentiation*), y la diferenciación de células neuronales. Además, el AA debe actuar como un facilitador retrógrado, neuromodulador, en la sinapsis glutamatérgica (Katsuki & Okuda, 1995). Por otro lado, del ácido araquidónico derivan

los endocannabinoides, neuromoduladores de la sinapsis en el cerebro por excelencia (Yates & Barker, 2009). Acciones del AA:

- Modula la liberación de acetilcolina en hipocampo de rata (Almeida y col., 1999).
- A niveles bajos está implicado en el mantenimiento de la integridad de las membranas neuronales, determinando la fluidez, y por lo tanto regulando la transmisión neuronal (Farooqui y col., 1997).
- En el núcleo interacciona con promotores, potenciadores, supresores, etc. Para modular la expresión de genes de una forma muy específica, función que no comparte con los eicosanoides y otros ácidos grasos (Farooqui y col., 1997).

La estimulación de isoformas de la PLA₂, y la consecuente liberación de AA, ocurre en traumas neuronales agudos (isquemia, traumas en la espina dorsal, traumatismo craneoencefálico), y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson (Farooqui y col., 2002). En estos desórdenes neurológicos, elevadas concentraciones de AA producen una variedad de efectos nocivos en la estructura y función celulares. Elevadas concentraciones de AA producen acidosis intracelular y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, lo que desemboca en una disfunción mitocondrial (Schapira, 1996). La permeabilidad de la membrana mitocondrial cambia, así como la de la membrana plasmática por regulación de canales iónicos. El AA activa al factor nuclear kB (NF-kB) y disminuye la viabilidad neuronal (Toborek y col., 1999).

La acumulación de ácidos grasos libres puede disparar una cascada de AA incontrolada. Esto implica un aumento en la producción de ROS. Las ROS a bajos niveles actúan como intermediarios en señalización, regulando funciones fundamentales en la actividad celular, como el crecimiento y la respuesta de adaptación. Sin embargo, altos niveles de ROS producen daño en la membrana celular, así como de proteínas y del ADN (Phillis y col., 2006; Farooqui y col., 2002). Además las ROS modulan la expresión de citoquinas en el núcleo. Estas citoquinas no estimulan únicamente isoformas de la PLA₂, sino que modulan su expresión en astrositos (Farooqui y col., 2002; Lin y col., 2004).

Por lo tanto, una entrada incontrolada y sostenida de Ca²⁺, disparada por el aumento de la degradación de glicerofosfolípidos, puede aumentar la permeabilidad de la membrana y estimular enzimas asociadas con la lipólisis, proteólisis, disgregación de

microtúbulos con la consecuente disrupción del citoesqueleto y de la estructura de la membrana (Farooqui y col., 1994).

Las cicloxigenasas (COX) y las lipoxigenasas (LOX) sintetizan eicosanoides (prostaglandinas, leucotriénos y tromboxanos) a partir del AA. Los eicosanoides actúan mediante receptores específicos de superficie o intracelulares, modulando vías de transducción, y transcripción de genes. Algunas prostaglandinas tienen un papel muy importante en la actividad neuronal, modulando la liberación de hormonas y neurotransmisores, mientras otras regulan la función circulatoria. (Tromboxano A₂ es un potente vasoconstrictor, produce vasoespasmos. La prostaglandina PGI₂ tiene el efecto opuesto) (Phillis y col., 2006).

La generación y acumulación de eicosanoides bajo condiciones patológicas está asociada con la modulación de la circulación cerebrovascular. Una producción activa de eicosanoides por células del torrente sanguíneo, como las plaquetas y los leucocitos, puede contribuir al inicio de alteraciones en la microcirculación, y por último en una disfunción del SNC (Phillis y col., 2006). Elevados niveles de prostaglandinas tienen efectos degenerativos en cultivos celulares de neuroblastoma murino. *In vivo*, las prostaglandinas están implicadas en la regulación de las citoquinas y el mantenimiento de la cascada inflamatoria (Phillis y col., 2006; Farooqui y col., 2007).

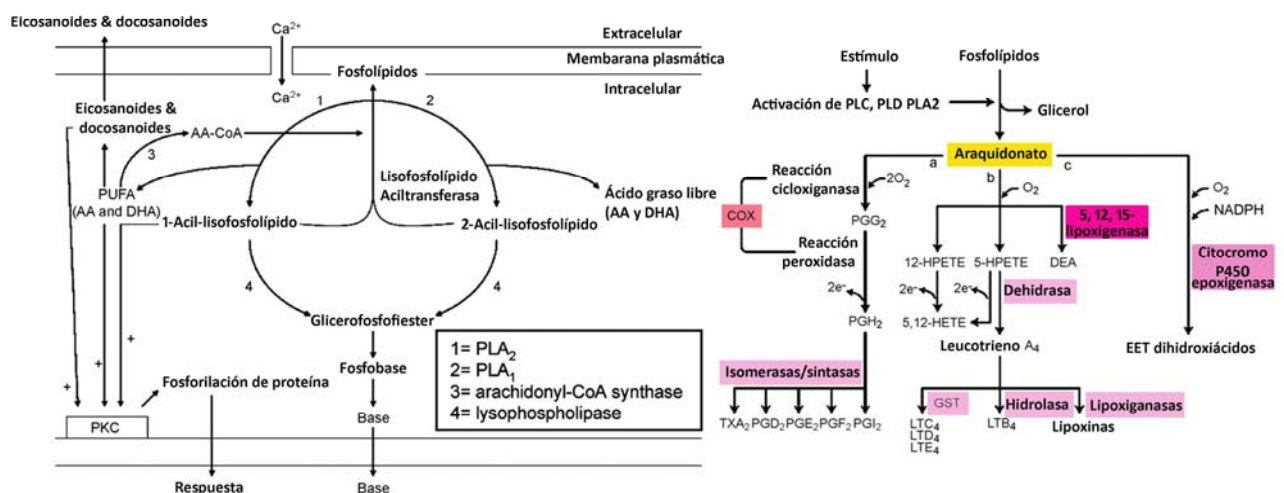


Figura 8. Metabolismo del ácido araquidónico y del ácido docohexanoico.

Otro ácido graso de vital importancia para el correcto funcionamiento celular el ácido docohexanoico (DHA). El DHA representa alrededor del 30% de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos en el cerebro (Contreras y col., 2000). Numerosas evidencias apuntan a que el DHA, al igual que el AA, es una molécula señal (Rosa & Rapaport, 2009).

El DHA está asociado con la memoria y la visión (Carlson & Werkman, 1996; Birch y col., 2000), y previene de daños por isquemia cerebral (Tsukada y col., 2000). Además, el DHA promueve el crecimiento de neuritas en neuronas corticales y de hipocampo, así como en células PC12 (Calderon & Kim, 2004; Cao y col., 2005; Kawakita y col., 2006).

La acción de enzimas del tipo LOX sobre el DHA produce 10, 17 S-docosatrienos y 17 S-resolvinas. Estos segundos mensajeros se denominan docosanoides. No sólo antagonizan los efectos de los eicosanoides, sino que además modulan el tráfico leucocitario, así como inhiben la expresión de citoquinas por las células gliales. Los receptores específicos de estos metabolitos se encuentran tanto en tejido neuronal como no neuronal. Ejemplos de estos receptores incluyen el receptor de la resolvina D (resoDR1), el receptor de la resolvina E (resoER1), y el receptor de la neuroprotectina D (NPDR) (Hong y col., 2003; Marcheselli y col., 2003; Serhan y col., 2004). Se ha propuesto que la generación de los docosanoides puede implicar un mecanismo protector interno, que previene del daño cerebral producido por la muerte celular programada (Serhan, 2005; Bazan, 2005).

El DHA no puede ser sintetizado por las neuronas, el endotelio cerebrovascular y los astrocitos son los encargados de proporcionar a las neuronas un suministro adecuado de este ácido graso (Moore y col., 2001). La liberación de DHA debe alcanzar una concentración adecuada para actuar como un mensajero extracelular (Moore y col., 1993; Kim y col., 1999), así como debe sustentar la supervivencia celular aumentando los niveles de fosfatidilserina en la membrana plasmática (Kim y col., 2000). Al parecer el DHA probablemente se vea acumulado en las membranas neuronales, ya que este ácido graso es resistente a la PLA₂ neuronales (Kim col., 1999). Por otro lado, se ha descrito en hipocampo de rata que una dieta pobre en ácidos grasos omega-3 conduce a una disminución de complejos SNARE ensamblados (Pongrac y col., 2007). Además, se ha postulado que el DHA potencia la fusión actuando directamente sobre el proceso de la exocitosis (Mathieu y col., 2010).

2.2. La ceramida y sus metabolitos.

Las ceramidas son componentes minoritarios de las membranas neuronales. Sin embargo participan en una gran variedad de funciones celulares: proliferación, diferenciación, detención del crecimiento (*growth arrest*), inflamación y apoptosis (Yu y col., 2000; Hannun & Obeid, 2002; El Alwani y col., 2006). Además, están implicadas en la senescencia celular, la respuesta al estrés oxidativo y la señalización mediada por óxido nítrico (Mathias y col., 1998). La generación de ceramida endógena se encuentra regulada por varios agonistas como: el factor de necrosis tumoral TNF- α , la proteína CD95 (APO-1/Fas), ionización y radiación UV, así como por medicamentos empleados en quimioterapia. Entre las dianas de la ceramida se encuentran quinasas, fosfatasas, fosfolipasas, COXs, proteasas y varios factores de transcripción, como AP1, NF- κ B, IL-6 (Ohanian & Ohanian, 2001).

La ceramida puede generarse y acumularse in vitro mediante el tratamiento con un análogo de cadena corta, esfingomielinasa (SMase) bacteriana, o ser inducida por estrés (retirada de un factor de crecimiento). La adición de ceramida produce una gran variedad de efectos en las neuronas. Sin embargo, las neuronas generalmente son menos sensibles al tratamiento con ceramida que las células gliales, dependiendo la respuesta de la concentración de ceramida. Una concentración baja de C6-ceramida hace que neuronas de hipocampo de rata sobrevivan, mientras que una concentración elevada promueve la apoptosis. Este hecho determina la importancia de la concentración de ceramida a la hora de deliberar supervivencia o muerte neuronal (Luberto y col., 2002).

La ceramida a bajas concentraciones promueve el crecimiento y la diferenciación de neuritas en una gran variedad de líneas neuronales y cultivos primarios (Barrett, 2000). El mecanismo molecular de este proceso se desconoce. Pero se ha observado que la ceramida actúa por debajo del mecanismo de activación de los receptores p75^{NTR} ("low-affinity NGF receptor"), p55 y del receptor de TNF- α , y facilita la supervivencia así como la muerte celular programada (Barrett, 2000; Mamidipudi & Wooten, 2002; Song & Posse de Chaves, 2003; Arévalo & Wu, 2006; Adam-Klages y col., 1998). El efecto de la ceramida sobre el p75^{NTR} no modula únicamente el crecimiento axonal, sino que promueve la mielinización (Cosgaya y col., 2002; Roux & Barker, 2002). NGF produce una rápida liberación de glutamato y un incremento del Ca²⁺ en neuronas del cerebelo, mediante el receptor p75^{NTR}. El aumento del Ca²⁺ y la liberación de glutamato sugieren que la ceramida producida por SMase

modula el aumento de Ca^{2+} y la elevación de la liberación de glutamato (Numakawa y col., 2003; Yagasaki y col., 2006).

La ceramida disminuye la fosforilación de fosfoproteínas mediante la estimulación de la CAPP (“ceramide-activated protein phosphatase”). En cultivos no neuronales la ceramida suprime la activación inducida por la insulina de la proteína-quinasa $\text{C}\zeta$ asociada a membrana (Miura y col., 2003), lo que indica que la ceramida regula la fosforilación de proteínas implicadas en procesos de transducción de señales. En células microgliales la C8-ceramida potencia la secreción de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), sin inducir la liberación de $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ y NO (Nakajima y col., 2002). La secreción de BDNF promovida por la ceramida es mediada por la proteína-quinasa $\text{C}\delta$ ($\text{PKC}\delta$) ó ϵ , pero no por quinasas reguladas de forma extracelular (ERK), c-Jun n-terminal quinasa (JNK), p38, NF κ B, o CREB (*cAMP response element-binding transcription factor*). Para finalizar, la ceramida se une y activa la catepsina D lisosomal, tralocando esta proteasa al citosol, donde promueve la apoptosis activando la caspasa 3 (De Stefanis y col., 2002).

Elevadas concentraciones de ceramida son necesarias para producir la globulación de la membrana y otros cambios morfológicos asociados con la apoptosis. A elevadas concentraciones activa la caspasa 3, y la proteasa responsable de romper la poliADP-ribosa polimerasa. La activación de caspasa 3 resulta en muerte celular programada en varios tipos de cultivos neuronales y gliales. Esta enzima hidroliza un gran número de proteínas implicadas en la transducción de señales, así como proteínas implicadas en el metabolismo de los glicerosfolípidos como PKC, cPLA_2 , iPLA_2 y PLC. También hidroliza proteínas del citoesqueleto como la α -espectrina, β -espectrina, actina y vimentina, miembros de la familia Bcl2, las presilinas, el precursor amiloide y enzimas que modulan el ADN (Farooqui y col., 2004b). La degradación de estas proteínas resulta en una transducción de señales anormal y cambios morfológicos que desencadenan apoptosis.

La ceramida 1P media la liberación de AA inducida por ionóforo de Ca^{2+} e $\text{IL-1}\beta$, mediante la translocación y activación de la cPLA_2 (Pettus y col., 2004a). De hecho, la ceramida 1P produce una activación tan dramática (>15 veces) como específica de la cPLA_2 - α . Con la excepción de $\text{PtdIns 4,5-bifosfato}$, la adición de otro lípido no tiene un efecto significativo en la cPLA_2 - α (Subramanian y col., 2005). El efecto de la ceramida 1P sobre la cPLA_2 se produce mediante la interacción con el dominio CaLB/C2 de la cPLA_2 , lo que facilita su traslocación. Esta interacción requiere Ca^{2+} , en ausencia de

Ca²⁺ la ceramida 1P no puede activar la cPLA₂ (Pettus y col., 2003, 2004a; Subramanian y col., 2005).

La esfingosina inhibe la PKC, la quinasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina, la Na⁺/K⁺ ATPasa, la CTP (fosfocolina citidiltransferasa) y la PLC. Mientras que estimula la tirosina-quinasa del receptor de EGF. La esfingomielina también regula la activación de PLA₂, PLD, PtdH fosfohidrolasa y DAG-quinasa (Hashizume y col., 1996, 1997). Además, la esfingosina 1P media su acción a través de una familia de proteínas G asociadas a receptores de esfingosina 1P. La esfingosina 1P promueve la activación de COX (Pettus y col., 2004b). La ceramida 1P induce la translocación de PLA₂ a la membrana nuclear. Por lo que la esfingosina 1P y la ceramida 1P deben actuar en cooperación para regular la producción de eicosanoides a partir de AA. La activación de receptores de esfingosina 1P regula funciones como la proliferación, migración, organización del citoesqueleto, inflamación y diferenciación (Pyne, 2004; Pettus y col., 2004b).

Por todo lo expuesto se sugiere que los metabolitos derivados del metabolismo de los esfingolípidos, junto con sus formas fosforiladas, están implicados en procesos de señalización asociados con el tráfico de membranas, crecimiento celular, apoptosis, y la habilidad neuronal de afrontar un estrés oxidativo.

2.2. Lípidos señal y excitosis.

2.2.1. Las fosfolipasas A₂, C y D en la excitosis regulada.

Se sabe que muchos fenómenos de la fusión son desencadenados por productos derivados de la acción de fosfolipasas, como el AA y el DAG (Darios y col., 2007). Sin embargo, la principal función de las fosfolipasas no es el desencadenamiento *per se* de la excitosis, sino su regulación debido a la lentitud de la catálisis enzimática (Coorssen, 1996). Como ya se ha explicado, las PLA₂ rompen los fosfolípidos para generar lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, como el ácido araquidónico (AA), que juega un papel muy importante en la inflamación (Balsinde y col., 2002).

Se ha demostrado que la PLA₂ actúa sobre la maquinaria de anclaje para la fusión mediante la producción de AA (Karli y col., 1990). El AA actúa sobre el complejo syntaxina-1-Munc-18, pero estimulando únicamente a la syntaxina libre

causándole un cambio estructural, y no disociando el complejo syntaxina-1-Munc-18 como se creía anteriormente (Connell y col., 2007; Rickman & Davletov, 2005).

La fosfolipasa C (PLC) rompe el PIP2 dejando en la membrana DAG, que es necesario para la activación de PKC y Munc-13. Tanto la PKC como Munc-13 son reguladores positivos de la fusión (Rhee y col., 2002).

La fosfolipasa D (PLD) también está implicada en estados tardíos de la exocitosis (Humeau y col., 2001). La fosfatidilcolina es hidrolizada a colina y ácido fosfatídico (PA). Se piensa que el PA actúa sobre varias funciones celulares incluyendo el tráfico de membranas, incluso como segundo mensajero intracelular, así como promoviendo la curvatura negativa debido a su forma cónica y por lo tanto la fusión (Vitale y col., 2001). Además, el PA puede ser hidrolizado a DAG (Darios y col., 2007). Recientemente se ha descrito que la activación de PLD y producción de PA son claves para la exocitosis. Si se hace *knockdown* con ARN_{antisentido} para PLD la exocitosis se inhibe, esta inhibición se revierte proporcionando lípidos que promuevan la curvatura positiva en la membrana externa (Zeniou-Meyer y col., 2007). Esto sugiere que el mecanismo subyacente de la acción de PA está relacionado con su capacidad de alterar localmente la curvatura de la membrana promoviendo el estado de hemifusión (Zeniou-Meyer y col., 2007). Sin embargo, aún se ha de determinar cómo el mecanismo por el que la producción de PA coincide en el espacio y en el tiempo con el inicio de la fusión.

2.2.2. Ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs).

Hace décadas que se sabe que los ácidos grasos poliinsaturados, y las fosfolipasas que los liberan, tienen un papel crucial en la exocitosis (Darios y col., 2007). En particular hay dos tipos de PUFAs esenciales para la fusión de membrana, los omega-6 (arquidónico) y los omega-3 (docohexanoico) (Darios & Davletov, 2006). Además de modular canales iónicos y el citoesqueleto, los PUFAs actúan sobre proteínas esenciales para la fusión, las syntaxinas. Los PUFAs son los mayores componentes de las membranas celulares (Svennerholm, 1968), y poseen propiedades biofísicas como la flexibilidad y la solubilidad, lo que promueva la fluidez en la membrana (Darios y col., 2007). Mutaciones en enzimas relacionadas con los PUFAs producen retraso mental y deficiencia en funciones cerebrales (Wainwright y col., 2002). Sin embargo, hasta hace poco se sabía muy poco del mecanismo de acción de los PUFAs. Un grupo ha propuesto que los ácidos grasos omega-3 y omega-6 actúan sobre

la sintaxina cambiando su conformación (Darios & Davletov, 2006), permitiendo la formación del complejo Munc-18-sintaxina-SNAP-25 y por lo tanto la formación del complejo SNARE (Connell y col., 2007; Darios & Davletov, 2006) (Figura 9).

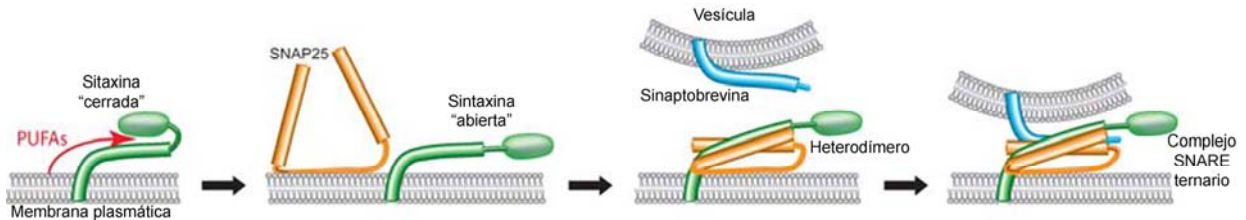


Figura 9. Acción de los ácidos grasos poliinsaturados sobre sintaxina. La conformación cerrada de la sintaxina es una diana para los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Los PUFAs pueden inducir un cambio conformacional que conduce a la sintaxina a su conformación abierta, permitiéndole que interactúe con SNAP25. En esta interacción SNAP25 adquiere la estructura de α -hélice. Entonces se produce la subsecuente interacción del heterodímero sintaxina/SNAP25 con la proteína vesicular sinaptobrevina, formándose el complejo SNARE ternario que promueve la fusión de la vesícula con la membrana plasmática (Darios y col. 2007).

2.2.3. Lipasa RBO.

El gen *rbo* codifica una enzima lipolítica integral de membrana que tiene un papel esencial en la señalización de PIP_2 /DAG dependiente de PLC (Huang y col., 2006). Las neuronas sensoriales y centrales, así como las uniones neuromusculares son muy ricas en la proteína RBO (Huang y col., 2004). En mutantes de *Drosophila* con *rbo* sensible a la temperatura (*rbo_{ts}*), la exocitosis parece estar bloqueada poco antes de la fusión, con la consecuente acumulación de vesículas presinápticas en la zona activa. Esto indica que la proteína RBO ejerce su función después de la fase de atraque (*docking*) (Vijaykrishnan & Broadie, 2006), como por ejemplo estabilizando el poro de fusión en su configuración estrecha, impidiendo así la liberación de neurotransmisor (Jorgacevski y col., 2010). RBO contiene un dominio lipolítico muy conservado que recuerda al dominio transmembrana de la DAG lipasa (Bisogno y col., 2003), implicada en la regulación de los niveles de DAG (Huang y col., 2004) y en la liberación de AA al citosol. El modelo actual sitúa a la proteína RBO dentro del mecanismo de los lípidos señal de la membrana presináptica, situándola como esencial para el anclaje y fusión (*priming/fusión*) durante o después de la activación de PLC. Se cree que RBO debe ser importante para la producción de DAG y la regulación local de PIP_2 . De modo que si

RBO es bloqueada se producirán concentraciones elevadas de PIP₂, lo que regulará de forma negativa los canales de Ca⁺², por lo que se bloqueará la entrada de Ca⁺² y las vesículas quedarán retenidas en la fase de atraque (*docking*) (Vijayakrishnan & Broadie, 2006). Recientemente se ha demostrado que RBO es necesaria para la endocitosis constitutiva y/o total tanto células neuronales como no neuronales (Vijayakrishnan y col., 2009).

2.2.4. Ceramida y sus metabolitos.

La ceramida, un esfingolípido de membrana, no puede transferirse de forma espontánea entre las bicapas lipídicas (Simon y col., 1999). La ceramida tiene tendencia a agregarse en microdominios (*lipid rafts*), en asociación con otros esfingolípidos y colesterol (Venkataraman & Futerman, 2000; Massey, 2001). Siempre se ha creído que la ceramida actuaba como segundo mensajero. Sin embargo, se sabe que más bien actúa modificando interacciones intermoleculares entre *lipid rafts*, unificando los *rafts*, produciendo curvatura de membrana y la señalización/fusión (*signalling*) (Van Blitterswijk y col., 2003). Además, debido a tener un grupo hidroxilo de cabeza pequeño y forma cónica, la ceramida facilita la fusión y fisión de membrana induciendo curvatura negativa (Van Blitterswijk y col., 2003).

La ceramidasa (CDase) es una enzima reguladora central del metabolismo de esfingolípidos, y corta la ceramida para producir el segundo mensajero móvil esfingosina (Rohrbough y col., 2004). La ceramida se encuentra tanto en la membrana plasmática como en las vesículas, y se concentra en *lipid rafts* (Van Blitterswijk y col., 2003), dónde interactúa con proteínas asociadas a *lipid rafts* (Brown & London, 2000), modulando así el tráfico de membranas (Van Blitterswijk y col., 2003). Una alteración en la actividad CDase conduce a una alteración de la distribución del colesterol y los esfingolípidos (Pagano y col., 2000), así como de las proteínas asociadas a *lipid rafts* (Watanabe y col., 2002), destruyéndose los lugares dónde se produce la fusión y la fisión. Los *lipid rafts* y los dominios *raft-like* actualmente son considerados estructuras preformadas en la membrana esenciales para la maquinaria de exocitosis vesicular (Chamberlain y col., 2001; Lang y col., 2001), su disrupción conduce a un mal funcionamiento del anclaje y fusión de las vesículas sinápticas (Rohrbough y col., 2004). Por otro lado, los esfingolípidos están implicados tanto en la regulación del número de vesículas sinápticas como en su distribución. En terminales neuronales con la

CDase mutada, el conjunto (*pool*) de vesículas endocitadas y exocitadas se ve reducido un 30%, acompañado del hecho de que hay un aumento de anclaje (*tethered*) en la membrana plasmática (Rohrbough y col., 2004). Sin embargo, la función más importante de la CDase en el tráfico de membranas es su capacidad de producir esfingosina.

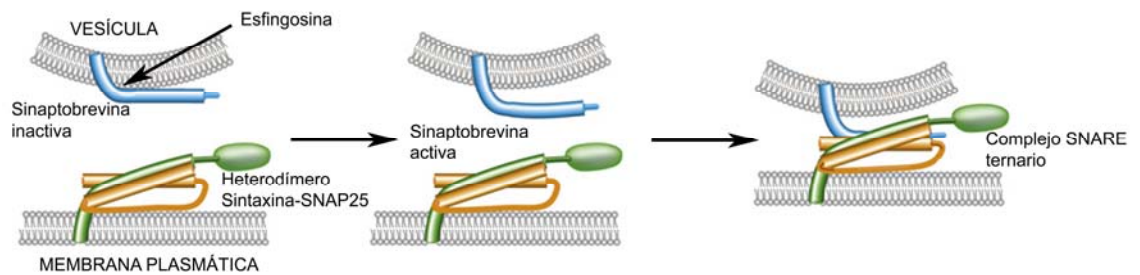


Figura 10. Activación de la sinaptobrevina por esfingosina, y la consecuente formación del complejo cuaternario SNARE. Esquema en el que se muestra cómo la esfingosina media la relajación de la estructura de sinaptobrevina unida a la membrana vesicular, un paso necesario para que se de la interacción con el heterodímero aintaxina/SNAP25. El complejo ternario SNARE formado conduce a la fusión de la vesícula con la membrana plasmática (Darios y col., 2009).

La esfingosina es la estructura central de los esfingolípidos (Lahiri & Futerman, 2007). La esfingosina, una vez liberada de los esfingolípidos por la acción de la ceramidasa, participa en numerosas funciones celulares, entre las cuales están la inhibición de canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje (Simon y col., 1999), la modulación de la excitabilidad y/o la liberación de transmisores en el sistema nervioso (Colombaioni & Garcia-Gil, 2004), y el control de la apoptosis (Cuvillier, 2002) entre otros. Recientemente se ha descubierto que la esfingosina facilita el ensamblaje del complejo SNARE (Darios y col., 2009) (Figura 10), y regula la interacción de sintaxina con Munc-18-1 (Camoletto y col., 2009), por ello es el lípido más importante en la regulación del ciclo de las vesículas sinápticas. Empleando la técnica de capacitancia, se estudió cómo la esfingosina puede activar la exocitosis desde la cara citoplasmática. Los resultados fueron sorprendentes, mostrando que la esfingosina 10 μM aumenta dos veces la capacitancia de la membrana (Neher & Marty, 1982), y aumenta la capacitancia casi tres veces cuando se emplea a 50 μM (Darios y col., 2009). Como a pesar de estos resultados el mecanismo de la esfingosina aún no está claro, se ensayó el efecto de la adición de esfingosina a ratones *knockout* para sinaptobrevina-2. Las neuronas de

ratones homocigóticos *knockout* para sinaptobrevina-2 (*Syb2^{-/-}*) tratadas con esfingosina, no presentaron un aumento significativo en respuesta a un medio hipertónico en sacarosa en comparación con neuronas no tratadas. Sin embargo, neuronas (*Syb2^{+/-}*) tratadas con esfingosina presentaron una respuesta dos veces mayor a un medio hipertónico para sacarosa, esto indicaba que la sinaptobrevina era una diana muy importante de esfingosina (Darios y col., 2009). De hecho, era como si la esfingosina activara la sinaptobrevina liberando su extremo citoplasmático de los fosfolípidos de membrana, permitiendo así la formación del complejo SNARE y promoviendo la exocitosis (Darios y col., 2009).



OBJETIVOS



Esta tesis doctoral pretende determinar los mecanismos moleculares y las etapas del procesor secretor afectadas por la acción de los lípidos señal, en el modelo de las células cromafines bovinas en cultivo primario. Para este propósito, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Determinar la posible coincidencia espacial entre la maquinaria secretora y las balsas lipídicas de la membrana plasmática.
2. Investigar si los lípidos señal adicionados de forma exógena colocalizan con las proteínas SNARE, que forman parches en la membrana plasmática.
3. Estudiar si otros aspectos funcionales de tales parches, como la movilidad, se ven afectados por los lípidos señal.
4. Determinar si los lípidos señal afectan en algún modo sobre la movilidad de las vesículas que se encuentran en la membrana plasmática.
5. Investigar a nivel de vesícula única, mediante métodos ópticos y amperometría, si la cinética de fusión se ve influenciada por los lípidos señal.
6. Estudiar si el análogo estructural de la esfingosina, el FTY720, un medicamento aprobado para el tratamiento de la esclerosis múltiple, mimetiza la acción de los lípidos señal sobre la maquinaria secretora, y las etapas del proceso de fusión vesicular.

MATERIALES Y MÉTODOS



1. Preparaciones celulares.

1.1. Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas.

Las células cromafines bovinas fueron aisladas mediante disociación tisular con colagenasa (Greenberg y Zinder, 1982).

1.1.1. Obtención y preparación del tejido.

Las glándulas adrenales bovinas fueron obtenidas del matadero municipal de Orihuela (Matadero Orihuela S.A., polígono industrial Puente Alto s/n, Orihuela, Alicante) de terneras recién sacrificadas. Para su transporte, se sumergieron en un bote esterilizado con medio Locke sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} frío (NaHCO_3 3'6 mM , glucosa 5'6 mM, 4-(2-hidroxietil) 1-piperazina-etanosulfónico (HEPES) 5 mM (Sigma, Madrid, España), KCl 5'58 mM, en NaCl 154 mM, de pH 7'4).

Todo el procedimiento de aislamiento de las células cromafines bovinas se realizó en una campana de flujo laminar BV-30/70 (Telstar, Barcelona, España). Primero, se extirpó el tejido adiposo con la ayuda de unas pinzas y tijeras curvas esterilizadas. Posteriormente, se perfundió la glándula con 5 ml de medio Locke a temperatura ambiente a través de la vena adrenal con la finalidad de eliminar los eritrocitos y verificar la integridad de la misma.

1.1.2. Digestión de la médula con colagenasa.

Una vez finalizada la etapa de lavado, se digirió la médula con colagenasa tipo A al 0'25 % (Roche Diagnostic, Barcelona, España), ADNasa I al 0'01% (Sigma, Madrid, España) en tampón Locke con albúmina sérica bovina (BSA) al 0'5 % (Sigma, Madrid, España). Esta solución se inyectó en volúmenes de 5 ml por glándula durante 15 minutos a 37°C. Este proceso se repitió 3 veces procurando un buen acceso de la solución de colagenasa a la glándula.

1.1.3. Dispersión mecánica de la médula.

Finalizada la digestión con colagenasa se diseccionó la glándula en dos fragmentos para tener acceso a la médula adrenal. A continuación, se separó la médula de la corteza adrenal con la ayuda de un bisturí y se retiraron los posibles restos de corteza de la médula con la ayuda de unas pinzas. Posteriormente, se disgregó la médula con ayuda de unas tijeras. Por último, se realizó una dispersión mecánica con la ayuda de una pipeta de 10 ml para obtener un batido celular homogéneo. Este batido se disolvió en Locke (100 ml por glándula) y se filtró por un tamiz de 217 μm de tamaño del poro, y luego por otro de 82 μm . Posteriormente, se centrifugó el filtrado en tubos cónicos de 50 ml (Corning Incorporated, NY, E.E.U.U.) a 850 r.p.m (100xg) (Beckman Coulter, CA, E.E.U.U.) durante 10 minutos para eliminar la colagenasa.

1.1.4. Gradiente de Percoll.

Una vez eliminada la colagenasa, se aislaron las células cromafines del resto de tipos celulares con la ayuda de una centrifugación en un gradiente continuo de Percoll (Amersham International) que fue obtenido a partir de la mezcla del batido celular, resuspendido en 21 ml de Locke, con una solución de Percoll estéril en tampón Locke (19 ml de Percoll y 2 ml de Locke 10x). Para la centrifugación se utilizó el rotor JA25-50, previamente calentado a 37°C, y se centrifugó (Beckman Coulter) a 13.200 r.p.m (20.000xg) durante 22 minutos a 37°C.

1.1.5. Recuento celular.

Tras la centrifugación aparecieron 3 bandas, una superior compuesta mayoritariamente de restos celulares y grasa, una intermedia donde se encuentran las células cromafines, y una inferior compuesta mayoritariamente por eritrocitos. Se recuperó la banda intermedia donde se encuentran las células cromafines y se diluyó y centrifugó en Locke a 850 r.p.m. (100xg) durante 10 minutos. Este proceso se realizó dos veces para eliminar los posibles restos de Percoll. A continuación, se resuspendió el precipitado celular en 10 ml de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Sigma, Madrid).

Por último, se realizó el recuento y estudio de la viabilidad celular por el método de exclusión con azul de Tripán (Sigma, Madrid, España), con la ayuda de una cámara de Neubauer y un microscopio de contraste de fases Zeiss ID03 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) dotado de un objetivo 10x (N.A = 0.22).

1.1.7. Siembra de las células.

Una vez realizado el recuento celular, las células cromafines fueron diluidas, dependiendo de la densidad de siembra, en un medio DMEM suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (BioWhitaker, Maryland, E.E.U.U.), 10 μ M de Citosina β -D-arabinósido (Sigma, Madrid) y de 5-fluoro-2'-deoxiuridina (Sigma, Madrid) (inhibidores del crecimiento de fibroblastos), penicilina 50 UI/ml y estreptomicina 25 μ g/ml (Sigma, Madrid).

A continuación, se sembraron en cristales circulares de 25 mm de diámetro. Los cristales, antes de ser depositados en placas costar (Corning Incorporated, NY, E.E.U.U.) de 35 mm, se esterilizaron y trataron con poli-L-lisina (Sigma, Madrid) durante 15 minutos, para mejorar la adhesión celular. La densidad de siembra fue de 750.000 células/placa para todos los experimentos. Las placas se conservaron en un incubador Heraeus (Madrid, España) a 37 °C de temperatura y en una atmósfera de CO₂ al 5 %. Todos los experimentos se llevaron a cabo en las placas costar entre el segundo y cuarto día tras la siembra de las células. Para la visualización de las células mediante microscopía confocal o microscopía de onda evanescente se colocaron los cristales en una cámara Attofluor® Cell Chamber (Invitrogen, Barcelona).

2. Microscopía confocal de células cromafines en cultivo.

2.1. Marcaje de balsas lipídicas en células cromafines bovinas.

Las balsas lipídicas se marcaron empleando dos marcadores genéricos distintos; uno fué el Bodipy-TexasRed-ceramida (Sigma, Madrid, España), que consiste en β -lactosil-ceramida unida a bodipy-TexasRed. El otro fué una variante fluorescente no tóxica de la proteína lisenina, la Venus-poliHis-Tag lisenina cedida amablemente por el profesor Kobayashi (Riken Advence Science Institute, Japón). En ambos casos el marcaje de balsas lipídicas se realizó en células vivas, no fijadas.

Para el marcaje de balsas lipídicas con Bodipy-TexasRed-ceramida, en primer lugar las células vivas se lavaron con 1 ml de solución basal a 4°C, que consistía en un tampón Krebs/HEPES (K/H) con la siguiente composición: KH_2PO_4 1'2 mM, KCl 4'7 mM, MgCl_2 1'2 mM, CaCl_2 2'5 mM, glucosa 11 mM, HEPES 15 mM, en NaCl 134 mM, de pH 7'4. A continuación se incubaba con Bodipy-TexasRed-ceramida a una concentración final de 5 μM (10 μl de solución stock en DMSO 1 mM diluidos en 1 ml de K/H basal) a 4°C durante 30 minutos. Tras lavar las células incubadas con medio de cultivo (DMEM) sin suero, las células se incubaban a 37°C durante 2 horas en el mismo medio. Transcurrido este tiempo las células se lavaban de nuevo con medio sin suero y quedaban listas para estudiarlas en el microscopio confocal.

Para marcar las balsas lipídicas con Venus-lisenina, las células vivas se lavaban con K/H basal y se incubaban en una cámara húmeda con 200 μl de lisenina 50 mg/ml en medio basal durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo las células se lavaban tres veces con solución basal y se observaban en el microscopio confocal.

2.2. Visualización de lípidos señal en la membrana plasmática de células cromafines bovinas.

Se emplearon tres análogos de lípidos fluorescentes (Figura 11), dos correspondientes a los lípidos señal objeto del estudio en este trabajo ácido araquidónico (Higdon y col., 2009), cedido por la Prof. Usmar (Universidad de Alabama, Birmingham, E.E.U.U.), y esfingosina (Bandhuvula y col., 2009; Bode y col., 2010), cedida por el Prof. Bittman (Universidad de Nueva York, E.E.U.U.). El tercero se trataba de un análogo fluorescente del medicamento FTY720 (Li & Bittman, 2007), que a su vez es un análogo de la esfingosina, también cedido por Bittman.

Todos los análogos de lípidos señal se incubaron a una concentración final de 2 μM , por un tiempo de 30 minutos a 0°C (sobre hielo). Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados en medio basal y se observaron bajo microscopía confocal.

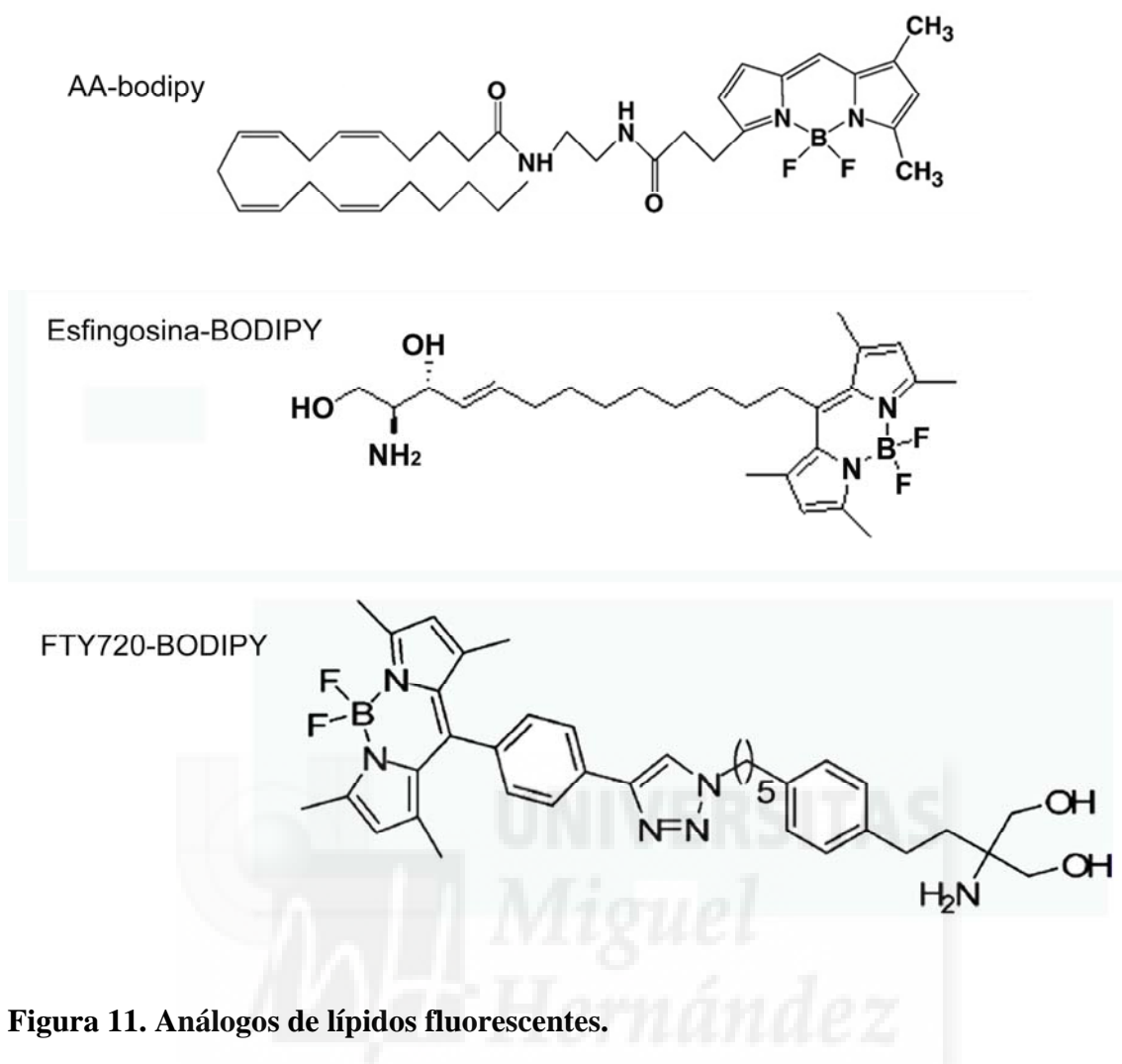


Figura 11. Análogos de lípidos fluorescentes.

2.2. Microscopía confocal.

Todos los experimentos de microscopía confocal se realizaron con un sistema láser confocal Olympus Fluoview FV300 (Olympus Corp., Tokio, Japón) montado en un microscopio invertido IX71 y dotado de un objetivo Olympus 100X de inmersión en aceite ($A.N = 1.45$). Este sistema está compuesto por dos sistemas láser de luz visible, uno Multi-Argón ($\lambda = 458 \text{ nm}$; 488 nm ; $515 \text{ nm}/10 \text{ mW}$) y otro de Helio/Neón ($\lambda = 543 \text{ nm}$; $633 \text{ nm}/10 \text{ mW}$).

En este sistema los láseres están equipados con filtros de densidad neutra para controlar su intensidad y están guiados por una única fibra óptica. La unidad de escaneado, basado en la tecnología de espejos galvanométricos en ambos ejes, desarrolla velocidades de escaneado de un segundo para regiones de 256×256 píxeles y de $10'835$ segundos para regiones de 2048×2048 píxeles en el modo normal. En el

modo de escaneo rápido, bidireccional, el escaneo puede llegar a ser de 0'25 segundos para regiones de 256 x 256 píxeles y hasta dos canales diferentes.

Cada canal permite recoger imágenes de 12 bits (4096 niveles de grises) con aumentos digitales de hasta 10X. El control del eje Z se realiza mediante un mecanismo monitorizado capaz de realizar pasos mínimos de 25 nm. Además, posee un sistema de escaneado secuencial que permite la adquisición de imágenes sin cruzamiento óptico en fluoróforos que presentan un amplio espectro de emisión.

La resolución espacial basada en el objetivo descrito y en las características del escáner, ha sido estimada en 60-80 nm que se corresponden con 2-3 píxeles de separación. El equipo está equipado con el programa de adquisición FluoView 5.0.

2.3. Análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal.

Elegimos el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para analizar las imágenes obtenidas por microscopía confocal. ImageJ es un programa de dominio público creado por Wayne Rasband del National Institute of Health (EEUU). Generado en lenguaje Java, se trata de un programa muy dinámico capaz de funcionar sin demasiadas dificultades incluso con procesadores de la serie Pentium I a 166MHz y memorias reducidas (16 a 32 Mb). El programa es capaz de abrir imágenes sencillas para su procesado o análisis o grupos de imágenes en forma de pilas o secuencias.

Estas secuencias se pueden procesar todas a la vez o imagen a imagen. Mediante la utilización de rutinas informáticas especializadas hemos realizado: recuento de partículas, cálculos de área, estudios de colocalización, obtención de las coordenadas XY del centroide de partículas, estudio de la variación de la intensidad en el máximo de fluorescencia de una partícula con respecto al tiempo, etc.

3. Técnicas básicas de manipulación y clonaje del ADN.

3.1. Generación de los constructos pEGFP-C3-SNAP-25 y pDsRed-C3-SNAP-25, y transfección de células cromafines.

Para la generación de los constructos pEGFP-C3-SNAP-25 y pDsRed-C3-SNAP-25 se emplearon los vectores de expresión pEGFP-C3 y pDsRed-C3 (Clontech, Palo Alto, CA) que expresaban la proteína verde y la roja fluorescente respectivamente.

Se clonó el ADN complementario correspondiente a la isoforma “a” de SNAP-25 (Bark y Wilson, 1994) dentro de dichos vectores en los sitios XhoI y BamHI de forma que se expresase como una proteína de fusión a la región C-term de GFP (constructo pEGFP-C3-SNAP-25; Criado y col., 1999) y de DsRed (constructo pDsRed-C3-SNAP-25). El ADN resultante de la amplificación se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI y se clonó en los mismos sitios en el vector de expresión pEGFP-N1 (Clontech, Palo Alto, CA; Gil y col., 2002).

3.2 Preparación y análisis del ADN.

3.2.1. Preparación de células competentes.

Para la preparación de células competentes se utilizó la cepa de Escherichia Coli DH5 α .

De una reserva de bacterias disueltas en dimetil sulfóxido (DMSO) al 7 % y congeladas en nitrógeno líquido, se descongelaron 50 μ l y se sembraron en una placa Petri de 10 cm de diámetro con agar sin antibiótico (10 gr/l de Triptona, 5 gr/l de Extracto de levadura (Scharlau, Barcelona), 6 gr/l de Agar (Scharlau, Barcelona), en NaCl 170 mM, de pH 7). La placa se incubó a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se detuvo el crecimiento enfriando la placa a 4°C, en espera de la preparación del preinóculo, aislando una de las colonias obtenidas. La preparación del preinóculo se realizó en un matraz con 50 ml de medio LB (10 gr/L de triptona, 5gr/L de extracto de levadura, en NaCl 171 mM, de pH 7), incubándose a 37°C en agitación orbital a 200 r.p.m toda la noche.

Transcurrido ese tiempo, se transfirió aproximadamente 10 ml del preinóculo a un nuevo matraz con 500 ml de LB, y se mantuvo en agitación constante a 37°C hasta llegar a una densidad óptica medida a 600 nm (D.O.600) de aproximadamente 0'5. Cuando se alcanzó la D.O. adecuada el matraz se enfrió a 4°C durante 15 min.

A partir de aquí, todos los procesos se realizaron a 4°C. A continuación, se recuperaron las bacterias centrifugándolas a 2.500xg durante 10 minutos en una centrifuga Beckman GS6 (Beckman Coulter, CA, USA) provista de un rotor JA-10. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 50 ml de medio con CaCl₂ 0'1 M estéril. Tras un nuevo lavado en las condiciones descritas, se recuperaron todos los precipitados obtenidos en un mismo volumen de CaCl₂, y se incubaron en hielo

durante 30 minutos. Finalmente, se recuperó el precipitado y se resuspendió en 15 ml de medio al 15 % en glicerol, con CaCl_2 0.1 M. Se realizaron alícuotas de 100 μl y se congelaron a -80°C .

3.2.2. Transformación de células competentes.

Una vez descongeladas las células competentes en hielo, se mezclaron 45 μl de buffer de transformación (MgCl_2 40 mM y CaCl_2 20 mM), 5 μl de ADN purificado y 25 μl de bacterias competentes. Esta mezcla se agitó y posteriormente se incubó durante 20 minutos en hielo. Transcurrido este tiempo, se incubó otros 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, se añadió 1 ml de medio LB estéril sin antibiótico y se incubó en un termobloque (J.P. Selecta, Barcelona, España) a 37°C durante 60 minutos con agitaciones periódicas.

Durante el transcurso de ese tiempo, se atemperaron en la estufa dos placas Petri de 10 cm de diámetro con agar y kanamicina (Sigma, Madrid) a una concentración de 25-30 $\mu\text{g/ml}$. Los vectores de trabajo, que en este caso se corresponden a los descritos en el apartado 3.1., son resistentes a kanamicina debido a que los plásmidos de expresión pEGFP-C3 y pDsRed-C3 (Clontech, Palo Alto, CA) contienen el gen que les confiere resistencia a ese antibiótico. Pasados los 60 minutos, se centrifugaron las bacterias a 5.000 r.p.m. (2.300xg) durante 2 minutos en una microcentrífuga de mesa, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 150 μl de medio LB.

Por último, se sembraron las dos placas Petri de LB/kanamicina, una con 20 μl de transformación y otra con 100 μl para asegurar la obtención de las colonias deseadas. Una vez sembradas, se incubaron en la estufa a 37°C durante 24 horas.

3.2.3. Chequeo de las colonias obtenidas.

Se realizó un chequeo de las colonias crecidas. Para ello, se picaron varias colonias, se extrajo el ADN y se realizó la digestión correspondiente para verificar la secuencia del plásmido de interés. Se picó una colonia de bacterias con la ayuda de un palillo estéril y se introdujo en un tubo de ensayo estéril con 3 ml de medio LB suplementado con 25-30 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina.

El tubo se incubó a 37°C durante toda la noche en agitación orbital a 200 r.p.m. Este proceso se realizó por triplicado. Transcurrido este tiempo, se recuperaron 2 ml de

medio y se procedió a la extracción del ADN. El mililitro restante se guardó en la nevera para utilizarlo si el chequeo resultaba positivo, apartado 3.2.8.

3.2.4. Purificación del ADN a pequeña escala.

Para la purificación de ADN a pequeña escala se empleó el kit JETquick Plasmid Miniprep Spin Kit/250 (Genomed, Löhne, Alemania).

3.2.5. Cuantificación del ADN.

La cuantificación del ADN se realizó mediante un espectrofotómetro NanoDrop ND-100 (Thermo Scientific, Wilmington, E.E.U.U.). La concentración de ácidos nucleicos suele determinarse midiendo su absorbancia a 260 nm frente a un blanco. Dado que las proteínas absorben a 280 nm, se emplea el cociente A260/A280 nm para calcular la pureza de los ácidos nucleicos. Dicho cociente debe estar comprendido entre 1,8 y 2 para que el ADN obtenido tenga una pureza aceptable.

3.2.6. Digestión del ADN con endonucleasas de restricción.

El ADN fue digerido en la solución tampón adecuada de acuerdo con el fabricante de la enzima. Para las digestiones dobles se buscó un tampón compatible con las 2 enzimas utilizadas. En el caso de que las enzimas necesarias no pudieran ser utilizadas en una misma solución tampón, se procedió a realizar la digestión de manera secuencial. En todos los casos las reacciones se llevaron a cabo durante 1-2 horas a la temperatura óptima para cada enzima. El volumen final utilizado fue de 20 µl y la cantidad de ADN del orden de 0'5-1 µg en todos los casos.

3.2.7. Electroforesis del ADN.

Se utilizaron geles de agarosa en tampón TAE 1x (Tris 0'8 mM, ácido acético glacial 0'38 mM, EDTA 0'02 mM, de pH 7'5) a concentraciones del 1 % (p/v) y se añadió una concentración final de bromuro de etidio de 0'5 µg/ml. Las muestras se prepararon añadiendo a la solución de ADN 1/5 de volumen de tampón de carga 6x. La electroforesis se realizó en tampón TAE 1x a 100 voltios. Las bandas de ADN se

visualizaron con luz UV y se fotografiaron con el sistema de imagen AlphaImager 2200TM (Alpha Innotech Corporation, San Francisco, CA).

3.2.8. Amplificación y purificación del ADN a mayor escala.

Una vez determinado el ADN obtenido, se dispuso a su amplificación y purificación. Para ello, se utilizó un kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen Inc., MD, E.E.U.U.). Se utilizó el mililitro guardado (apartado 3.2.3) de la colonia positiva, y se inoculó en 5 ml de medio LB con kanamicina a una concentración de 100 µg/ml. La mezcla se incubó a 37°C durante aproximadamente 8 h en agitación orbital a 200 r.p.m. Transcurrido ese tiempo, se utilizaron los 5 ml para inocular 250 ml de medio LB con kanamicina (25-30 µg/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó el medio obtenido en dos botes estériles de 500 ml previamente enfriados a 4°C. Se utilizó el rotor JA-10 enfriado a 4°C y se centrifugó a 6.000xg durante 15 minutos a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a temperatura ambiente.

Una vez seco, se resuspendió en 10 ml de tampón P1 (Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, ARNasa A 100 µg/ml, de pH 8) a razón de 5 ml por bote y la solución resultante se traspasó a 2 tubos Nalgene de 50 ml estériles. Se añadieron 10 ml de tampón P2 (NaOH 200 mM, SDS 1 % (p/v) a cada tubo Nalgene, se resuspendió la mezcla y se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Pasado este tiempo, se añadieron otros 10 ml de tampón P3 (acetato potásico 3'0 M, de pH 5'5) a cada tubo, se homogeneizó y se incubó en hielo durante 15 minutos. Transcurridos los 15 minutos, se centrifugó la mezcla a 4°C a 12.000 r.p.m (17.500xg) en el rotor JA-25-50, previamente enfriado, durante 30 minutos. Se recuperó el sobrenadante y se añadió a la columna del kit previamente equilibrada con 10 ml de tampón QBT (MOPS 50 mM, isopropanol 15 % (v/v), Triton X-100 0'15 % (v/v), en 750 mM NaCl, de pH 7). Seguido a la elución del sobrenadante, se lavó la columna añadiendo 30 ml de tampón QC (MOPS 50 mM, isopropanol 15 % (v/v), en NaCl 1'0 M, de pH 7). Este proceso se realizó por duplicado y se evitó en todo momento que la columna se secase.

Por último, para recuperar el ADN se introdujo la columna en un tubo Nalgene y se añadió 15 ml de tampón QF (Tris-HCl 50 mM, isopropanol 15 % (v/v), en NaCl 1'25 M, de pH 8.5). Una vez recuperado, se añadió 10'5 ml de isopropanol a

temperatura ambiente y se centrifugó a 11.200 r.p.m (17.500xg) a 4°C durante 30 minutos. Al finalizar la centrifugación, se localizó el precipitado en el tubo, se descartó el sobrenadante y se añadieron 5 ml de etanol al 70 %. Se volvió a centrifugar a 11.200 r.p.m a 4°C durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se dejó secar temperatura durante unos 10 minutos, para eliminar todo el etanol.

Por último, se añadieron 100 µl de agua destilada estéril, se arrastraron por todo el fondo del tubo y se recogieron en un tubo Eppendorf. Este proceso se realizó por duplicado. Finalmente, se recuperó el ADN purificado disuelto en un volumen final de 200 µl. La cuantificación se realizó tal y como se describe en el apartado 3.2.5.

4. Transfección de células cromafines bovinas.

Para la transfección de células cromafines se empleó la técnica de electroporación en un Nucleofector II de Amaxa (Amaxa GmbH, Koehl, Germany) utilizando el kit básico de nucleofección de esta casa comercial. Tras el recuento celular se tomará una alícuota de células recién resuspendidas en medio sin suero a una concentración de 4-5 millones por electroporación. Se reserva la alícuota mientras se prepara la mezcla de reacción que se adicionará a las células en la cámara de electroporación.

La mezcla de reacción consiste en 100 µl de solución de nucleofección activa, atemperada a temperatura ambiente, por electroporación, que se prepara adicionando 18'2 µl de suplemento a 81'2 µl de solución de nucleofección inactiva, y de 1 a 3 µg del ADN plasmídico que se quiere transfectar en las células. La alícuota de 4-5 millones de células se centrifuga a 850 r.p.m. (100xg) durante 5 minutos, se descarta el sobrenadante, y se resuspende el pellet celular con los 100 µl de solución de nucleofección activa con suavidad, teniendo cuidado de formar burbujas. La suspensión celular se introduce con cuidado de no formar burbujas, en una cámara de electroporación del kit de nucleofección de Amaxa, y se somete al programa de electroporación O-005 de acuerdo con las instrucciones de manufacturado. Este programa se emplea para células neuronales de mamífero obtenidas de un cultivo primario.

Tras ser transformadas, las células cromafines fueron sembradas (apartado 1.1.7.) en placas a una densidad de 10^6 células por placa. Cantidad de células que nos permitirá tener una densidad celular adecuada en cada placa para la realización de los experimentos, ya que el proceso de transfección afecta mucho a la membrana de las células y conlleva a la muerte de la mayoría de la población celular.

Al cabo de 48 horas, y con una viabilidad máxima de 4 días, las células transfectadas han alcanzado un nivel de expresión del vector introducido óptimo para la realización de los experimentos.

5. Obtención de una variante no tóxica de lisenina en *E. coli*. (Venus-poliHis-Tag lysenin).

5.1. Expresión y purificación de Venus-poliHis-Tag lysenin en *E. coli*.

La Venus-lisenina (Hullin-Matsuda y col., 2009), cedida amablemente por el profesor Toshihide Kobayashi, es un mutante fluorescente no tóxico de la proteína lisenina, que se une de forma específica a la esfingomielina (Kobayashi, T. y col., 2004; Canals D. y col., 2010). Es más, la unión es de tipo estequiométrica por lo que a mayor cantidad de esfingomielina más lisenina se unirá a esa zona de la membrana, marcando de este modo zonas ricas en esfingomielina, lo que viene a ser un marcaje general de *membrane rafts*. Para la purificación de lisenina se empleó la resina TALON CellThru de Clontech. Este tipo de resina de afinidad se utiliza para la purificación de proteína que contengan una secuencia de polihistidina, como es el caso de la variante no tóxica de lisenina (33 KDa) que tenemos. El vector de Venus-poliHis-Tag lysenin se transfectó en células competentes de *E.coli* y se expresó en un cultivo de la misma cepa bacteriana.

Tras inducir la expresión de lisenina en *E.coli* con isopropil β -D-thiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM durante 4 horas en 500 ml de LB, se recolectaron las bacterias centrifugando a 3000xg 15 minutos, a una temperatura de 4°C. Los pellets pueden congelarse para purificar la proteína al día siguiente. Siempre se reserva 1 ml para comprobar la expresión de proteína inducida por IPTG.

A continuación se obtuvo un extracto celular lisando las paredes bacterianas con lizozima 75 mg/ml, y ADNasa a una concentración final de 1 U/ml, durante 20 minutos en 25 ml de una solución tampón de equilibrado (fosfato sódico 50 mM, en NaCl 300 mM, de pH 7). Posteriormente adicionando PMSF a una concentración final de 0'1 mM.

Posteriormente, los lisados se sonicaron en 3 ciclos de 30 segundos, con una pausa de 10 segundos en hielo entre cada ciclo. Y por último, el lisado sin centrifugar se

incuba con la resina TALON CellThru, previamente equilibrada en su tampón, durante 20 minutos, a temperatura ambiente y bajo agitación suave.

A continuación, se procede a la elución de la lisenina de la resina de afinidad. Para ello se separó la resina por centrifugación a 700xg, durante 5 minutos, a 4°C, y se decantó el sobrenadante. La resina se lava dos veces con 10 volúmenes de tampón de equilibrado, durante 10 minutos, a temperatura ambiente, y bajo agitación suave. Tras centrifugar a 700xg, durante 5 minutos, a 4°C, se descarta el sobrenadante, y se resuspende la resina con un volumen de tampón de equilibrado.

La resina resuspendida se transfiere a columnas de 2 ml, y se lava con volúmenes de tampón de equilibrado. A continuación se procede a separar la lisenina con 5 volúmenes de tampón de elución (fosfato sódico 50 mM, imidazol 150 mM, en NaCl 300 mM, de pH 7), recolectándose el eluato en fracciones de 0.5 ml, para su posterior análisis en concentración de proteína por el método de Bradford (1976).

Es conveniente tomar muestras de 60 µl tras cada uno de los pasos de purificación, y no únicamente al principio y al final de la purificación, para comprobar mediante electroforesis en gel de SDS que el proceso se ha realizado de forma adecuada.

5.2. Comprobación de la expresión proteica.

Para saber si se ha inducido la expresión de la proteína deseada con IPTG, al pellet congelado de las muestras de 1 ml que hemos cogido previamente de añadir el IPTG y una vez añadido, se le agrega 50 µl de *Buffer Sample* para electroforésis en gel de SDS y 1 µl de lisozima a una concentración de 10 mg/ml. Luego se hacen cinco ciclos de congelación en nitrógeno líquido y descongelación en un baño a 42°C, y entonces se analiza por electroforesis el gel. Las muestras deben de calentarse durante 3 minutos a 90°C antes de cargarlas en el gel, para desnaturalizar bien las proteínas.

Los gels de las muestras se realizaron por duplicado, de esta manera uno se tiñó con azul Coomassie y otro se sometió a *webstern blot* e inmunihistoquímica.

5.3. Determinación de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas purificadas se midió mediante el ensayo de Bradford (1976). Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. Primero preparamos patrones de albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones de 2, 4, 6, 8, 10 y 14 $\mu\text{g/ml}$. Se añadió a los patrones y a los tubos blanco el medio en el que iban disueltas las proteínas, puesto que el imidazol interfiere en la medida colorimétrica. A todos estos tubos se les añadió al igual que a las muestras, 1 ml de reactivo de Bradford, cuya composición es la siguiente: 50 ml de la solución A (100 mg de Azul de Coomassie Brillante G-250 se disuelven en 50 ml de etanol al 95%), 100 ml de ácido orto-fosfórico al 85% y 850 ml de agua destilada. Se mezclaron bien y se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro Biorad Microplate Reader Benckmak (U.K.) a una longitud de onda de 595 nm. Con la recta de calibrado que elaboramos con los patrones (absorbancia frente a la concentración de proteína), extrapolamos la concentración de nuestras muestras.

5.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Se siguió esencialmente la metodología descrita por Laemly (1970). Las proteínas se desnaturalizaron con Dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0'1%, adquiriendo una carga homogénea negativa. Esto facilita su migración en un campo eléctrico a través de un soporte de acrilamida-bisacrilamida que ofrece, por su reticulación, una barrera selectiva al tamaño molecular de las proteínas.

Se utilizaron minigeles de poliacrilamida de 0'75 mm de espesor y de dimensiones de 10x7'5 cm (Acrilamida: N, N'-metilenbisacrilamida 29.2:0.8), constituídos por un gel inferior de separación, al 12% de poliacrilamida, preparado en tampón Tris-HCl 0'375 M, 0.1% de SDS, de pH=8'8, con 0'07% (v/v) de N, N, N', N'-tetrametiletilendiamina (TEMED) y 3'1 mM de persulfato amónico (APS) como polimerizadores; y un gel superior de compactación al 4% de poliacrilamida, preparado en tampón Tris-HCl 0.125 M, 0.1% SDS, con 0.12% (v/v) de TEMED y 5.3 mM de APS, de pH=6'8.

El sistema de geles se preparó utilizando el sistema mini-PROTEAN III. Para ello, primero se preparó la solución separadora, dejándola polimerizar a temperatura ambiente. Para evitar el efecto inhibitorio del oxígeno atmosférico sobre la

polimerización, se añadieron con cuidado 500 µl de agua desionizada sobre la solución. Una vez polimerizado, se eliminó el agua y se añadió la solución de compactación, en la cual se construyeron los 10 pocillos para las muestras.

Después de haber cargado las muestras, se introdujo el sistema en el tanque de electroforesis, el cual se rellenó con tampón de electroforesis con la siguiente composición: Tris 0'025 M, glicina 192 mM, SDS 0'1%, de pH 8'3.

Por último, el sistema se conectó a una fuente de alimentación manteniéndose a un voltaje constante de 120 V, hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el extremo inferior del gel.

Las muestras se solubilizaron en un tampón de electroforesis de composición: Tris 0'062 M, SDS 0.1%, Glicerol 10% (v/v), βMeSH 5% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v), de pH=6'8.

Se utilizaron proteínas de peso molecular conocido preteñidas, como marcadores de peso molecular, para poder estimar posteriormente el peso molecular de las proteínas detectadas, las cuales fueron: fosforilasa B (111 kDa), albúmina sérica bovina (73 kDa), ovoalbúmina (47'5 kDa), anhidrasa carbónica (33'9 kDa), inhibidor de tripsina (28'8 kDa) y lisozima (20'5 kDa).

5.5. Tinción de geles.

La tinción se desarrolló directamente sobre el gel de poliacrilamida, según la técnica descrita por Fairbanks y col. (1971) con algunas modificaciones.

Se colocó el gel en una bandeja de pyrex que contenía la solución de coloración: Metanol al 40%, ácido acético al 10% y azul Coomassie Brillante R-250 al 0'1% (p/v), y se mantuvo en agitación durante aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, los geles se destiñeron mediante varios cambios de una solución compuesta por 20% de Metanol y 10% de ácido acético, hasta que se perdió la coloración de fondo.

5.6. Western blot e inmunohistoquímica.

Para comprobar si habíamos amplificado y purificado la proteína lisenina, uno de los geles realizados a partir de las muestras se sometió a *western blot* en un sistema clásico de la casa Biorad (Madrid, España). Posteriormente se hizo una inmunohistoquímica de la membrana de nitrocelulosa con un anticuerpo policlonal específico para lisenina (*Lysenin Antiserum* de Pentanova, Alemania). El revelado de la membrana de nitrocelulosa se realizó empleando el kit de Sigma SIGMAFAST™ BCIP/NBT tablet.

6. Microscopía de luz evanescente en células cromafines en cultivo: TIRFM.

La microscopía de luz evanescente o TIRFM (del inglés: “Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy”) es una técnica utilizada para observar la interfase entre dos medios con diferente índice de refracción (Axelrod, 1981; Axelrod y col., 1984; Axelrod, 2001 b). Originalmente, esta técnica se utilizó para observar la adhesión de una célula a un sustrato, hoy en día, como veremos más adelante, tiene un gran número de aplicaciones. El principio físico de la técnica de TIRFM consiste en que cuando un rayo de luz incide oblicuamente en la interfase creada entre dos medios ópticos con diferente índice de refracción, de manera que el primer medio (n_1) tiene un índice de refracción mayor que el segundo (n_2), como ocurre con el cristal ($n_1 = 1.52$) donde se apoyan las células y el interior celular o un medio acuoso ($n_2 = 1.33$), y lo hace con un ángulo de incidencia (θ) mayor al denominado ángulo crítico (θ_c) (1), se produce reflexión total interna, TIR, creándose un campo de energía electromagnética o campo evanescente en la interfase entre ambos medios (Figura 12).

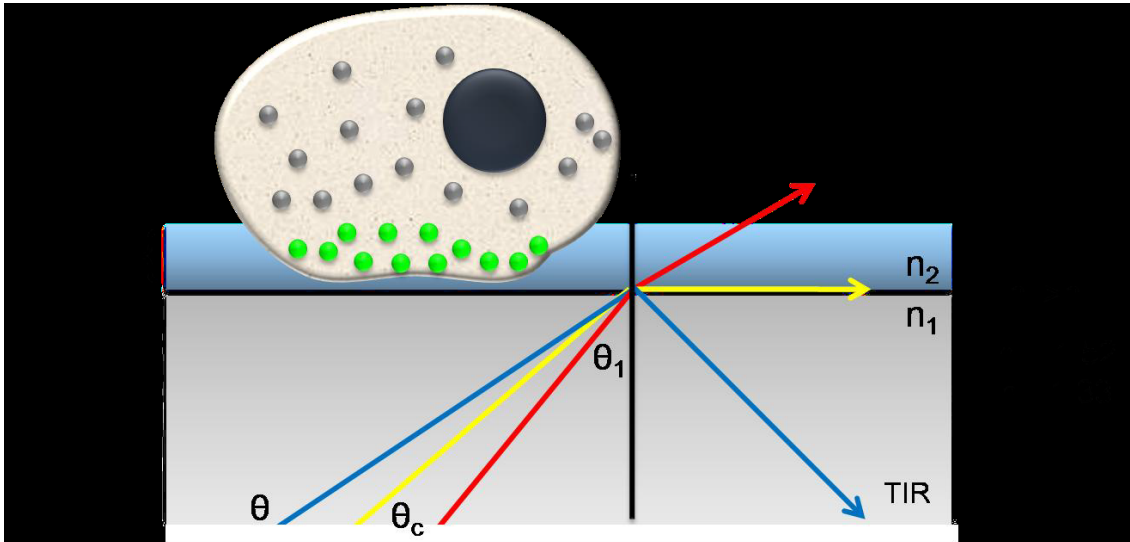


Figura 12. La técnica de TIRFM consiste en que cuando un rayo de luz incide oblicuamente en la interfase creada entre dos medios ópticos con diferente índice de refracción, de manera que el primer medio (n_1) tiene un índice de refracción mayor que el segundo (n_2), y lo hace con un ángulo de incidencia (θ) mayor al denominado ángulo crítico (θ_c), se produce reflexión total interna, TIR, creándose un campo evanescente en la interfase entre ambos medios.

El campo evanescente es una onda que se propaga paralela a la interfase formada entre los dos medios. Dicha onda disminuye en intensidad (I) (2) de manera exponencial a medida que aumenta la distancia con la interfase, es decir, a medida que se adentra en el eje Z . La constante de la caída exponencial de la onda evanescente, d (3), a medida que se adentra en el interior celular depende de las características del equipo de TIRFM, ya que depende del ángulo de incidencia (θ) y la longitud de onda (λ) de la luz de excitación, y de los índices de refracción de ambos medios (n_1 y n_2). Por sus características, esta técnica permite visualizar la membrana plasmática y las partículas fluorescentes que se encuentran en contacto directo con ella o dentro del campo de excitación evanescente que se extiende hasta unos 300 nm de profundidad.

$$1). \theta_c = \frac{\text{sen}^{-1} n_2}{n_1}$$

$$2). I = I_0 \cdot e^{-z/d}$$

$$3). d = \frac{\lambda}{4\pi(n_2^2 \cdot \text{sen}^2 \theta - n_1^2)^{1/2}}$$

Las características de esta técnica hacen que se utilice para múltiples aplicaciones dentro de la bioquímica y la biología molecular entre las que cabe destacar (Axelrod, 2001 b):

Visualización de las regiones de contacto de las células al sustrato; esta técnica puede ser utilizada para observar la posición, extensión, y movimiento de las regiones de contacto de las células con el sustrato (Weis y col., 1982).

Existen dos formas principales para dirigir la luz del láser hacia la interfase de la muestra: a través de un prisma (en inglés: *prism-type*) y a través de un objetivo de alta apertura numérica ($A.N > 1.4$) (en inglés: *objective-type*) (Axelrod, 2001 a). Todos los experimentos de TIRFM se realizaron con un iluminador de TIRF, que permitió la observación mediante la iluminación de luz evanescente mediante la introducción de un sistema láser Multi-Argón ($\lambda = 458 \text{ nm}; 488 \text{ nm}; 515 \text{ nm}/10 \text{ mW}$). Este sistema está dotado de un objetivo de inmersión en aceite 100X de alta apertura numérica ($A.N = 1.45$). Las imágenes fueron adquiridas con una cámara digital ECCD (Electron enhanced CCD) refrigerada de alta resolución integrada en el programa de análisis (modelo C9100-02, Hamamatsu, Japón). La frecuencia de adquisición fue desde una imagen por segundo (1 imag. /s) hasta una imagen cada 20 milisegundos (1 imag. /20 ms) dependiendo del tipo de experimento. Las imágenes fueron adquiridas a la resolución de 130 nm por pixel. En este sistema, se estimó una profundidad de penetración de la onda evanescente en el campo evanescente de unos 120 nanómetros ($d = 120 \pm 20 \text{ nm}$).

6.1. Estudio de la movilidad de los microdominios formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP25 en células cromafines en cultivo.

Se utilizó la técnica de TIRFM (argón $\lambda = 488$) para obtener imágenes de la formación de parches en la membrana plasmática de las células cromafines debido a la sobre-expresión de SNAP25. Se utilizó la misma técnica para obtener secuencias temporales o videos de 60 s de duración, a la frecuencia de una imagen por segundo (1 imag. /s), del movimiento de dichos parches.

Para ello, se transfectaron células cromafines recién aisladas con GFP-SNAP25 (Abs 488 / Em 508). Las células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas a 37°C para la correcta expresión del constructo.

Se utilizaron las imágenes obtenidas para realizar un estudio del área y la densidad de los parches de expresión y las secuencias temporales para analizar el movimiento en el eje X-Y (apartado 6.3), el desplazamiento cuadrático medio o MSD (apartado 6.3), y el movimiento en el eje Z (apartado 6.4) de dichos parches.

6.2. Estudio de la movilidad de las vesículas cromafines en células sin transfectar.

Para el marcaje de las vesículas cromafines se utilizó la sonda fluorescente naranja de acridina, un colorante acidotrópico que tiende a almacenarse en el interior de las vesículas cromafines (Invitrogen, Barcelona). Esta sonda se utiliza para el marcaje y seguimiento de orgánulos ácidos entre los que se encuentran las vesículas cromafines. Sus propiedades se describen en detalle en el apartado 7, ya que en dicho apartado se detalla el empleo de este colorante en el estudio de la fusión vesicular por métodos ópticos.

Para estudiar el movimiento de las vesículas cromafines en las células, se incubaron las células con el marcador de vesículas ácidas naranja de acridina a la concentración de 2 μ M durante 20 minutos a temperatura ambiente en un medio K/H basal, y se visualizaron mediante la técnica de TIRFM. Se tomaron secuencias temporales (60 segundos, 1 imagen/s) mediante la utilización del láser 488 (Argón $\lambda = 488$).

6.3. Análisis del movimiento lateral de las vesículas y de los parches de expresión de las proteínas SNARE.

Cálculo del desplazamiento cuadrático medio

Elegimos el programa de dominio público ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para realizar el seguimiento del centroide de las partículas detectadas, vesículas y proteínas SNARE, en el eje X-Y.

Para el cálculo del desplazamiento lateral se obtuvieron las coordenadas XY del centroide de cada una de las partículas durante intervalos de tiempo de 20 segundos. Esto permitió calcular, con la ayuda del programa Igor Pro v. 3.13 (WaveMetrics, Inc., OR; USA), el desplazamiento lateral total (desplazamiento en el eje X-Y) y el desplazamiento cuadrático medio o MSD. Para el cálculo del MSD se utilizó la ecuación descrita por Qian y colaboradores en 1991 (Qian y col., 1991):

$$(1) \text{MSD}(n\delta t) = \frac{1}{(N-1)} \sum_{j=1}^{N-1} \{ [x(j\delta t + n\delta t) - x(j\delta t)]^2 + [\gamma(j\delta t + n\delta t) - \gamma(j\delta t)]^2 \}$$

Las imágenes se adquirieron a intervalos de tiempo δt . Las coordenadas de las partículas en una imagen concreta eran $x(j\delta t)$ e $y(j\delta t)$ y en la imagen inmediatamente posterior $x(j\delta t + n\delta t)$ e $y(j\delta t + n\delta t)$. En cada secuencia temporal el desplazamiento durante el intervalo de tiempo $n\delta t$ puede medirse para $(N-n)$ intervalos, donde N es el número total de imágenes adquiridas.

El cálculo del MSD permite deducir el tipo de desplazamiento que gobierna a las partículas. De este modo, al representar el MSD obtenido frente al tiempo y ajustarlo a un tipo de ecuación, se puede deducir el tipo de movimiento que describen las partículas y averiguar si se trata de un movimiento de difusión simple, o si por el contrario se trata de una difusión anómala, un movimiento dirigido o una difusión confinada en una caja.

Si los datos obtenidos de representar el MSD frente al tiempo se ajustan mejor a una recta significa que el movimiento de las partículas está sujeto a un movimiento de difusión simple. De la pendiente de la recta, que equivale a $4 \times D$, se puede obtener el coeficiente de difusión (D) de las partículas. Sin embargo, cuando el movimiento está descrito por una difusión confinada en una caja los datos se ajustarán mejor a una curva cuya ecuación será del tipo:

$$(2) \text{MSD}(\Delta t) = r_c^2 \left[1 - A_1 \exp\left(-\frac{4A_2 D \Delta t}{r_c^2}\right) \right]$$

Esta ecuación representa los dos primeros términos de una serie infinita, donde A_1 y A_2 son constantes (0.99 y 0.85 respectivamente) determinadas por la geometría de la caja; D es el coeficiente de difusión confinado y r_c es el radio de la caja circular teórica. Sin embargo, el MSD puede utilizarse para calcular el radio teórico cuando $\Delta t \rightarrow \infty$ ya que los datos se ajustan a un valor asintótico: el radio de la caja circular teórica que limita el movimiento de la partícula estudiada.

6.4. Análisis del movimiento axial de las vesículas y de los parches de expresión de las proteínas SNARE.

Para realizar los cálculos de desplazamiento en el eje Z o desplazamiento axial (Johns y col., 2001) se analizó la variación de intensidad en el máximo de fluorescencia de las partículas, vesículas y proteínas SNARE, con respecto al tiempo. Las secuencias

temporales adquiridas para este estudio fueron de 60 segundos de duración a la frecuencia de 1 imagen por segundo. Se adquirieron imágenes de 8 bits de profundidad, o lo que es lo mismo, 256 niveles de gris, de manera que el valor 0 significa ausencia de señal, negro, y el 255 saturación de la señal, blanco. Los datos de fluorescencia obtenidos, de cada una de las partículas con respecto al tiempo, fueron transformados en datos de distancia (Z ; en nanómetros) a partir de la fórmula (1), que como ha sido descrito con anterioridad (apartado 6.3.; fórmula (2)), tiene en cuenta el decaimiento exponencial de la onda evanescente a medida que se adentra en el interior celular.

Por tanto, partiendo de la fórmula:

$$1). I = I_o \cdot e^{-Z/d}$$

Y despejando Z , tenemos:

$$2). Z = -d \ln\left(\frac{I}{I_o}\right)$$

Donde: $d = 120$ nm (120 ± 20 nm para nuestro equipo, apartado 5 de la metodología), I es la fluorescencia máxima de la partícula e I_o es el máximo de fluorescencia para imágenes de 8 bits, es decir, 255. La transformación de datos de fluorescencia (I) en datos de distancia (Z) se realizó con ayuda del programa Graphpad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, USA). De acuerdo con este planteamiento hay varios puntos a tener en cuenta a la hora de analizar los datos obtenidos de cada una de las partículas:

- Una partícula con una intensidad de fluorescencia de 255 niveles de gris ($I = 255$) se encuentra en contacto directo con la membrana plasmática de la célula ($Z = 0$).
- Cuando una partícula disminuye en intensidad de fluorescencia con el tiempo significa que se está alejando de la membrana plasmática (I disminuye, Z aumenta), por el contrario, si aumenta su fluorescencia significa que se está acercando (I aumenta, Z disminuye).

Sin embargo, este planteamiento puede llevar a error en imágenes con mucho ruido de fondo, ya que en estas imágenes la intensidad de la fluorescencia que presentan las partículas es mayor que su intensidad real. Por este motivo, la fórmula (2) ha sido adaptada para cada una de las partículas, es decir, a I se le restó el valor de fluorescencia

del fondo celular. De lo contrario, se está asumiendo que una partícula con un valor determinado de I pero con un ruido de fondo elevado, se encuentra a la misma distancia de la membrana plasmática que otra partícula con un valor de I similar pero con un ruido de fondo inferior.

También es importante resaltar que dos partículas con un ruido de fondo y una intensidad de fluorescencia semejante puede que no se encuentren a la misma distancia de la membrana plasmática. Esto puede ser debido a que no siempre todas las zonas de la membrana plasmática se encuentran planas o pegadas al cristal donde se apoya la célula. Por ello, es más apropiado referirse a la distancia en el eje Z con respecto al origen del campo evanescente en lugar de a la membrana plasmática. Además, por este motivo, a la hora de comparar entre las distintas partículas es más útil hallar la variación de Z (ΔZ) en un intervalo de tiempo determinado que la distancia promedio de las partículas al origen del campo evanescente. La ΔZ da una idea de la amplitud del movimiento y la fluctuación de las partículas en la célula.

7. Análisis de las fusiones vesiculares.

Para el marcaje de las vesículas y el análisis de las fusiones vesiculares se utilizó la sonda fluorescente naranja de acridina (NA) (Invitrogen, Barcelona). Se trata de un colorante catiónico, fluorescente y metacromático, que marca orgánulos ácidos, lisosomas, endosomas y vesículas sinápticas, tanto en células vivas como en células fijadas. Cuando se encuentra en solución, unido a polianiones o en forma de monómeros emite fluorescencia ortocromática verde, mientras que cuando se producen agregados del mismo emite fluorescencia metacromática roja (Wolf y Aronson, 1961). Al tratarse de una base débil, es atraída de forma natural por los componentes ácidos de la célula, pero una vez en el interior de dichos componentes se protona y queda atrapada, polimerizando y cambiando sus propiedades de absorción.

Por las características descritas, el naranja de acridina es un excelente marcador de exocitosis (Zoccarato y col., 1999). Cuando las células se incuban con este marcador, este se acumula y agrega en la matriz de las vesículas ácidas emitiendo fluorescencia roja, de manera que se puede estimar la población de dichas vesículas. Durante la exocitosis, la apertura del poro de fusión equilibra el pH ácido del interior vesicular que lleva a un cambio rápido de la fluorescencia emitida, que pasa de roja a verde, seguido de una disipación de los monómeros en el espacio extracelular. Esto se traduce en que

las fusiones vesiculares pueden ser visualizadas a modo de destellos de fluorescencia verde.

Para estudiar las fusiones vesiculares en células cromafines, se incubaron las células con naranja de acridina 2 μ M durante 20 minutos a 37°C en un medio K/H basal (KH_2PO_4 1'2 mM, KCl 4'7 mM, MgCl_2 1'2 mM, CaCl_2 2'5 mM, glucosa 11 mM, HEPES 15 mM, en NaCl 134 mM, de pH 7'4). A continuación, se estimuló la exocitosis de estas células mediante despolarización celular con un medio K/H alto potasio (KCl 59 mM, equilibrado con NaCl) aplicado directamente sobre la célula durante 60 segundos mediante un sistema de perfusión. Empleando TIRFM se tomaron secuencias temporales de esos 60 segundos de estimulación a la frecuencia de 1 imagen /20 ms. Para la toma de imágenes se adquirieron las vesículas en el canal de emisión en rojo y fusiones vesiculares en el canal de emisión en verde se utilizó un solo láser (Argón $\lambda = 488$) y el separador de luz emitida Optosplit II.

Se calculó el porcentaje de fusiones vesiculares mediante la imagen acumulativa o la proyección Z obtenida del canal de emisión en verde, teniendo en cuenta el número total de vesículas calculado a partir de la imagen acumulativa obtenida del canal de emisión en rojo. Las características cinéticas de las espigas individuales generadas por las fusiones vesiculares, visualizadas a modo de destellos de fluorescencia verde, fueron analizadas utilizando el programa Igor Pro v 5.0 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, EEUU). Este programa, está dotado de un software desarrollado para el análisis de espigas amperométricas (Quanta analysis; Mosharov y Sulzer, 2005). Se analizaron cientos de espigas resueltas con claridad y se calculó el $t_{1/2}$ (Figura 13), que es la anchura a la mitad de la altura del pico y refleja la cinética de las fusiones vesiculares. Los datos obtenidos se representaron en forma de distribuciones.

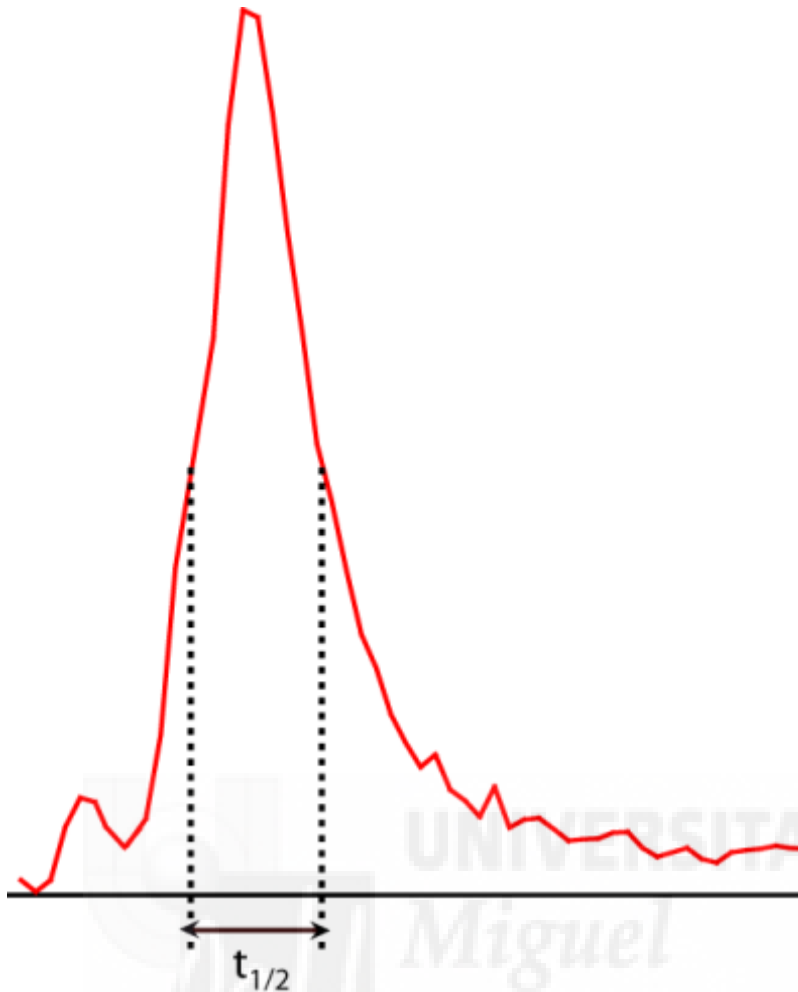


Figura 13. Ejemplo de una espiga generada por la fusión de una vesícula. En la imagen puede observarse una espiga generada por la fusión de una única vesícula y el parámetro que ha sido analizado de cientos de estas espigas, el $t_{1/2}$.

8. Determinación amperométrica de la exocitosis en células cromafines cultivadas.

8.1. Características del equipo de registro.

Para estudiar la secreción de células individuales por amperometría, las células se plantaron en placas Costar de 30 mm de diámetro a una densidad de 150.000 células/cm².

Se emplearon electrodos de fibra de carbono aislados con polipropileno de 14 μm de diámetro (fabricados en el propio laboratorio) (4) para registrar las catecolaminas liberadas; los cuales, se colocaron en estrecho contacto con la superficie celular con ayuda de un micromanipulador hidráulico de alta precisión y observando una deformación de la membrana usando para ello, una óptica de Hoffman (Modulation

Optics, Greenvale, NY, EEUU) montada en un microscopio Axiovert 135 de óptica invertida (Zeiss, Oberkochen, Alemania).

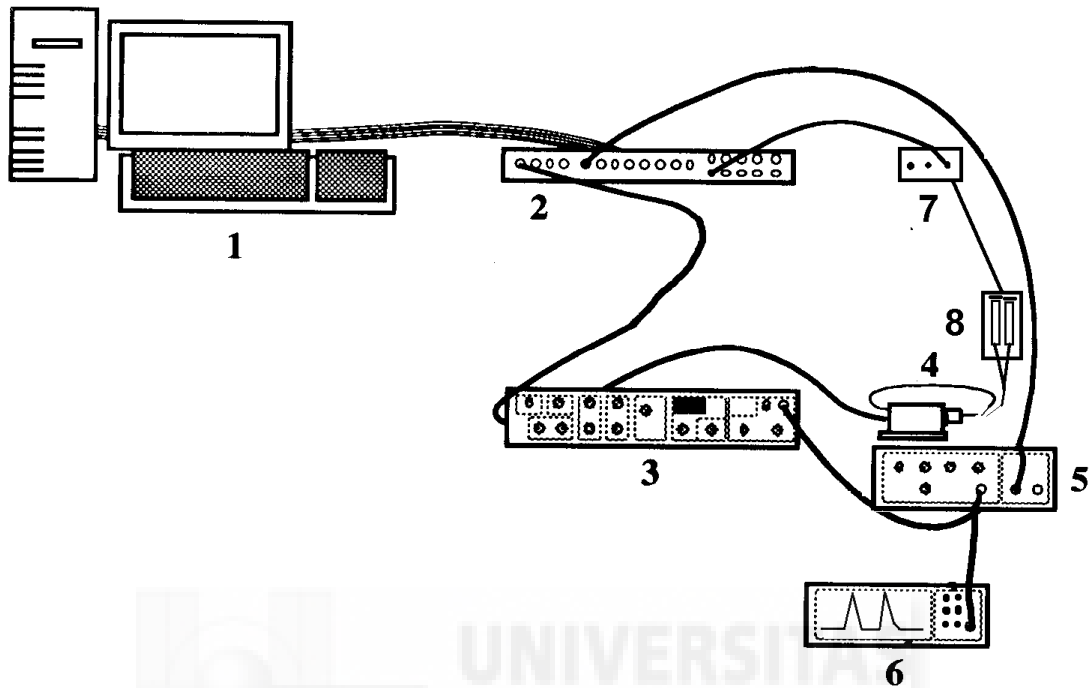


Figura 14. Esquema del equipo de registro amperométrico. 1) Ordenador PC Pentium III. 2) Tarjeta convertidora analógica/digital Digital 1200 (Axon Instruments, Foster City, CA, EEUU). 3) Amplificador Axopatch 200A. 4) Fijación del electrodo (Head-stage). 5) Filtro analógico DigiData 1200 INTERFACE (Axon Instruments, Foster City, CA, EEUU). 6) Osciloscopio analógico/digital. 7) Controlador de válvulas de perfusión. 8) Pipeta de perfusión.

Se utilizó un electrodo de referencia en el baño de Ag/AgCl y la conexión eléctrica entre el electrodo de fibra de carbono y el electrodo del aparato de medida se realizó con mercurio.

El amplificador empleado fue un Axopatch 200A (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, EEUU) (3) en el que se fijó el potencial de oxidación a +650 mV.

El producto de la corriente de la oxidación de catecolaminas fue digitalizado con un A/D convertidor (Digital 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, EEUU) (2) y registrado a 200 μ s/punto usando el programa Clampex (Axon Instruments, Foster City, CA, EEUU). El ordenador de adquisición utilizado fué un PC Pentium III (1).

Simultáneamente la señal se registró en un osciloscopio analógico/digital (Scope HM305, HAMEG 30 MHz) (6) y se filtró con un filtro analógico (DigiData 1200 INTERFACE, Axon Instruments, Foster City, CA, EEUU) (5) a 50 Hz para las cinéticas

de secreción y a 400 Hz los registros que se utilizaron para el análisis de espigas individuales.

Las células fueron superfundidas con medio basal y el estímulo o el medio de permeabilización fueron aplicados a través de un sistema de perfusión (8) dispuesto a unos 100-200 μm . de las células a estudiar, el cual, se controlaba con válvulas (7) que eran comandadas por el software de adquisición.

8.2. Fabricación de los electrodos de fibra de carbono.

Los electrodos de fibra de carbono aislados con propileno, se construyeron utilizando una fibra de carbono de 14 μm de diámetro (Thornell P-55, Amoco Corp., Greenville, SC). Una única fibra de carbono se aspiró por capilaridad dentro de una punta de pipeta de cristal (ref. 16.2023, Iberlab, Cartagena, Murcia). Con la ayuda de una lupa binocular y una resistencia circular, la punta con la fibra dentro, se calentó hasta que el propileno de la punta de pipeta se quedó lo más pegado posible a la fibra de carbono para aislarla bien. Entonces el final de la punta se cortó con un bisturí y el propileno presente en esa zona, se retrajo mediante calor dejando al descubierto una mínima porción de la fibra de carbono, lo suficiente para obtener una señal de oxidación. Para poder sujetar el electrodo a la *head-stage*, dentro de la pipeta se insertó un capilar de vidrio de 1 mm de diámetro y mercurio para establecer la conexión eléctrica entre la fibra de carbono y el hilo de platino de la *head-stage*.

8.3. Análisis de los datos amperométricos.

Los registros de las cinéticas de secreción se integraron y se promediaron utilizando el programa gráfico Igor Pro versión 3.13 (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, EEUU) instalado en un ordenador PC clónico.

Las características de espigas individuales fueron analizadas usando el macros de Igor-Pro Quanta Analysis (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, EEUU), el cual, nos permite analizar parámetros cinéticos (ver fig. 2), como la amplitud de las espigas, es decir, su altura; la carga (Q), que es el área que queda contenida por la espiga, el $t_{1/2}$, que es la anchura a la mitad de la altura del pico, el pie de la espiga, el cual, se produce por la liberación del poco contenido que se encuentra dentro de la vesícula en libre

9. La técnica de FRET.

El FRET (transferencia de energía resonante de Förster, del inglés *Förster resonance energy transfer*, aunque estas siglas también suelen traducirse por transferencia de energía resonante fluorescente), es un mecanismo de transferencia de energía entre dos moléculas (Förster, 1948), que pueden ser fluorescentes o no. Consiste en que una molécula donadora excitada transfiere energía a una molécula aceptora, que debe encontrarse muy próxima a la primera para que el fenómeno pueda producirse, típicamente entre 1 y 10 nm (Hevekerl y col., 2011). Dicha transferencia de energía se produce de forma no radiativa por acoplamiento entre las dos moléculas. Para que el fenómeno pueda producirse, es necesario que la energía que emite la molécula donadora sea de una intensidad adecuada para que la receptora pueda absorberla, condición que se cumple si el espectro de emisión de un fluoróforo donador se solapa ampliamente con el espectro de absorción de otro fluoróforo que actuará de receptor.

En términos prácticos, si una célula expresa o está marcada a la vez con dos moléculas fluorescentes e iluminamos la muestra con una longitud de onda capaz de estimular solamente una de ellas, si las moléculas interactúan de modo que los dos fluoróforos estén separados por una distancia comprendida entre 1 y 10 nm, parte de la energía que absorbe la molécula donadora puede ser transferida a la molécula receptora. Al estudiar las células al microscopio, si las dos moléculas interactúan, se observará un descenso en la intensidad de la luz que emite el donante en condiciones normales, a la vez que observamos señal de la segunda molécula, a pesar de que no esté siendo estimulada con su longitud de onda óptima.

9.1. Análisis de las imágenes de FRET.

Los experimentos de FRET se realizaron expresando SNAP25-DsRed como aceptor de FRET, y ácido arquidónico-BODIPY, ó esfingosina-BODIPY, ó FTY720-BODIPY a la concentración de 1 μ M como molécula donadora. La señal de FRET se midió en un microscopio confocal Leica TCS2, empleando un *software* diseñado especialmente para la calibración de la señal empleando únicamente la molécula aceptora ó la donadora, según el método descrito por Van Rheenen en 2004. En estos

experimentos la señal aparente de FRET de parches individuales de SNAP25-DsRed fue expresada mediante la siguiente ecuación:

$$E_A(i) = \frac{(B - Ab - C(c - ab))}{C}$$

Dónde la eficiencia aparente de FRET ($E_A(i)$) es una función dependiente de la intensidad del donador, de la señal de FRET y de los canales aceptores (A, B, y C), así como los factores de la calibración obtenidos a partir de muestras que contienen únicamente al donador o al aceptor (a, b y c). Estas muestras de calibración se midieron cada día que se realizaba un experimento, y los parámetros de la calibración se calcularon a partir de 10 células diferentes evitando la saturación de la intensidad de la señal. El programa para la determinación de FRET proporciona parámetros constantes para la intensidad del láser y el canal de adquisición.

En estos experimentos empleamos dos tipos de controles, uno consistía en la incubación con BODIPY libre y el otro en esfingosina-BODIPY que apenas penetra en el interior de la célula (Darios y col., 2009).

10. Análisis estadístico.

Para el tratamiento estadístico, se utilizó el test del t-Student para parejas de datos o el test ANOVA de dos colas para el establecimiento de la significancia estadística entre los datos de los diferentes experimentos (las muestras fueron consideradas significativas cuando $p < 0.05$). Todos los datos han sido expresados como la media \pm error medio para los diferentes experimentos llevados a cabo en un número n de células diferentes. Los datos presentados representan experimentos llevados a cabo en células individuales de al menos tres cultivos diferentes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN



1.1. Microdominios ricos en esfingomielina de la membrana plasmática colocan con clusters de SNAREs marcados por sobreexpresión de SNAP25-DsRed.

La forma en que se regula la segregación espacial de las proteínas y complejos proteicos en la membrana es una cuestión aún por esclarecer. Estudios recientes sugieren que los *lipid rafts*, microdominios ricos en colesterol y esfingolípidos, tienen un papel esencial en la exocitosis regulada. La asociación de las SNAREs con los *lipid rafts* hace que estas proteínas se concentren en sitios definidos de la membrana plasmática. Es más, se ha determinado que una reducción del colesterol inhibe la exocitosis regulada, lo que nos indica que los *lipid rafts* juegan un papel muy importante en la exocitosis (Salaün y col., 2004).

La hipótesis original sobre los *lipid rafts* propone que las plataformas-lipídicas/rafts de la cara exoplásmica de la membrana están formadas por el fuerte agrupamiento (*tight clustering*) de esfingolípidos y colesterol. Su estado físico, presumiblemente similar a una fase líquido-ordenada en modelos de membrana, hace que sean resistentes al tratamiento con detergentes y concentren proteínas en ellos. Basándose en este concepto, las membranas resistentes a detergentes (DRMs) de células solubilizadas se consideraron como *lipid rafts* preexistentes de células vivas. Hasta la fecha, más de 200 proteínas han sido encontradas en los DRMs incluyendo miembros de la superfamilia SNARE. Su asociación con los *rafts* implica que no se distribuyen uniformemente en la membrana, es más, estudios de microscopía revelan que las SNAREs se concentran en submicrodominios, dependientes de colesterol donde fusionan las vesículas (Davletov & Montecucco, 2010). La asociación de las SNAREs con los dominios DRM ha sido investigada en diversos tipos celulares, empleando una alta variabilidad de condiciones para la solubilización y la inclusión o exclusión de detergente en los pasos del gradiente. Por este motivo los resultados son difíciles de comparar, y muchas veces se llega a resultados que plantean un conflicto.

Sin embargo, la idea de que las SNARE forman parches en *lipid rafts* ha cambiado, ya que no colocan con marcadores de *rafts* clásicos Thy-1 (Lang y col. 2001), y flotilin (Ohara-Imaizumi y col. 2004), y las SNAREs son excluidas de la fase líquido-ordenada de los modelos de membrana. Independientemente de este hecho, el criterio de solubilización ha sido criticado en los últimos años por diversas razones, conduciendo a una definición más exacta de un *raft*. Un consenso reciente se ha alcanzado en el modelo de *raft*, el término *lipid raft* ha sido sustituido por el de

membrane raft que son definidos por pequeños (10-200nm), heterogéneos, altamente dinámicos, dominios enriquecidos en esteroles y esfingolípidos que compartimentalizan los procesos celulares (Lang, 2007). Pequeños *rafts* a veces son estabilizados mediante interacciones proteína-proteína o proteína-lípido para formar plataformas más grandes (Pike, 2006).

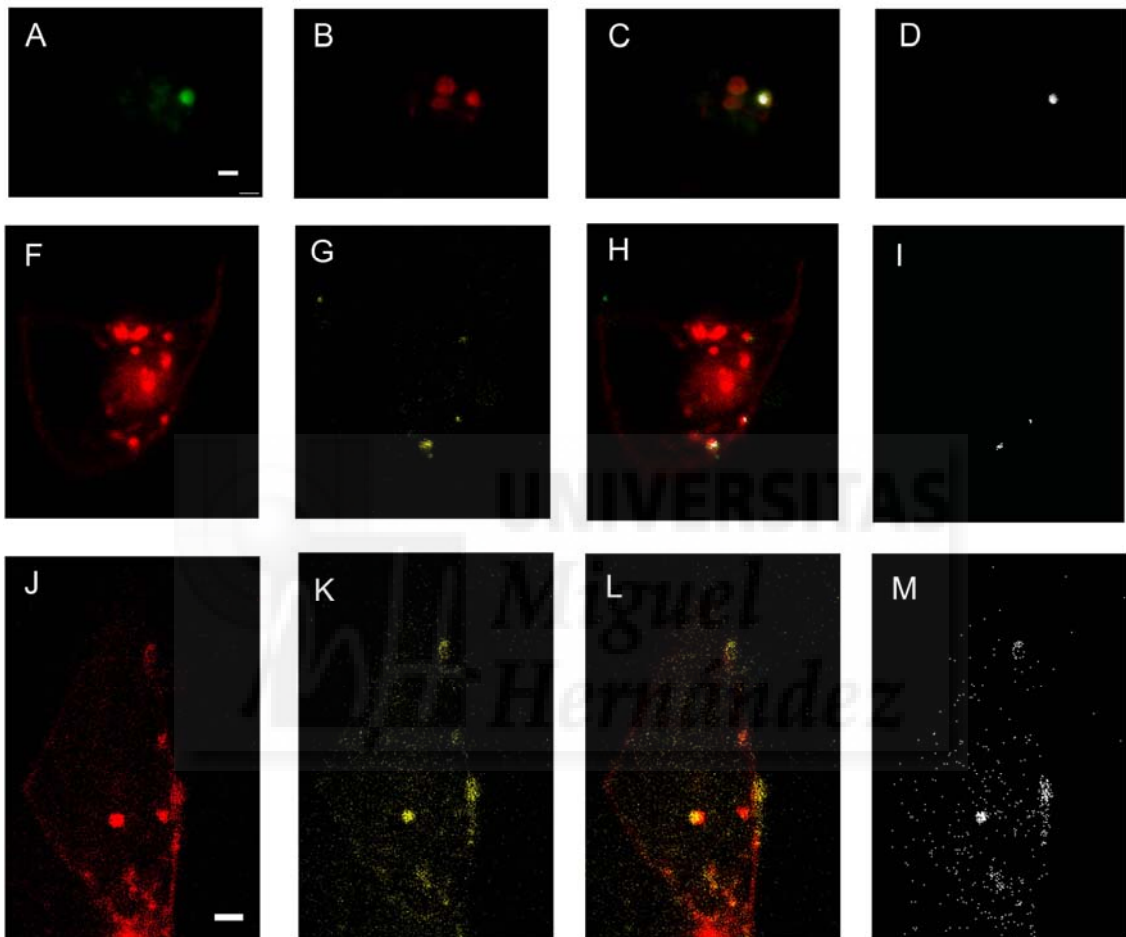


Figura 16. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia donde se visualiza la Venus-lisena, en amarillo, marcando *lipid rafts* de forma generalizada, y en rojo la beta-lactosil-cerámida *Texas Red*, transformada en esfingomiélin. Mientras que tenemos GFP-SNAP25 en verde y SNAP25-DsRed en rojo. Distribución de *lipid rafts* marcados con beta-lactosil cerámida *Texas Red* (B). Distribución de parches marcados con GFP-SNAP25 (A) en el canal verde. Distribución de parches lipídicos marcados con lisena (G) y (K) en el canal amarillo. Distribución de microdominios de SNARE SNAP25-DsRed (F) y (J). Las imágenes solapadas (C, H, L y P), y la máscara de colocalización (D, I, M y Q) obtenida mediante una coincidencia superior al 50% en ambos canales demuestran la colocalización parcial de los *lipid rafts* con parches de SNARE. Escala de 1 μm en (A) y de 2 μm en (J).

Por lo expuesto aquí y en el apartado de introducción, es esperable que tanto los lípidos señal como la maquinaria secretora se encuentren asociados, en menor o mayor grado, con las balsas lipídicas (*membrane rafts*). Por ello se han empleado dos marcadores genéricos de balsas lipídicas, beta-lactosil-ceramida y Venus-lisenina (Hullin-Matsuda y col., 2009), cedida amablemente por el profesor Toshihide Kobayashi, para estudiar la coincidencia espacial de las balsas lipídicas con los parches de SNAREs marcados por sobreexpresión de GFP-SNAP25 y SNAP25-DsRed respectivamente.

La beta-lactosil ceramida Texas Red es transformada por la célula en un derivado fluorescente de la esfingomielina que a su vez es metabolizado en esfingosina (Tyteca y col., 2010). La localización de este lípido fluorescente incorporado a la membrana plasmática fue estudiado mediante microscopía confocal en células que expresaban GFP-SNAP25. La proteína GFP-SNAP25 se asocia con la proteína syntaxina en la membrana plasmática para formar parches dinámicos (López y col., 2009). Se encontraron dos tipos de distribución de esfingomielina fluorescente que iban desde unos parches muy bien definidos a una distribución dispersa de parches más pequeños (Figura 16 y 18).

Por otro lado, la Venus-lisenina es un mutante fluorescente no tóxico de la proteína lisenina, que se une de forma específica a la esfingomielina (Kobayashi, T. y col., 2004; Canals D. y col., 2010). Es más, la unión es de tipo estequiométrico por lo que a mayor cantidad de esfingomielina más lisenina se unirá a esa zona de la membrana, marcando de este modo zonas ricas en esfingomielina, lo que viene ser un marcaje general de *membrane rafts*.

Con ambos marcajes de *membrane raft* se encontró colocación parcial con los parches de SNAREs.

Para determinar en qué grado se encontraban relacionados los parches de SNAREs y los *membrane raft*, se realizó un estudio sobre la colocación a lo largo del tiempo de microdominios ricos en esfingosina marcados con lisenina, y de parches de SNAP25-DsRed. Los datos mostraron que los parches que colocan permanecen unidos a lo largo del tiempo, teniendo curvas de desplazamiento cuadrático medio similares. Es más, mediante el análisis de los datos con un Test de t-Student pareado se demostró que los datos de movilidad de parches de SNAP25-DsRed y los datos de microdominios ricos en esfingomielina marcados con lisenina se encuentran relacionados a lo largo del tiempo del experimento (Figura 17).

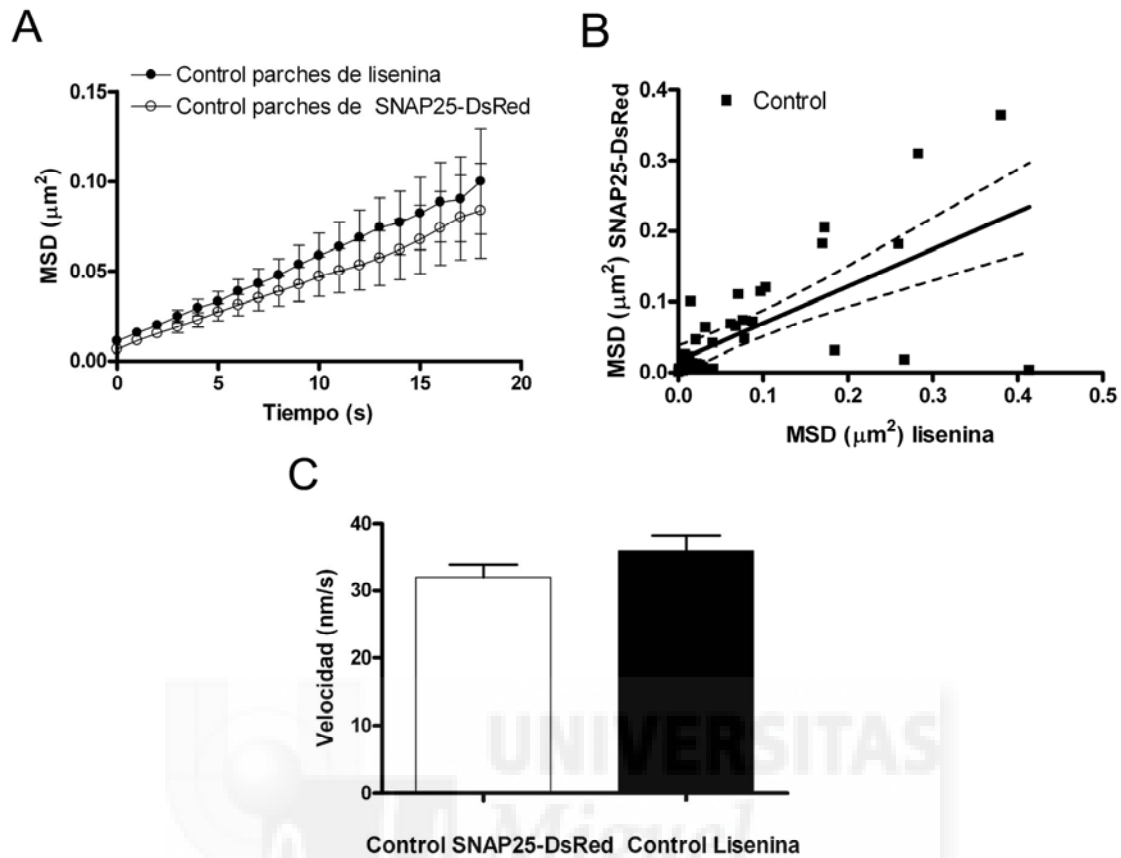


Figura 17. Colocalización a lo largo del tiempo de clusters de SNAREs y balsas lipídicas. En **A** se representa el desplazamiento cuadrático medio de los *clusters* de SNAP25-DsRed junto con su homólogo de colocación *balsa lipídica* marcado con lisenina. En **B** tenemos el ajuste a un polinomio de grado uno de los datos del MSD de parches de SNAREs y sus homólogos lipídicos a un tiempo de 15 minutos. El Test pareado de la t-Student nos dio un nivel de significación de $***P < 0'0001$, lo que quiere decir que los datos sobre el MSD de *clusters* de proteína SNAP25-DsRed y los microdominios lipídicos marcados con lisenina se encuentran pareados. Presentan las mismas variaciones a lo largo del tiempo. En **C** se representa la velocidad de los parches de SNAREs junto con las balsas de lípidos con las que colocalizan. No se observaron diferencias significativas entre la velocidad de los clusters de SNAP25-DsRed y los parches de lisenina. $***P < 0'0001$. Según el Test de t-Student pareado.

Está demostrado que las SNAREs asociadas a la membrana plasmática sintaxinas1-4, SNAP-25 y SNAP-23 se encuentran concentradas en estructuras que describen un punteado bajo microscopía, y se denominan parches (*clusters*) para la mayoría de los grupos. Se ha determinado que existe un solapamiento parcial entre parches de SNAP-25 y sintaxina-1 (Lang y col. 2001), indicando que existen diferentes subpoblaciones de parches que difieren en su composición. El tamaño de los parches de

sintaxina fue analizado y determinado entre 170-256 nm para sintaxina 1 en células neuroendocrinas (Lang y col., 2001) y beta-pancreáticas (Ohara-Iaizumi y col., 2004), y para sintaxina 3 y 4 de células epiteliales (Low y col., 2006). Para parches de SNAP-25 se determinó un valor de 277 nm (Ohara-Iaizumi y col., 2004). Nuestro grupo también determinó la existencia de parches de proteínas SNARE (Lopez y col., 2010). En un estudio más reciente, empleando microscopía STED se procedió a una mayor resolución de los parches de sintaxina-1 (Sieber y col., 2006; Rickman y col., 2010), visualizándose que los parches clásicos observados por microscopía convencional están compuestos por pequeños parches individuales. Por lo tanto, debido a limitaciones técnicas el tamaño de los parches de SNARE ha sido sobreestimado en unos 100 nm.

La integridad de los parches es dependiente de colesterol, ya que los mayores cambios de redistribución en sintaxina 1 (Lang y col., 2001; Ohara-Iaizumi y col., 2004), sintaxina 3 (Low y col., 2006) y SNAP-23 (Chamberlain & Gould, 2002) se observan induciendo una reducción del colesterol de la membrana plasmática. En contraste, los parches de sintaxina 4 son estables aún deprimiendo el contenido de colesterol de la membrana (Low y col., 2006). Es más, ha sido observado que el colesterol fotoactivable se encuentra unido a sintaxina 1, entrecruzado, sugiriendo una gran proximidad de las dos moléculas en la membrana, más bien debido a que el colesterol se encuentra en el interior de los parches de sintaxina (Lang y col., 2001). El colesterol, y por lo tanto la integridad de la membrana parece ser de gran importancia funcional, ya que una reducción del colesterol conlleva a una inhibición de la secreción en células neuroendocrinas (Chamberlain y col., 2001; Lang y col., 2001). En cultivos de hipocampo, una disminución del colesterol conlleva a un aumento de la neurotransmisión espontánea y un mal funcionamiento del potencial evocado (Wasser y col., 2007). Debido a que la integridad de los parches depende del colesterol, no es suficiente para promover la formación de parches de sintaxina. En suma, interacciones que implican el motivo SNARE de la sintaxina son esenciales (Sieber y col., 2006). Es más, ha sido documentado que la integridad de parches de sintaxina 3 y 4 depende de los microtúbulos y filamentos de actina respectivamente (Low y col., 2006). La segregación de las diferentes sintaxinas en *clusters* distintos se explica por la interacción de éstas con diferentes proteínas, esto explica por qué las sintaxinas 1 y 4 (Sieber y col., 2006) o las sintaxinas 3 y 4 (Low y col., 2006) se segregan estrictamente en *clusters* distintos. El atraque y la fusión ocurrirán en parches de sintaxina, la segregación de los diferentes tipos de sintaxina en parches separa los diferentes tipos de eventos

exocitóticos que tienen lugar en la membrana plasmática, compartimentalizándose así los procesos celulares. De hecho, se ha visto que las syntaxinas 1 y 4 definen lugares de atraque y fusión correspondientes a organelas secretoras distintas. En células neuroendocrinas y beta-pancreáticas, las organelas secretoras atracan y fusionan en parches de syntaxina 1 (Lang y col., 2001; Ohara-Imaizumi y col., 2004; Aoyagi y col., 2005), y en células epiteliales parches de syntaxina 4 representan lugares de atraque y fusión de *caveolae* (Predescu y col., 2005).

1.2. Los lípidos señal colocalizan parcialmente con los microdominios de SNARE marcados por sobre-expresión de SNAP25-DsRed.

Puesto que la maquinaria secretora colocaliza parcialmente con las balsas lipídicas, decidimos comprobar si los lípidos señal adicionados de forma exógena eran capaces de unirse a la maquinaria secretora. Para determinar la coincidencia espacial de la maquinaria secretora con los lípidos señal ácido araquidónico y esfingosina, en primer lugar se recurrió a la sobreexpresión de la proteína SNARE SNAP25-DsRed en un cultivo primario de células cromafines bovinas y microscopía confocal de fluorescencia. Estas células fueron incubadas con análogos fluorescentes de los lípidos señal objeto del estudio de este trabajo ácido araquidónico y esfingosina, cedidos por R. Bittman, para determinar su colocalización (Figura 18). Se observó una colocalización parcial de estos lípidos añadidos de forma exógena con los *clusters* de SNAREs.

En segundo lugar, para determinar si existía una interacción molecular directa entre los lípidos señal y las proteínas SNAREs, se llevaron a cabo experimentos de FRET (Figura 19). Células cromafines bovinas que sobreexpresan SNAP25-DsRed fueron incubadas en cuatro condiciones diferentes: 1 μM BODIPY FL como condición control, 1 μM AA-BODIPY, 1 μM esfingosina-BODIPY, y 1 μM esfingosina-BODIPY en presencia de digitonina 10 μM para permeabilizar la célula.

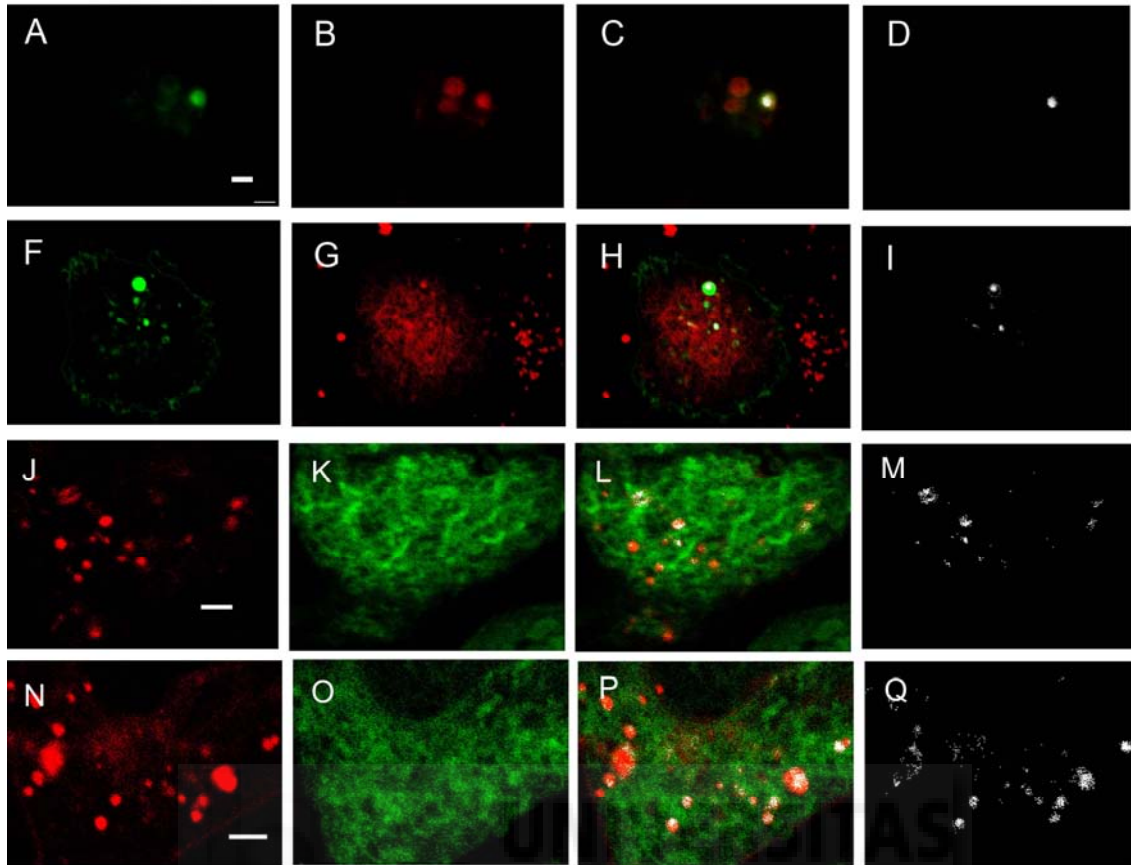


Figura 18. Imágenes de microscopía confocal de fluorescencia donde se visualiza la esfingomielina, esfingosina y ácido araquidónico adicionados de forma exógena. Células cromafines bovinas fueron transfectadas para la sobreexpresión del vector GFP-SNAP25 y tras dos días se incubaron con *Texas-Red ceramide*, que es metabolizada en un análogo fluorescente de esfingomielina. Podemos observar el marcaje de GFP-SNAP25 en **A** y **F**, mientras que en **B** y **G** tenemos la esfingomielina fluorescente. Se observan dos tipos de distribución de lípidos: *rafts* bien definidos (**B**) y parches de una distribución más dispersa (**G**). Se realizaron experimentos similares expresando SNAP25-Ds-Red en células cromafines bovinas (**J** y **N**) e incubándolas con esfingosina-BODIPY (**K**) ó ácido araquidónico-BODIPY (**O**). Las imágenes solapadas (**C**, **H**, **L** y **P**), y la máscara de colocalización (**D**, **I**, **M** y **Q**) obtenida mediante una coincidencia superior al 50% en ambos canales demuestran la colocalización parcial de estos lípidos con parches de SNARE. Las barras representan 1 μ m.

Para poder evaluar si la señal de FRET era de mayor intensidad en alguna de las cuatro condiciones experimentales, se midió la intensidad media de fluorescencia del canal rojo cuando se excitaba con el láser a 488 nm (señal de FRET) en regiones de interés (ROI). Lo que se expresó en forma de porcentaje respecto a la intensidad media de fluorescencia obtenida en condiciones óptimas cuando se utiliza la excitación propia de SNAP25-DsRed (láser 543) (**E**), eliminando el cruce de canales mediante factores

obtenidos de imágenes que implican únicamente al donador o al aceptor, de acuerdo con Van Rheenen y col. (2004) (Figura 19).

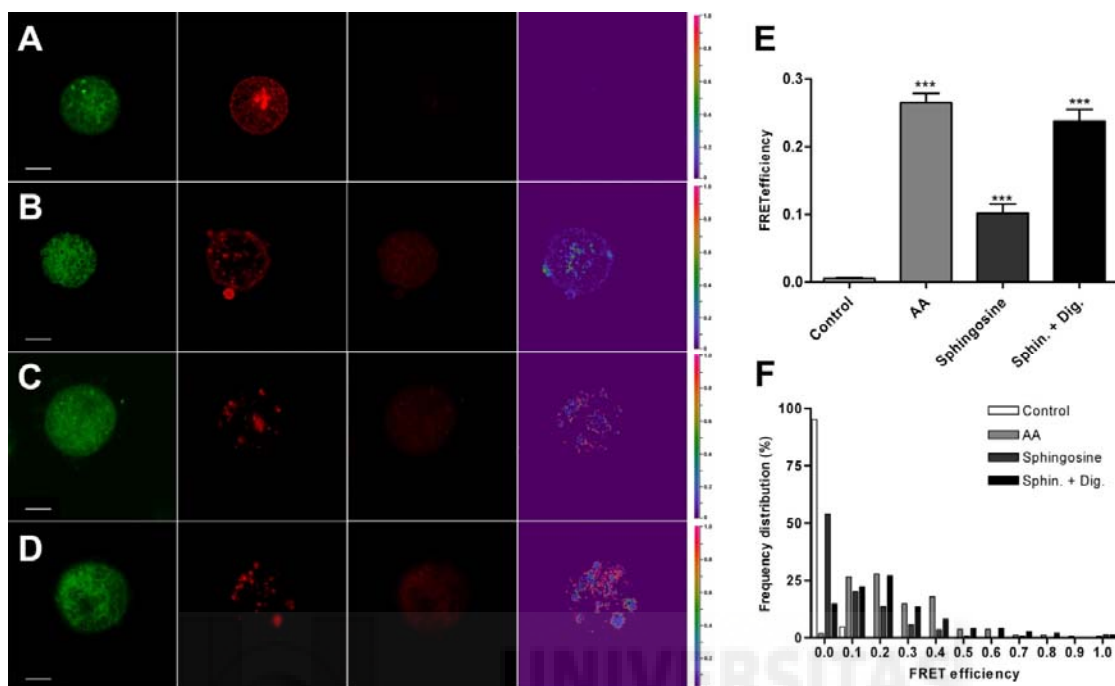


Figura 19. La señal de FRET sugiere una interacción molecular directa entre los lípidos señal y los microdominios de SNARE. Células cromafines bovinas que sobrexpresan SNAP25-DsRed fueron incubadas en cuatro condiciones diferentes: 1 μ M BODIPY FL como condición control (A), 1 μ M AA-BODIPY (B), 1 μ M esfingosina-BODIPY (C), y 1 μ M esfingosina-BODIPY en presencia de digitonina 10 μ M para permeabilizar la célula (D). Se representan cuatro condiciones experimentales: de izquierda a derecha tenemos el donador y el aceptor, cada uno de ellos obtenido empleando el láser óptimo para su excitación, y las imágenes de FRET y de eficiencia de FRET, obtenidas excitando el donador con el láser 488. En (E) y en (F) se representa el análisis de los datos de FRET. Distribución de los datos de la señal aparente de FRET (F). N = 145 ROI para 11 células tratadas con BODIPY FL, N = 162 ROI para 24 células tratadas con AA-BODIPY, N = 139 ROI para 21 tratadas con esfingosina-BODIPY treated cells, y N = 148 ROI para 34 células tratadas con esfingosina-BODIPY previamente permeabilizadas con digitonina. Escalas: 3 μ m.

Se observó una señal significativa de FRET para AA-BODIPY, señal que podría indicar una interacción directa entre AA y los parches de SNAREs (p-valor: $<0'0001$). Respecto a la esfingosina, los resultados mostraron una menor eficiencia de FRET (p-valor: $<0'0001$) cuando fue incubada con células no permeabilizadas, probablemente debido a que la esfingosina no difunde fácilmente al interior de la célula. Sin embargo, tras permeabilizar las células con digitonina la señal aparente de FRET entre la esfingosina y SNAP25-DsRed aumentó (p-valor: <0.0001) de forma considerable. Estos

datos se confirmaron al observar un desplazamiento de la distribución de los valores de FRET hacia valores de eficiencia más altos (Figura 19.F.)

Se confirmó que ambos lípidos señal adicionados de forma exógena se situarían en los parches de SNARE, y existiendo además una interacción molecular directa entre estos lípidos y los complejos SNARE.

Está claro que las proteínas SNAREs forman *clusters* interactuando con los lípidos de la membrana, lo que aún queda por determinar es cómo se producen las interacciones proteína-proteína dentro de estos *clusters*. Rickman y sus colaboradores determinaron que la distribución de los lípidos en la membrana no afecta la morfología de los *clusters* de SNARE a un nivel de microscopía confocal convencional, sin embargo, al emplear técnicas como el FRET demostraron que la conformación de cada *cluster* de SNARE se ve afectada por el microambiente lipídico en el que se encuentran.

Por otro lado, se ha determinado un papel modulador de la interacción entre proteínas SNAREs, y por lo tanto de la endocitosis y exocitosis, para los lípidos señal ácido arquidónico y esfingosina. Ambos lípidos señal interactúan con proteínas SNARE moldeándolas y favoreciendo la formación de complejos SNARE. Es más, se ha determinado que el metabolismo lipídico tiene un papel esencial en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (Davletov & Montecucco, 2010).

Los ácidos grasos metabolizados por las fosfolipasas PLA₂, PLC y PLD se han visto implicados en la regulación de la fusión desde décadas atrás (Rossetto y col., 2006; Brown y col., 2003; Vitale y col., 2001). Multitud de quinasas y fosfatasa cambian el estado de fosforilación de lípidos que contienen inositol regulando el tráfico de membranas (Martin, 2001; Wenk y De Camilli, 2004; Osborne y col., 2006).

Queda bastante claro que la bicapa de fosfolípidos de la membrana no es una simple plataforma física donde residen las SNAREs, si no que representa un microambiente dinámico que regula la función de las proteínas (Huang y col., 2006; Wenk y De Camilli, 2004; Hu y col., 2003).

A parte de la modificación directa por unión de lípidos a proteínas residentes en la membrana, como la palmitoilación de SNAP25 en su dominio transmembrana (TMR), estudios recientes indican una activación de la molécula de syntaxina por ácidos grasos omega-3 y omega-6 (Darios y Davletov, 2006; Rickman y Davletov, 2005; Connell y col., 2007; Latham y col., 2006), mediante una interacción temporal y no de unión covalente. Los ácidos grasos son liberados al citosol tras la despolarización de la

membrana o por mediación de un receptor de factores de crecimiento, hormonas o neurotransmisores (Bradford y col., 1983; Irvine, 1982; Bazan, 2005; Kim y col., 1999; Chang y col., 2006; Bazan y col., 1986). Los ácidos grasos esenciales omega-3 y omega-6 juegan un papel muy importante en la fluidez de la membrana debido a su libertad de movimiento (Kim y Edsall, 1999; Salem y Niebylski, 1995).

Los ácidos grasos poliinsaturados tienen comúnmente una alta velocidad de disociación, y pueden difundir al interior de la célula sin la necesidad de ningún transportador (Hamilton, 2004). El ácido araquidónico es liberado de la membrana por la acción de las PLA₂s, alcanzándose una concentración local de 50-75 μ M en células endocrinas secretoras de insulina (Wolf y col., 1991). Dentro de las acciones del ácido araquidónico en la regulación de las proteínas SNARE se ha demostrado que el ácido araquidónico regula positivamente la fusión tanto en células intactas como permeabilizadas (Prasarnpun y col., 2004; Tse y col., 1982).

Otros autores han observado una fuerte correlación entre las propiedades estructurales de la syntaxina 3 durante el crecimiento neuronal, y la syntaxina 1, la isoforma más abundante en el cerebro, ambas syntaxinas son sensibles al ácido araquidónico (Connell y col., 2007; Latham y col., 2006), lo que nos sugiere un papel conservado de las fosfolipasas en la regulación de la maquinaria de fusión, las SNAREs.

La estructura de la syntaxina está muy conservada a lo largo de la evolución (Rizo y Sudhof, 2002; Munson y col., 2000), consiste en un motivo SNARE en forma de gancho que se ancla en la membrana de forma autónoma, y se pliega sobre su dominio N-terminal. Este dominio N-terminal a su vez se pliega sobre el motivo helicoidal SNARE, inhibiendo de esta forma el ensamblaje del complejo SNARE (Rizo y Sudhof, 2002; Ungar y Hughson, 2003; Dulubova y col., 1999).

En esta conformación plegada, la syntaxina se une a una proteína citosólica, Munc18, que inhibe el ensamblaje del complejo SNARE (Rizo y Sudhof, 2002; Misura y col., 2000). Es de destacar que el ácido araquidónico es capaz de activar a syntaxina cuando está unida con Munc18, permitiendo la unión de su motivo SNARE al complejo sin romper la unión existente entre syntaxina y Munc18 (Rickman y Davletov, 2005; Connell y col., 2007). Es posible que ácidos grasos insaturados, debido a su flexibilidad (Brash, 2001), penetren en los dominios hidrofóbicos existentes entre las hélices anfipáticas de la syntaxina, perdiéndose la estructura de conformación cerrada de la syntaxina y permitiendo la formación del complejo SNARE. Este tipo de unión ha sido descrito en varias proteínas que unen ácidos grasos (Hamilton, 2004). Es más, se ha

determinado que la concentración media de ácido araquidónico necesaria para activar la syntaxina es de 50 μM (Rickman y Davletov, 2005), concentración que se alcanza de manera sobrada de forma local tras la activación de las PLA_2s (Brash, 2001; Wolf y col., 1991).

Por otro lado, un gran número de estudios nos muestran que el metabolismo de los esfingolípidos tiene un papel fisiológico de gran importancia en la exocitosis vesicular. Se ha visto que la actividad de la esfingomielinasa (SMase) está unida a la liberación de neurotransmisores en neuronas del cerebelo y el mesencéfalo, así como en células PC12 (Blöchl y Sirrenberg, 1996; Jeon y col., 2005; Numakawa y col., 2003). A su vez, recientemente estudios genéticos involucran directamente a la ceramidasa en la transmisión sináptica (Rohrbough y col., 2004). Es más, se ha determinado que un metabolito de la esfingosina potencia la secreción de glutamato en neuronas de cultivo primario de hipocampo (Kajimoto y col., 2007) y la liberación espontánea de acetilcolina en la unión neuromuscular de la rana (Brailoiu y col., 2002). Mientras que la ceramida y la esfingosina 1-P han sido investigadas en profundidad, hay muy poca información sobre la habilidad de la esfingosina para regular la neurotransmisión (Colombiani y García-Gil, 2004). Darios y sus colaboradores determinaron, mediante un barrido de lípidos, que la esfingosina potencia con una alta especificidad a la sinaptobrevina vesicular en la formación de complejos SNARE ternarios, un paso esencial en la fusión vesicular. Además determinaron que la esfingosina potencia la exocitosis en la unión neuromuscular, en neuronas de hipocampo, en sinaptosomas de extracto cerebral y en células neuroendocrinas.

La esfingosina alivia la inhibición que presenta el tramo citoplasmático de la sinaptobrevina, permitiendo la formación del complejo SNARE ternario. La carga positiva de la esfingosina puede romper las fuerzas electrostáticas e hidrofóbicas locales que existen entre la sinaptobrevina y la membrana vesicular, al interactuar con el extremo citoplasmático de la sinaptobrevina. Es de hacer notar que el extremo citoplasmático de la sinaptobrevina presenta cuatro aminoácidos básicos centrados alrededor de triptófanos que son de naturaleza hidrofóbica, residuos que pueden contribuir a la interacción de la sinaptobrevina con los fosfolípidos de la membrana vesicular (Kweon y col., 2003; Quetglas y col., 2000). Luego la esfingosina como molécula señal que es, potencia tanto la exocitosis como la formación de complejo SNARE ternario.

Tanto la membrana plasmática como la membrana vesicular contiene esfingomielina y ceramida (Lahiri y Futerman, 2007; Takamori y col., 2006), así como se ha estimado que cada vesícula contiene unas 500 moléculas de esfingomielina (Takamori y col., 2006). Además, estudios pertinentes realizados con SMase demuestran que se libera la suficiente cantidad de esfingosina en las membranas neuronales para que se produzca la activación tanto del ensamblaje del complejo SNARE como de la exocitosis vesicular (Darios y col., 2009).

De todo lo expuesto se deduce que la producción de esfingosina en las terminales sinápticas potencia tanto la formación de complejo SNARE ternario como la fusión vesicular. El mecanismo sería el siguiente: la unión de sinaptobrevina a syntaxina-SNAP25 resulta en el ensamblaje del complejo SNARE y por lo tanto en un aumento del RRP de vesículas (*ready release pool*). Es más, recientemente se ha visto que el metabolismo de la esfingomielina y sus metabolitos se encuentra alterado en enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Nieman-Pick y otros desórdenes neurológicos (Dasgupta y col., 2007; He y col., 2010; Matsuda y col., 2007; Rodriguez-Lafrass y Vanier, 1999), siendo muy posible que la desregulación de la función de la sinaptobrevina conduzca a este tipo de desórdenes. La identificación de la sinaptobrevina como una diana de la esfingosina ha llevado al desarrollo de fármacos que mimetizan a la esfingosina, como es el caso del tratamiento de la esclerosis múltiple (Kappos y col., 2006).

1.3. El movimiento de los microdominios de SNAREs resulta afectado por la presencia de lípidos señal.

Dado que los lípidos señal son capaces de interactuar molecularmente con las SNAREs, nos preguntamos si esta interacción podría cambiar la actividad general de las proteínas SNARE.

Para determinar cómo los lípidos señal afectan a la dinámica del movimiento de los parches de SNAREs de la membrana plasmática, se realizaron experimentos de microscopía TIRF con células que sobreexpresaban GFP-SNAP25. Las imágenes fueron registradas en intervalos de 1 segundo, definiendo los parches de SNAREs y analizando su trayectoria para calcular su velocidad y sus parámetros de difusión. En la Figura 20 se representan ejemplos de secuencias de videos tomadas cada 5 segundos para las condiciones experimentales control (Figura 20 A), células tratadas con ácido

araquidónico 100 μM (Figura 20 B), y por último el tratamiento con SMase 1 U/ml durante 30 minutos (Figura 20 C) (Darios y col.; 2010; Darios y col.; 2009).

Bajo estas condiciones los parches de membrana de SNAP25 muestran un movimiento caracterizado por oscilaciones cortas en el plano XY, con una velocidad media de 30 nm/s. La velocidad media de los parches de SNAP25 no varía notablemente con los tratamientos (Figura 20 D), mientras que el desplazamiento cuadrático medio (MSD) vs tiempo revela que el tratamiento con SMase hace que el movimiento de las vesículas se vea moderadamente restringido, describiendo una curva de crecimiento exponencial con saturación que describe un movimiento contenido en una caja (Figura 20 E, curva para el tratamiento con SMase). De forma interesante, después del tratamiento con AA, el movimiento de los microdominios de SNAP25 sufre una restricción espacial mucho más severa, mostrando un elevado nivel de inmovilización (Figura 20 E, curva para el tratamiento de ácido araquidónico).

Asumiendo que el movimiento de los parches de SNAREs es gobernado por un único coeficiente de difusión, el valor de dicho coeficiente puede ser obtenido de la pendiente de la curva que representa el MSD a lo largo del tiempo (pendiente= $4 \times D$) (Qian y col., 1991), de modo que el coeficiente aparente de difusión fue de $1.35 \pm 0.01 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para el control de microdominios de SNAP25, mientras que el coeficiente de difusión estimado para los *clusters* de células tratadas con SMase fue de $6.7 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$, y se vio reducido a $1.0 \pm 0.2 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ en células tratadas con AA, diez veces menor que el coeficiente de difusión de parches en células control.

El movimiento del análisis en Z nos proporciona más información sobre el efecto de los lípidos señal. El máximo de intensidad de fluorescencia correspondiente a píxeles bien definidos de parches de SNAP25 fue estudiado (alrededor de unos 100 parches para cada condición experimental), y después la intensidad de fluorescencia se transformó en distancia empleando la ecuación del decaimiento exponencial del campo evanescente. Los parches control de GFP-SNAP25 tienden a moverse en una distancia de 50 a 250 nm en la zona donde se genera el campo evanescente (Figura 20 F). Sin embargo, en células tratadas con SMase este rango de distancia se ve acortado, lo que resulta en una pequeña reducción de la amplitud del movimiento en Z (ΔZ , Figura 20 G), ya que tras la producción de esfingosina en la proximidad de los parches de SNAP25, éstos tienden a moverse a corta distancia en el plano perpendicular a la membrana plasmática. Es importante hacer notar que tras el tratamiento con AA durante

30 minutos las células tienden a redondearse, y por lo tanto la determinación de la distancia en Z se ve afectada por pérdida de adherencia de la célula en el cubre.

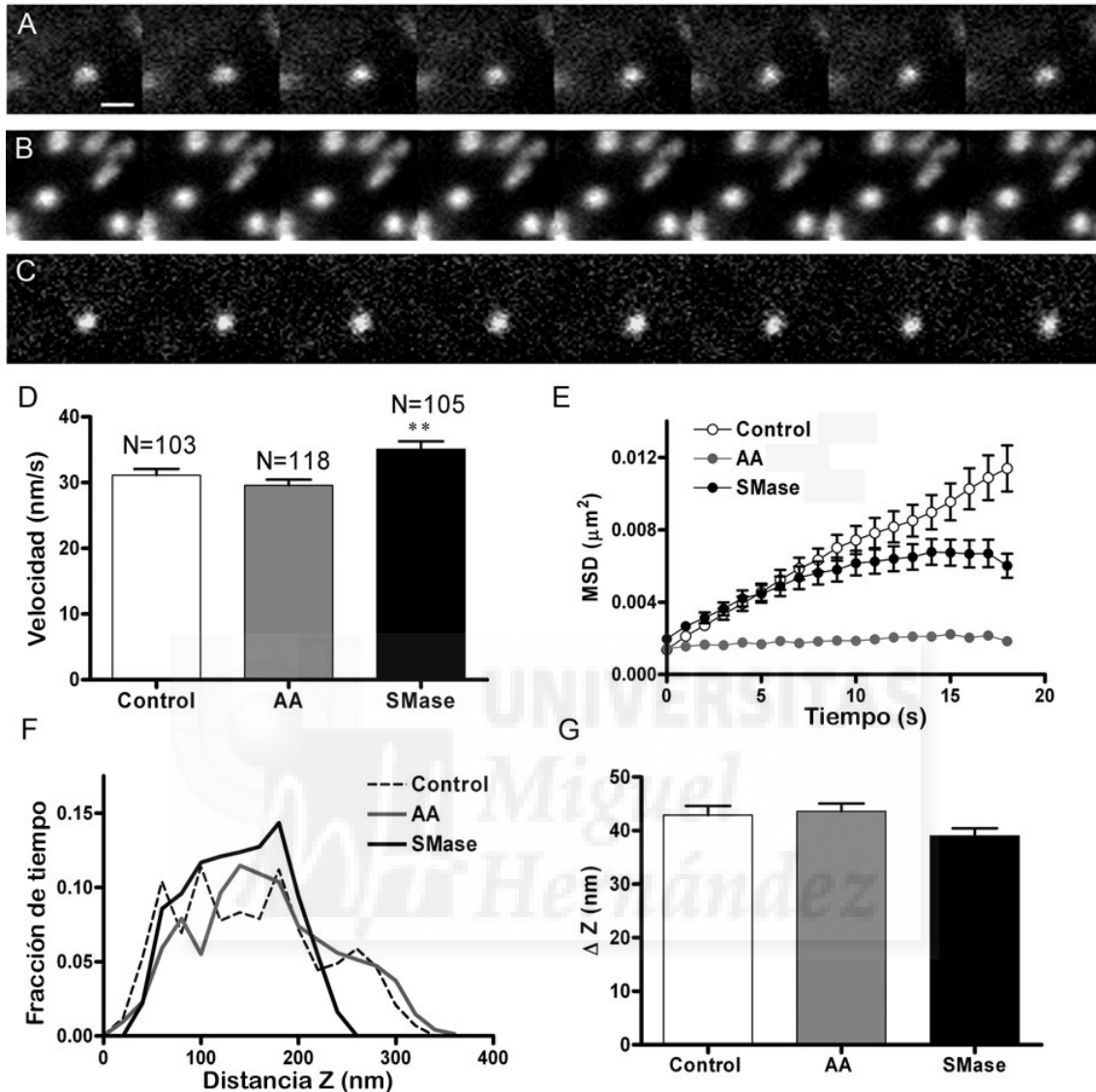


Figura 20. El movimiento bidimensional de los *clusters* de SNAREs se ve restringido en células tratadas con SMase y AA. La dinámica de los microdominios formados por GFP-SNAP25 fue estudiada a partir de imágenes tomadas en intervalos de 1 segundo en células control, células tratadas con AA 100 μM, y en células tratadas con SMase 1 U/ml durante 30 minutos. Las imágenes que muestran representan intervalos de 5 segundos de *clusters* de SNAREs en células control (A), una célula incubada con AA (B), y con SMase (C). Los microdominios presentan movilidad lateral en el plano XY el cual puede ser analizado mediante la medida de las coordenadas del centroide del *clusters* de SNAREs, estas coordenadas son posteriormente empleadas para calcular la velocidad media (D) para vesículas control (N=103), AA (N=118), y para el tratamiento con SMase (N=105). En (E) se representa el desplazamiento cuadrático medio (MSD) vs tiempo. Las curvas obtenidas indican un movimiento de los parches de SNAREs como si estuvieran contenidos en una caja para el tratamiento con SMase, mientras que para el tratamiento con AA se describe un comportamiento aún más inmóvil, siendo su curva prácticamente una recta paralela al eje de abscisas. Sobre los mismos parches empleados para el análisis del MSD se determinó en movimiento en el eje Z, o lo que es

lo mismo la variación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo (**F**), y los respectivos incrementos para las tres condiciones experimentales (**G**). La escala representa 1 μm en **A**. ** $P < 0.005$.

1.4. La dinámica de vesículas cromafines en la proximidad de los sitios activos es alterada por los lípidos señal.

Si los lípidos señal modifican el comportamiento dinámico de las proteínas SNARE, se podría esperar que afectaran de igual modo a la dinámica de las vesículas en la cercanía de la membrana.

Para determinar en qué medida los lípidos señal ácido araquidónico y esfingosina afectan a la movilidad de las vesículas más próximas a la membrana, se analizó el comportamiento de los gránulos cromafines más próximos a la membrana plasmática, donde se refleja el movimiento de los gránulos que se encuentran en estado de perfusión con la membrana plasmática (Nofal y col., 2007; Lopez y col., 2009). Nuevamente se trataron las células con SMase 1 U/ml o con AA 100 μM durante 30 minutos, y posteriormente se analizaron las células control, así como las células tratadas, incubando con naranja de acridina 2 μM , un colorante acidotrópico que permite la visualización de gránulos cromafines y por lo tanto el estudio de su cinética de fusión mediante microscopía TIRF (Lopez y col., 2009).

Interesantemente, la producción de esfingosina, y si cabe aún más, la incubación con AA resultan en un notable cambio en la movilidad de gránulos cromafines. Específicamente, ambos lípidos restringen el movimiento de los gránulos como puede observarse en la Figura 21. A pesar de que la movilidad de las vesículas no presenta cambios en la velocidad media bajo estas condiciones experimentales (Figura 21 D), la representación del desplazamiento cuadrático medio frente al tiempo revela un claro cambio en la restricción del movimiento tras el tratamiento con lípidos señal. Incluso, estas gráficas presentan unos valores asintóticos menores que la curva control que caracteriza las vesículas no tratadas (Figura 21 E). El coeficiente de difusión calculado fue de $6.2 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para las vesículas control (N=145 vesículas de 29 células distintas), mientras que el coeficiente teórico de difusión fue estimado en $4.0 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para las vesículas de células tratadas con SMase (N=73 vesículas de 22 células diferentes), y de $1.0 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para células tratadas con AA (N=52 vesículas pertenecientes a 18 células).

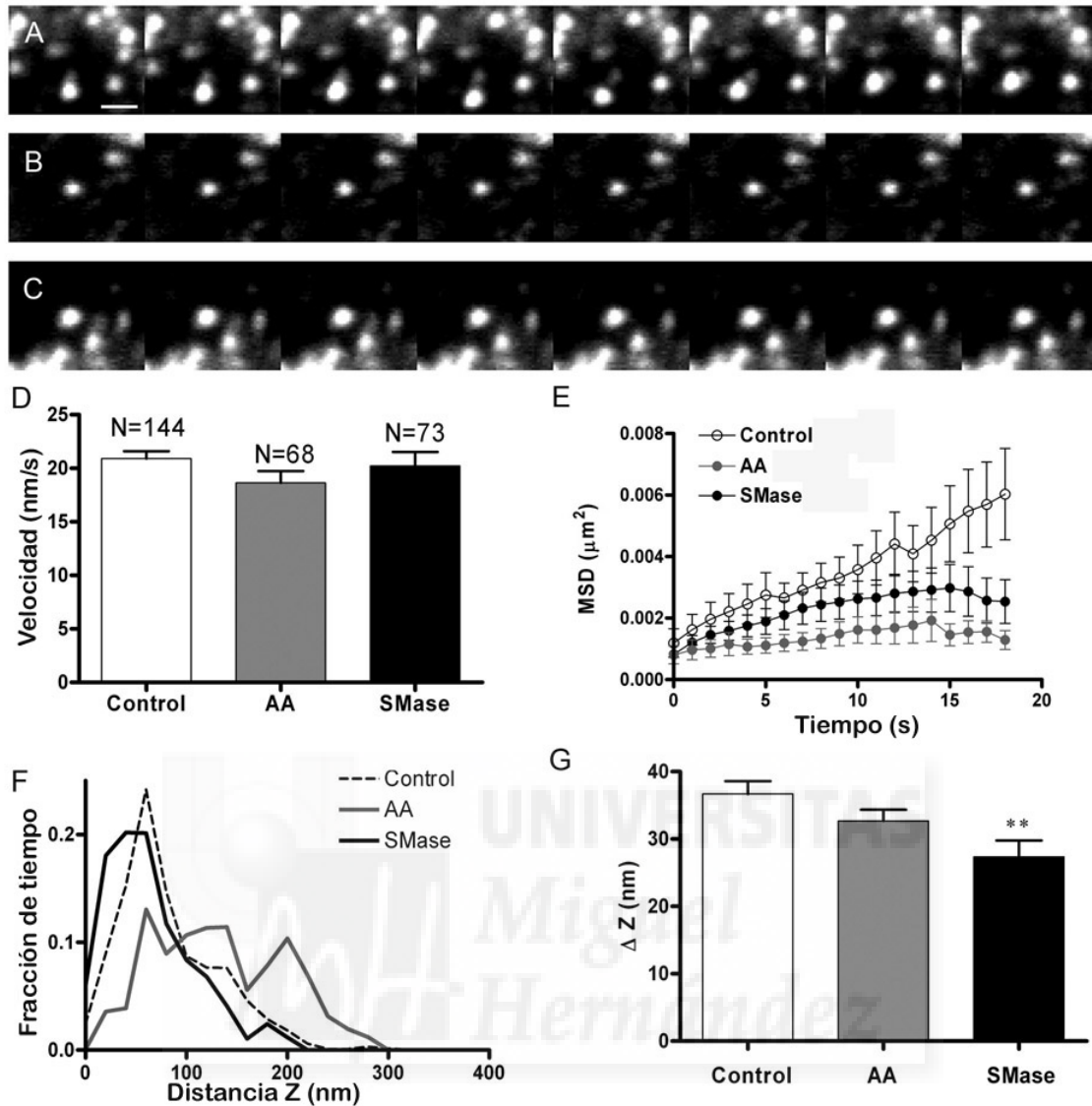


Figura 21. El movimiento de las vesículas se ve restringido tras la incubación de las células con lípidos señal. El movimiento de las vesículas fué estudiado en células tratadas con AA y SMase como se describió en la figura anterior. Las vesículas se marcaron con naranja de acridina y el movimiento fue estudiado registrando imágenes a intervalos de 1 segundo mediante la técnica de TIRF. Los paneles A, B y C muestran imágenes separadas a intervalos de 5 segundos obtenidas de vesículas de células control (A), tratadas con AA (B), y tratadas con SMase (C). En D vemos representada la velocidad media de vesículas de células control (N=144), de células tratadas con AA (N=68), y tratadas con SMase (N=73). E. El desplazamiento cuadrático medio vs tiempo de las vesículas indica una restricción del movimiento experimentado por vesículas de células tratadas con SMase en un mayor grado que el de vesículas de células tratadas con AA. F. Distribución de la distancia Z correspondiente a vesículas en cada una de las condiciones experimentales. G. Cálculo del incremento de la distancia Z (ΔZ) obtenido de vesículas de células control, tratadas con AA, y tratadas con SMase. La escala representa 1 μm en A. ** $P < 0.005$ comparación respecto al control de acuerdo con el Test de t-Student.

Los valores asintóticos sugieren que la producción de esfingosina resulta en una restricción del movimiento de las vesículas en un radio de 210 nm, mientras que en el caso del tratamiento con AA las vesículas resultan prácticamente inmóviles y oscilan en un espacio muy estrecho.

El análisis del movimiento en el plano Z revela una tendencia a una constricción en el movimiento que resulta estadísticamente significativo para células tratadas con SMase (Figura 21 G).

Tomando en conjunto los resultados obtenidos sobre la movilidad de parches y de vesículas, queda claro que tras el tratamiento de células con AA, los gránulos aparecen mucho menos móviles, lo que sugiere un estado de anclaje a la membrana (*docking*) (Nofal y col., 2007; Lopez y col., 2009). Por otro lado, el tratamiento con SMase presenta a los gránulos con un movimiento dinámico de caja que puede ser caracterizado como de atraque a la membrana (*tethered*) (Nofal y col., 2007).

1.5. La fusión de las vesículas cromafines estudiada por métodos ópticos resulta afectada por el tratamiento celular con lípidos señal.

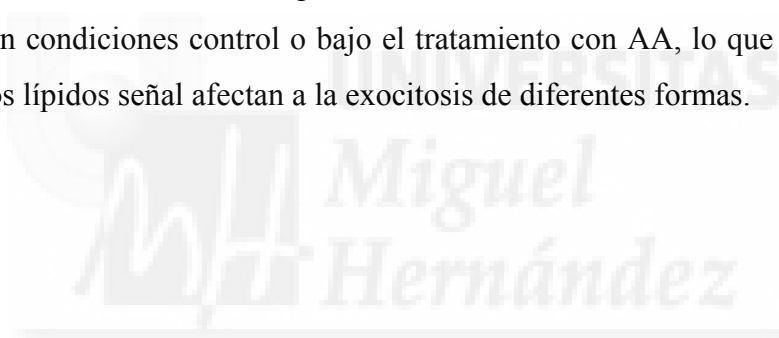
Ya que los lípidos señal modifican la maquinaria secretora, es de esperar que puedan afectar a la fusión de vesicular. Por ello se estudió el impacto de estos lípidos señal en estudios de la fusión por métodos ópticos.

El naranja de acridina es un colorante fluorescente indicador de pH que se almacena en el interior de las vesículas, y es empleado para el estudio de la cinética de la fusión de los gránulos secretores en células cromafines (Lopez y col., 2009). En estos experimentos las células fueron incubadas con naranja de acridina 2 μ M durante 20 minutos y se visualizaron mediante la técnica de microscopía TIRF. Para visualizar las vesículas cargadas de colorante se utilizó el láser 488 a una intensidad suficientemente baja, como para prevenir la exocitosis inducida por la estimulación del láser (Henkel y col., 2006).

La fusión de los gránulos fue provocada aplicando una perfusión con una solución de KCl 59 mM, y observada como un destello en el canal verde debido a la neutralización del colorante naranja de acridina durante la exocitosis. Los registros se tomaron como videos a intervalos de 20 milisegundos (Figura 22 A-C). Estas imágenes tomadas a lo largo del tiempo se emplearon para integrar una imagen de la intensidad de fusiones individuales (vesícula única) en espigas similares a eventos característicos de

la amperometría (Figura 22 D). Dichas espigas pueden ser analizadas con programas desarrollados para la técnica de amperometría obteniéndose una espiga para cada evento de fusión (Figura 22 E).

Este análisis revela, a nivel de media, que las espigas obtenidas tras el tratamiento con SMase son más estrechas que las obtenidas en condiciones control, y que las espigas obtenidas tras el tratamiento con AA. Este hecho es apoyado por el análisis estadístico derivado del parámetro cinético $t_{1/2}$ (anchura temporal del pico amperométrico a su mitad de altura) de más de 100 eventos para cada condición experimental, como podemos observar en las distribuciones que se muestran en la Figura 22 F, donde se ve claramente como los valores de $t_{1/2}$ son mucho menores en tratamiento con SMase. De hecho, la media de $t_{1/2}$ para el tratamiento con SMase se encuentra un 20% disminuída con respecto al control y el tratamiento con AA (Figura 22 G, $p < 0.01$). Estos resultados indican que, bajo el tratamiento con SMase, la fusión de las vesículas con la membrana plasmática tiende a ocurrir a una velocidad mucho mayor que en condiciones control o bajo el tratamiento con AA, lo que nos sugiere de nuevo que los lípidos señal afectan a la exocitosis de diferentes formas.



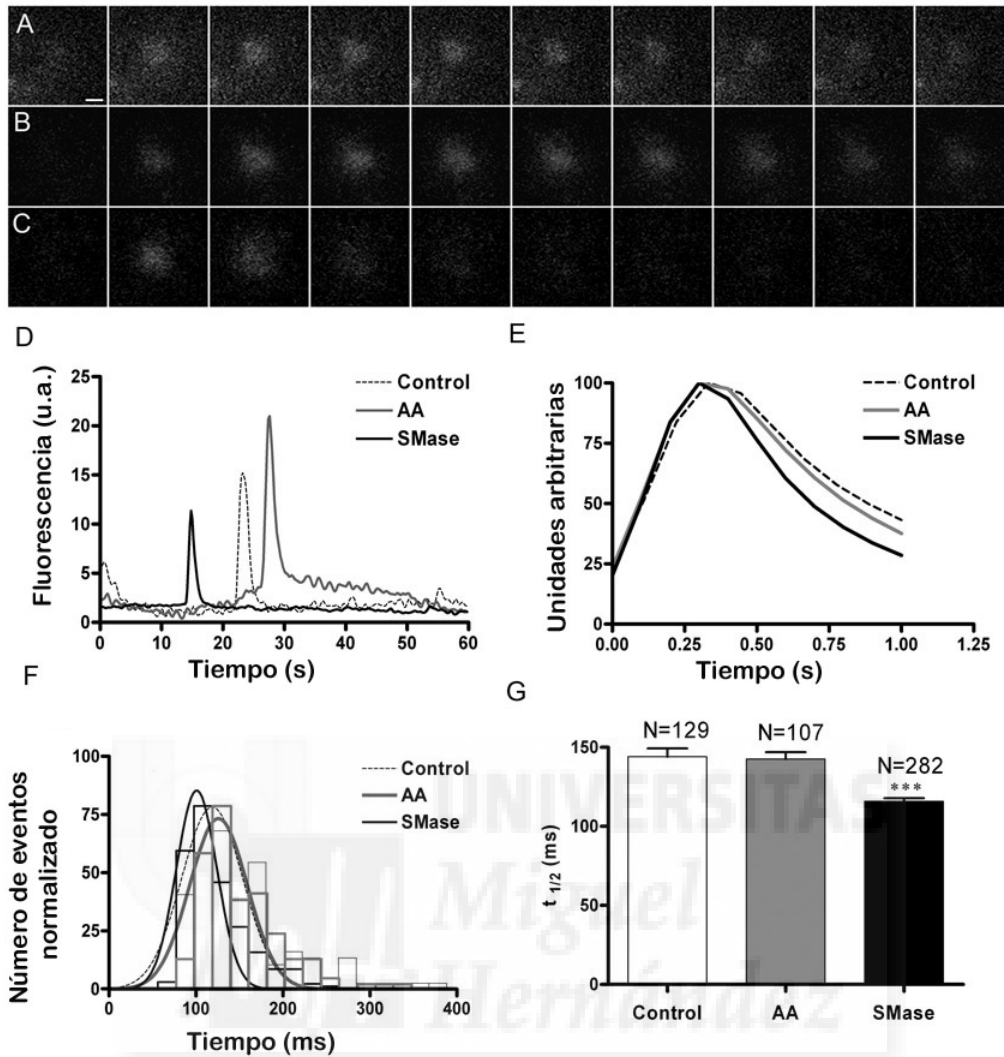


Figura 22. El tratamiento con SMase acelera la cinética de fusión de los gránulos secretores visualizados mediante la técnica de TIRF. Células cromafines bovinas fueron tratadas con AA y SMase y se incubaron con naranja de acridina, como se describe en el apartado de materiales y métodos. Las células se sometieron posteriormente a un flujo de KCl 59 mM que despolarizaba las células, y la fusión se visualizó en imágenes de microscopía TIRF tomadas cada 20 milisegundos. **A-C.** Ejemplos de una secuencia de imágenes de gránulos secretores tomadas durante la fusión en células control (**A**), tratadas con AA (**B**), y tratadas con SMase (**C**). El análisis de la intensidad media de estos eventos de fusión resultó en la obtención de espigas de secreción, como puede observarse en el panel **D**. El análisis de estos eventos ópticos con un software apropiado resulta en la obtención de un evento medio para cada condición experimental, como se muestra en **E**. **F.** Distribución de $t_{1/2}$ correspondiente a los picos medios. Se observa un desplazamiento a valores más bajos con el tratamiento de SMase. **G.** La media de $t_{1/2}$ muestra unas espigas más agudas tras el tratamiento con SMase. ***P < 0'0001 comparando los tratamientos con el control según Test de la t-Student.

1. 6. La fusión vesicular estudiada por amperometría es afectada por el tratamiento con lípidos señal.

Los estudios basados en fenómenos ópticos descritos anteriormente sugieren de manera contundente que los lípidos señal afectan a los pasos finales de la exocitosis de las vesículas, sin embargo una descripción en detalle de estas alteraciones nos la va a proporcionar la técnica de amperometría (Criado y col., 1999; Sørensen y col., 2003; Xu y col., 1999).

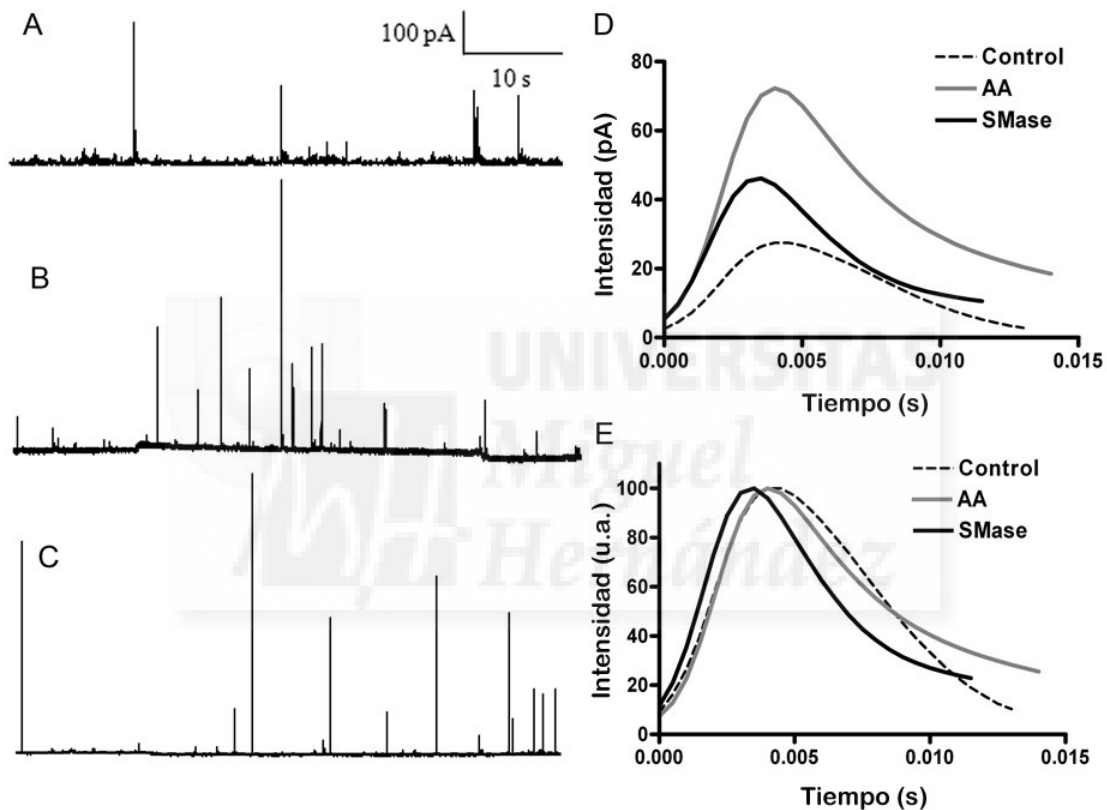


Figura 23. Efecto de los lípidos señal en eventos amperométricos de fusión. Se representan registros amperométricos obtenidos por despolarización con KCl 59 mM en células control (A), células tratadas con AA (B), y tratadas con SMase (C). D. Las espigas amperométricas se analizaron y a partir de ellas se construyeron las espigas medias de cada condición experimental, control (N=1262), AA (N=828), y SMase (N=854). De estudios cinéticos de las espigas normalizadas se deriva que existe una disminución de $t_{1/2}$ tras el tratamiento con SMase (E). Evidentemente los tratamientos con lípidos señal dan lugar a eventos de secreción de mayor amplitud.

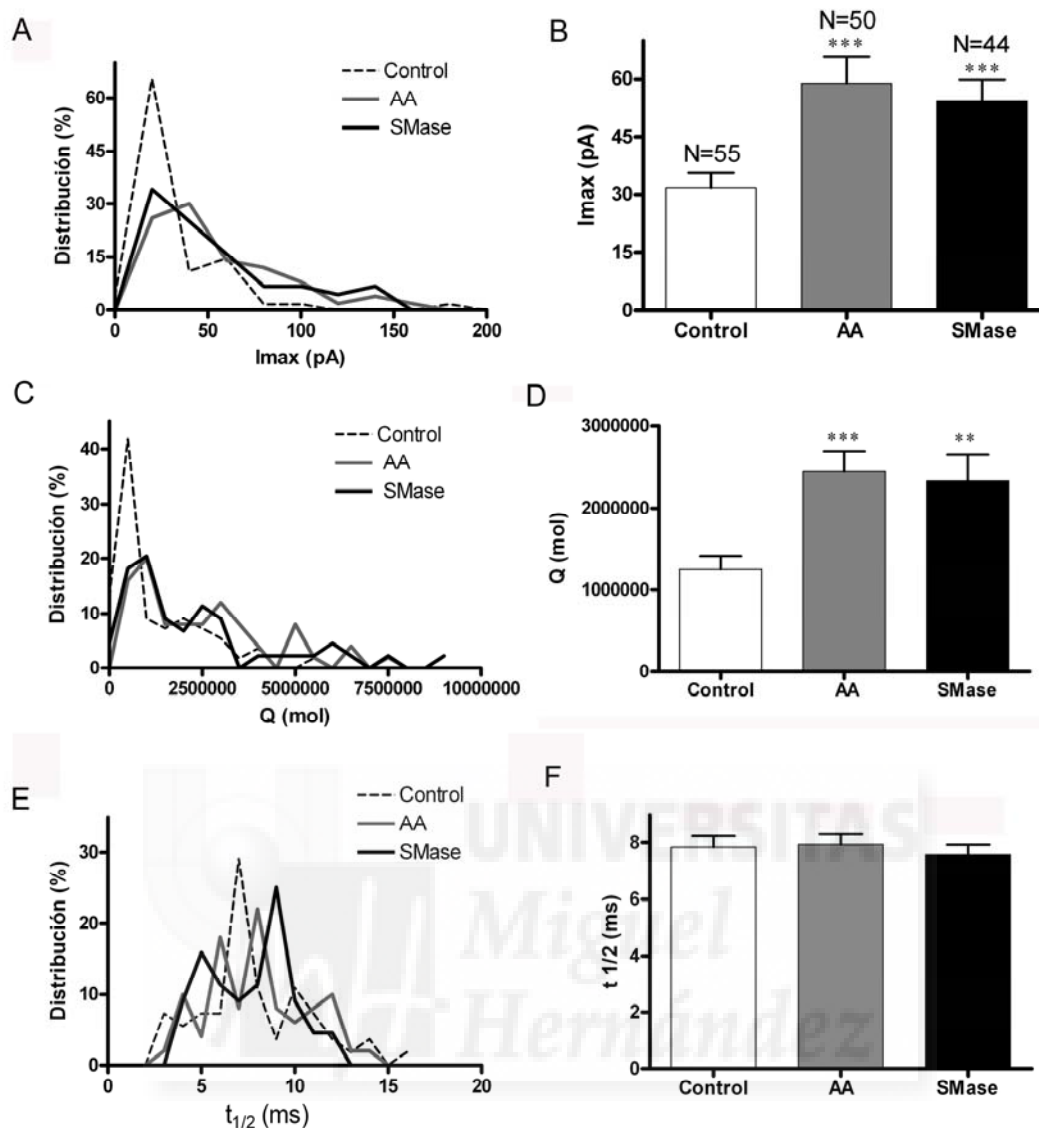


Figura 24. Los lípidos señal aumentan dramáticamente la cantidad de catecolaminas liberada en cada evento de fusión. Principales parámetros amperométricos de las espigas obetnidas de células control (N=55 células), así como de células tratadas con AA (N=50) y de células tratadas con SMase (N=44 células). El análisis se realizó a partir de la espiga media obtenida en cada célula. **A.** Distribución de de I_{max} por célula, separación 20 pA. **B.** La amplitud media aumenta 2 veces en células tratadas con AA, y 1.7 veces en células tratadas con SMase. **C.** Distribución de la cantidad de catecolaminas liberadas por célula, separación 500.000 moléculas/evento. **D.** Consecuentemente, el valor medio de la cantidad de moléculas liberada por evento aumenta 2.1 veces con el tratamiento con AA, y 2 veces con el tratamiento con SMase. **E.** Distribución de $t_{1/2}$ por célula, separación de 1 ms. **F.** El valor medio de $t_{1/2}$ se ve ligeramente reducido con el tratamiento con SMase, sin ser estadísticamente significativo. ** $P < 0.005$ y *** $P < 0.001$ de acuerdo con el Test de t-Student en comparación con la condición control.

Los experimentos se realizaron empleando AA y SMase como se ha descrito en apartados anteriores, y los registros de amperometría se obtuvieron en respuesta a un estímulo de despolarización mediado por KCl 59 mM. En la Figura 23 se muestran ejemplos donde podemos observar a primera vista que los lípidos señal aumentan la amplitud de las espigas individuales. Un análisis exhaustivo de las características de las espigas amperométricas mediante el programa Quanta Analysis (Mosharov y Sulzer, 2005) nos da el pico medio para más de 800 eventos amperométricos registrados a partir de células de tres cultivos distintos.

Como se puede observar en la Figura 23 D, la incubación con SMase, y más evidentemente con AA, resulta en un aumento de la amplitud (I_{max}) de la espiga media y de la intensidad normalizada en comparación con las condiciones control. Además, de la intensidad de estas espigas medias normalizadas se deriva que el tratamiento con SMase induce unas espigas mucho más agudas en comparación con el control o el tratamiento con AA, lo que sugiere una aceleración de la cinética de fusión (Figura 23 E).

Un análisis estadístico más detallado obtenido tras agrupar las espigas por célula, y el estudio de las distribuciones de cada parámetro cinético, pone de manifiesto estas diferencias. El tratamiento con AA se caracteriza por un aumento de 2 veces en la altura máxima del evento (amplitud, I_{max}), así como una distribución más amplia con respecto al control, mientras que para el tratamiento con SMase el aumento de la amplitud de I_{max} es de 1'7 veces respecto al control (Figura 24 A, $p < 0'001$). Es interesante el hecho de que la cantidad de catecolaminas liberada en cada evento individual (integral de la espiga media) se vea aumentado en proporciones similares, llegando a ser 2'2 veces mayor para el tratamiento con AA, y 1'8 veces mayor para el tratamiento con SMase, lo que confirma el hecho de que el tratamiento con AA estimula de forma más fuerte la exocitosis que la SMase (Figura 24 B).

Sin embargo, un análisis estadístico de $t_{1/2}$ de las espigas amperométricas no indica cambios significativos ni mediante el tratamiento con SMase ni con el tratamiento de AA (Figura 24 C). Un estudio detallado de las características del encendido (*onset*) de las espigas amperométricas, o lo que es lo mismo del cálculo del tiempo comprendido entre el 25 y 75 % de la fase de crecimiento de las espigas amperométricas (Rise (25-75)), nos muestra que ambos lípidos aumentan de forma significativa la velocidad de apertura del poro de fusión (Figura 25 A y B). Finalmente, un análisis exhaustivo de la fase de caída (*falling*) de las espigas revela que el AA

modifica la fase de decaimiento haciéndola más larga a lo largo del tiempo, mientras que el tratamiento con SMase induce una modificación menor en este parámetro cinético (Figura 25 C y D).

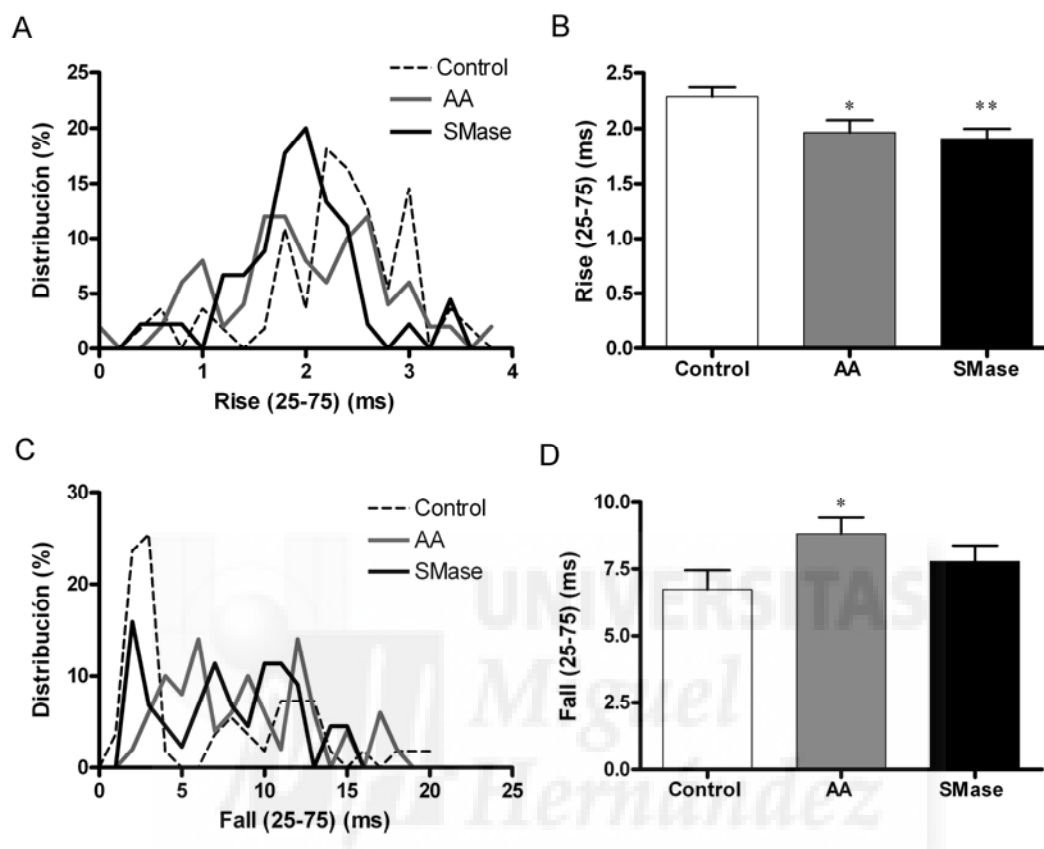


Figura 25. Los lípidos señal afectan a la cinética de los eventos de fusión de forma individual. Análisis de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas para el mismo número de células. **A.** La distribución del parámetro de la fase de *onset* (tiempo correspondiente al aumento de la amplitud del pico entre un 25 y un 75% de la amplitud máxima) de las diferentes condiciones experimentales, nos muestra un desplazamiento a valores menores en los dos tratamientos con respecto al control, separación de 0.2 ms. **B.** Los valores medios se ven reducidos en ambos tratamientos en una proporción similar (20%). **C y D.** Análisis correspondiente a la fase de caída, o parámetro *offset* de los eventos amperométricos. Resulta evidente que el AA afecta esta fase, prolongando la liberación de catecolaminas a lo largo del tiempo. * $P < 0.05$, $P < 0.02$ de acuerdo con el Test de t-Student en comparación con la condición control.

Estos resultados implican que los efectos de mayor importancia son el acelaramiento de la apertura del poro de fusión inducido por la producción de esfingosina, y la prolongación de la fase de apertura del poro de fusión a lo largo del tiempo inducida por AA, con el consecuente aumento de la liberación de catecolaminas en cada evento de fusión. Estos cambios en la cinética del poro de fusión son mucho

más evidentes que los encontrados al emplear fosfolípidos estructurales de la membrana plasmática como la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, o la esfingomielina (Uchiyama y col., 2007), que producen únicamente una alteración moderada de la velocidad de liberación de neurotransmisor y no del tamaño quantal.

Estos resultados nos indican también que la liberación de catecolaminas en condiciones control se da a un nivel subóptimo (mecanismo mayoritario *kiss and run*), y únicamente en presencia de lípidos señal parece producirse la fusión total del gránulo con la membrana plasmática. La magnitud de esta modulación por lípidos señal es más impactante y evidente que la modificación producida en la fusión a nivel de vesícula única observada al emplear mutantes de las proteínas SNAREs como SNAP25 y sinaptobrevina (Criado y col., 1999; Gil y col., 2002; Fang y col., 2008).

1. 7. El FTY720 es un análogo de esfingosina que estimula la formación de complejos SNARE.

El fingolimoide (FTY720) es un análogo de la esfingosina derivado de la miroicina, un antibiótico producido por un hongo. Cuya estructura podemos observar en la Figura 26. La miroicina fué inicialmente aislada de *Myriococcum albomyces* y *Mycelia sterilia* en 1972, y posteriormente identificado de nuevo en *Isaria sinclairii* (posteriormente reclasificado en *Ophiocordyceps sinensis*) por Tetsuro Fujita y sus colaboradores en los años 1980-1990 (Strader y col., 2011).

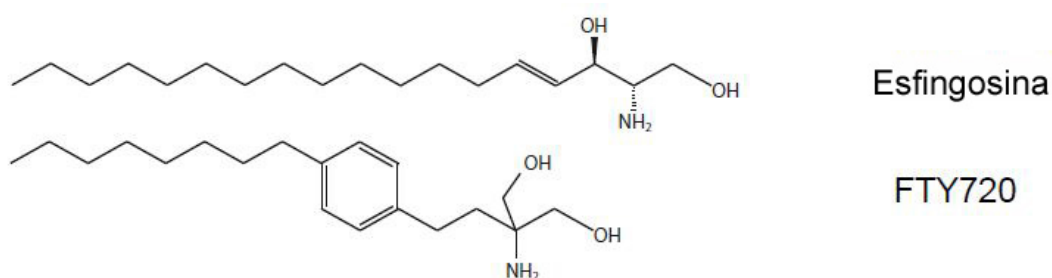


Figura 26. Estructura de la esfingosina y del FTY720.

Fujita y sus colaboradores determinaron entre 1980 y 1990 que la miroicina era un antibiótico entre 5 y 10 veces más potente que la ciclosporina A, así como un inmunosupresor muy potente. Por ello, Fujita y su grupo entre los años 1995-1996 sintetizaron derivados de la miroicina y realizaron test de propiedades físicoquímica de

estos nuevos compuestos, así como de toxicidad en modelos biológicos *in vitro* e *in vivo*. La última modificación consistió en la introducción de un anillo aromático llevando a la síntesis del FTY720, un compuesto 10 veces más potente que el original (miroicina), teniendo un perfil de toxicidad mucho más favorable, así como propiedades físicoquímicas más deseables, incluyendo una mayor solubilidad. De hecho, el FTY720 es un potente inmunosupresor aprobado desde 2010 por la FDA para el tratamiento de la esclerosis múltiple, y es administrado de forma oral, ya que traspasa la barrera hematoencefálica (Strader y col., 2011; Brinkmann, 2009). El efecto inmunosupresor del FTY720 es mediado por su metabolito fosforilado, que mimetiza la acción de esfingosina 1-P, activando la vía de receptores acoplados a proteínas G. A su vez, se ha determinado que esta droga presenta un efecto neuroprotector al actuar sobre neuronas, oligodendrocitos y astrocitos, efecto llevado a cabo por actuar en un gran número de vías intracelulares de señalización como son los receptores de esfingosina 1-P, MAP quinasas, adenilato ciclasa y las vías de señalización del calcio intracelular (Miron y col., 2008).

Por ser un análogo de la esfingosina con estas propiedades farmacológicas, nosotros hemos estudiado el efecto de este compuesto en la secreción en su papel de lípido señal.

En primer lugar, en colaboración con el grupo de Davletov (Cambridge, U.K.) se realizaron experimentos de biología molecular, en los que se determinó que el FTY720 potencia la formación de parches de SNAREs (Figura 27 A y B), al igual que se determinó para los lípidos señal ácido araquidónico y esfingosina (Darios & Davletov, 2006; Darios y col., 2009).

En segundo lugar, nuestro grupo determinó la colocalización de un derivado fluorescente del FTY720, el LZ532c cedido por Darley-Usmar, respecto a parches de SNAREs mediante microscopía confocal. Encontramos una colocalización prácticamente total de un derivado fluorescente de este compuesto con los parches de SNAP25DsRed (Figura 27 C), una colocalización mucho más evidente que para los análogos fluorescentes de ácido araquidónico y esfingosina. Situando este análogo estructural de la esfingosina en las inmediaciones de los parches de SNAREs cuando es añadido de forma exógena.

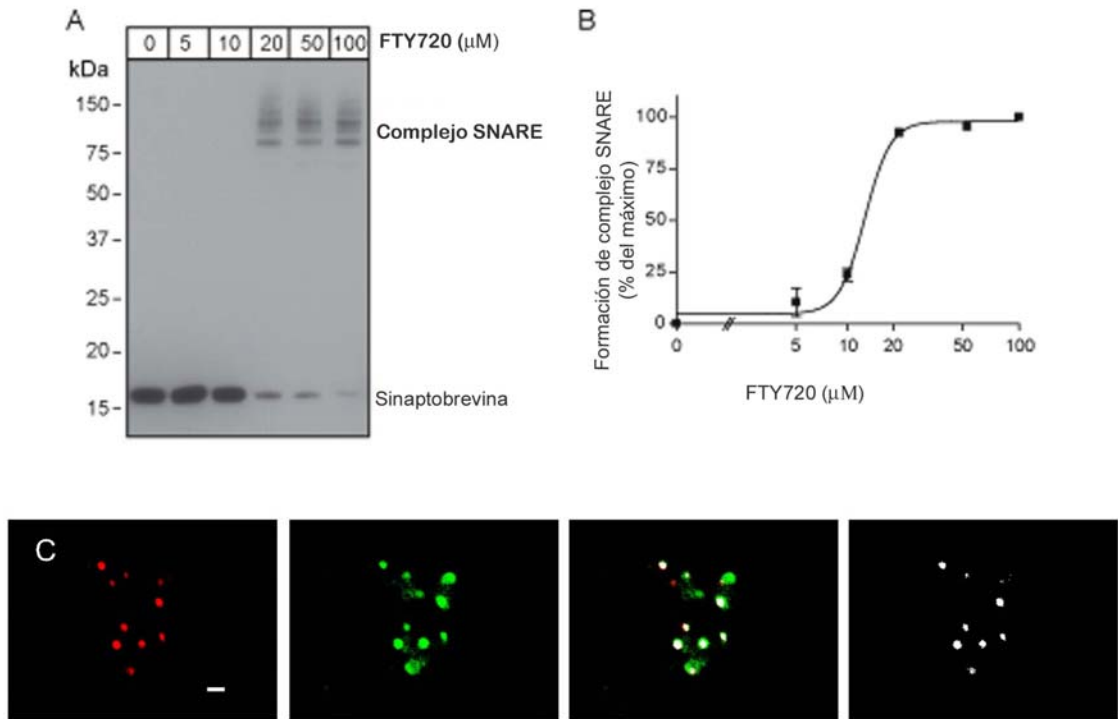


Figura 27. El FTY720 potencia la formación de complejos SNARE y colocaliza totalmente con parches de SNAP25-DsRed. **A.** Mediante experimentos de biología molecular Davletov y sus colaboradores determinaron que a partir de una concentración de 20 μM el FTY720 potencia la formación de complejos SNARE. **B.** La concentración crítica de FTY720 para la formación de complejos SNARE, se encuentra en 10 y 20 μM . **C.** Imágenes de microscopía confocal en las que se determina una colocalización prácticamente total de un derivado fluorescente del FTY720, el LZ532c en el canal verde, con clusters de SNAP25-DsRed en el canal rojo.

Además, también se realizaron experimentos de FRET con el derivado fluorescente de FTY720, obteniendo como resultado una evidencia ineludible de que existe una interacción molecular directa del FTY720 con las proteínas SNARE (Figura 28).

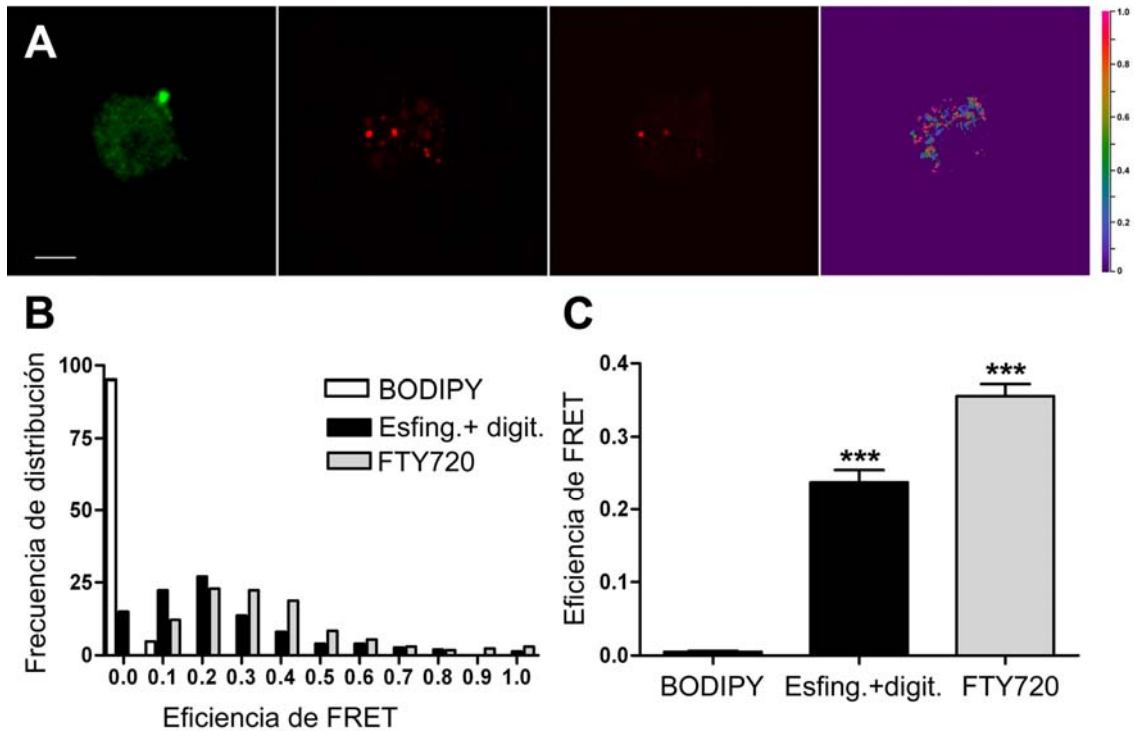


Figura 28. La señal de FRET sugiere una fuerte interacción molecular directa entre el FTY720 y los microdominios de SNARE. Células cromafines bovinas que sobrexpresan SNAP25-DsRed fueron incubadas en tres condiciones diferentes: 1 μ M BODIPY FL como condición control (A), 1 μ M esfingosina-BODIPY en presencia de digitonina 10 μ M para permeabilizar la célula (B), y 1 μ M FTY720-BODIPY (C). Se representan tres condiciones experimentales: de izquierda a derecha tenemos el donador y el aceptor, cada uno de ellos obtenido empleando el láser óptimo para su excitación, y las imágenes de FRET y de eficiencia de FRET, obtenidas excitando el donador con el láser 488. En (B) y en (C) se representa el análisis de los datos de FRET. Distribución de los datos de la señal aparente de FRET (B). Para evaluar si la señal media de FRET era suficientemente intensa o no en las condiciones ensayadas, se utilizó el método ya descrito en la figura anterior de FRET (Van Rheenen y col. (2004)). La distribución de los resultados obtenidos para el FTY720 se compararon con la de los ya obtenidos anteriormente utilizando BODIPY FL libre y Esfingosina-BODIPY FL en presencia de digitonina 1 μ M (Panel B). El análisis comparativo de ambas condiciones mostró un mayor eficiencia promedio de FRET cuando se usó FTY-BODIPY ($P < 0.0001$), con respecto al control de BODIPY FL, siendo incluso levemente mayor que en caso de los ensayos realizados con esfingosina-BODIPY FL en presencia de digitonina 10 μ M (Panel C), indicando una clara interacción del FTY720 con la maquinaria de fusión (SNAP25). N=145 ROI procedentes de 11 células tratadas con BODIPY FL, N=166 ROI procedentes de 13 células tratadas con FTY-BODIPY y N=148 ROI procedentes de células permeabilizadas con digitonina y tratadas con esfingosina-BODIPY FL. Escala de 3 μ m.

1.8.El FTY720 afecta la dinámica de los complejos SNARE.

Dado que el análogo estructural de la esfingosina FTY720 presenta una colocalización en la membrana con los parches de SNAREs, así como una interacción molecular directa con dichos parches, todo indica que se comporta como un lípido señal. Al mimetizar la localización estructural de los lípidos señal estudiados en el presente trabajo, ácido araquidónico y esfingosina, se procedió a evaluar si este análogo estructural de la esfingosina ejerce las mismas acciones a nivel de actividad funcional sobre la fusión vesicular.

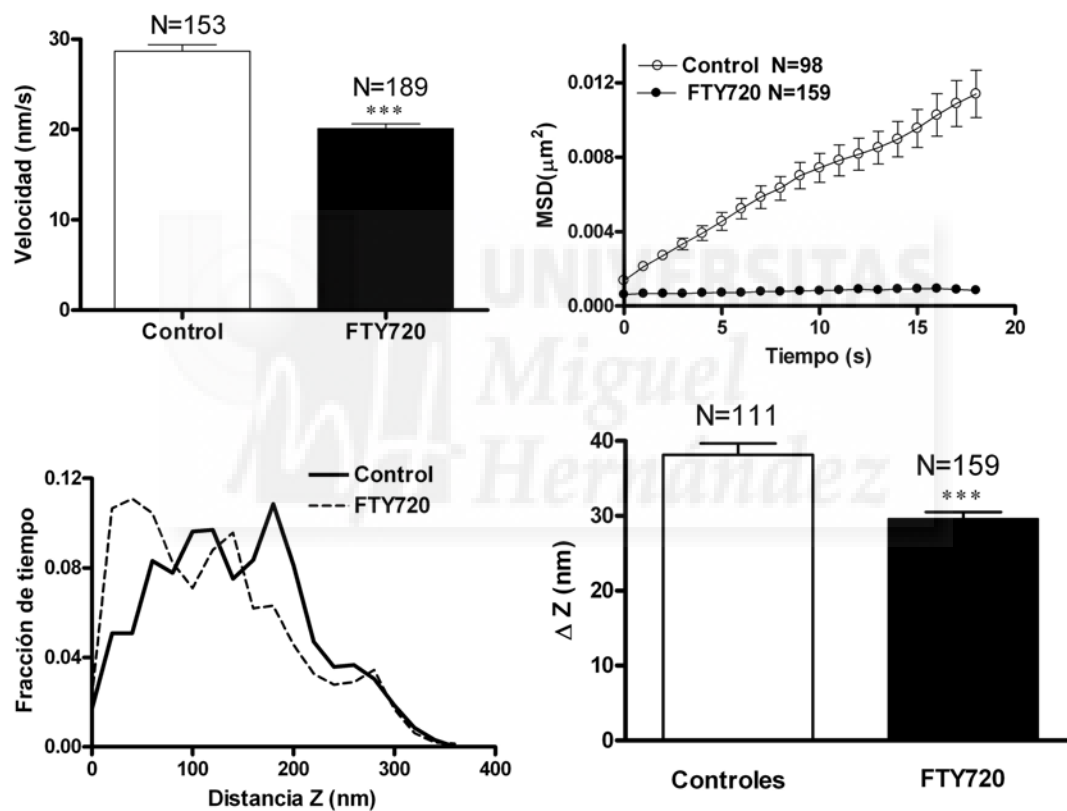


Figura 29. El movimiento los *clusters* de SNAREs se ve altamente restringido en células tratadas con FTY720. La movilidad de microdominios formados por GFP-SNAP25 fue estudiada a partir de imágenes tomadas en intervalos de 1 segundo en células control, células tratadas con FTY720 20 μ M durante 15 minutos. **A.** La velocidad con la que se desplazan los *clusters* de SNAREs en el plano XY se ve reducida en casi 1'5 veces con respecto al control. **B.** El desplazamiento cuadrático medio de los clusters de GFP-SNAP25 queda como una línea paralela al eje de abscisas, describiendo un estado de *tethered*. **C.** El desplazamiento de los parches en el eje Z se desplaza a valores más bajos cuando las células son tratadas con FTY720 que en el caso de células control. **D.** El incremento de la distancia recorrida en el eje Z por los parches se ve reducida en 1,5 veces tras el tratamiento con FTY720. *** $P < 0'0001$ según el Test de la t-Student comparando con las condiciones control.

Por este motivo se analizó en primer lugar la movilidad de parches de GFP-SNAP25, como se ha descrito en apartados anteriores. Para ello células cromafines bovinas que expresaban *clusters* de GFP-SNAP25 fueron tratadas con FTY720 20 μM por un periodo de 15 minutos, y se analizó el movimiento de los parches de GFP-SNAP25 mediante microscopía óptica TIRF.

La velocidad con la que se mueven los parches de GFP-SNAP25 en el plano XY se ve significativamente reducida con el tratamiento de FTY720 (Figura 29 A). La Figura 29 B muestra que el tratamiento con FTY720 reduce drásticamente el movimiento cuadrático medio de los microdominios de GFP-SNAP25 en la membrana plasmática, siendo el coeficiente de difusión estimado de $2,12 \pm 0,1 \times 10^{-4} \mu\text{m}^2/\text{s}$ en las condiciones control, y de $3,17 \pm 0,56 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ cuando las células son tratadas con FTY720 20 μM . El análisis del movimiento incremento de Z de los *clusters* nos muestra que la movilidad en este eje se encuentra también drásticamente reducida (Figura 29 D), sin embargo no observamos diferencias apreciables si nos fijamos en el recorrido total que realizan los parches de GFP-SNAP25 en el eje Z, debido probablemente a que las células se redondean con el tratamiento de FTY720. Por lo tanto, esta droga parece modificar los pasos que preceden a la fusión de la vesícula con la membrana, induciendo la inmovilización de los parches de SNAREs en un estado de anclaje listos para la fusión (*docked and primed*), tal y como se observa en el tratamiento de células cromafines con lípidos señal.

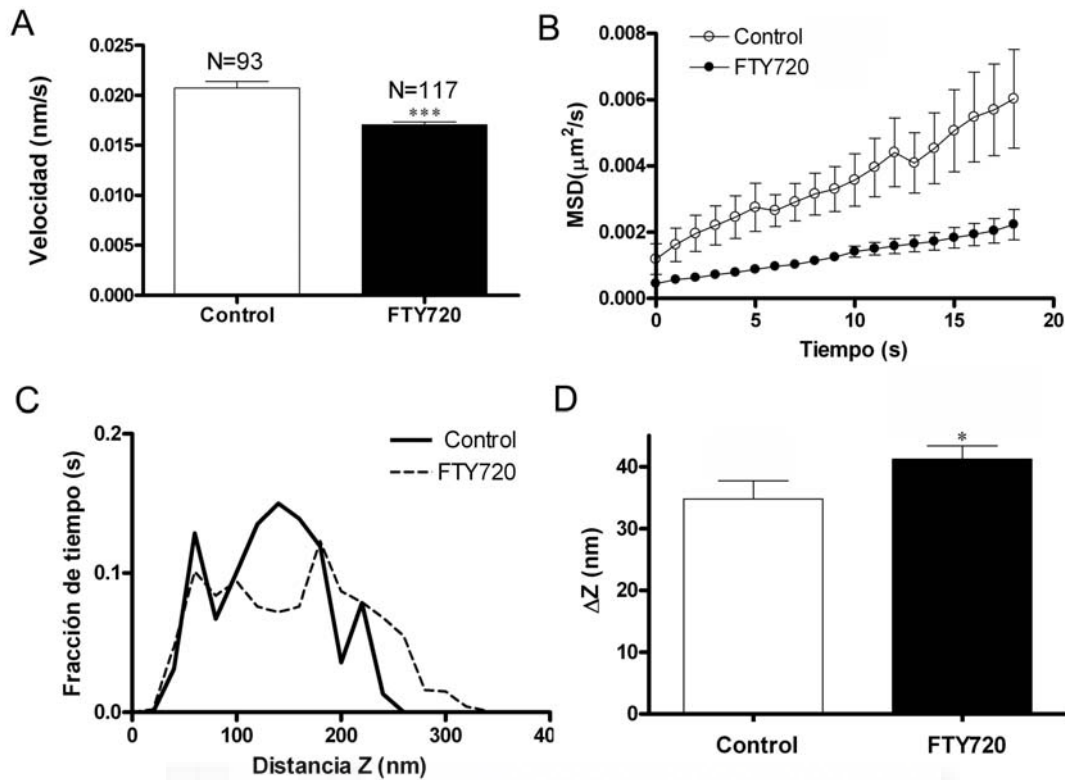


Figura 30. El movimiento de las vesículas se ve fuertemente restringido tras la incubación de las células con FTY720. El movimiento de las vesículas fue analizado en células tratadas con FTY720. Las vesículas se marcaron con naranja de acridina y el movimiento fue estudiado registrando imágenes a intervalos de 1 segundo mediante la técnica de TIRF. En A vemos representada la velocidad media de vesículas de células control (N=93) y de células tratadas con FTY720 (N=117), quedando las vesículas de células tratadas con FTY720 con una alta reducción de la velocidad XY. B. El desplazamiento cuadrático medio vs tiempo de las vesículas indica una restricción del movimiento experimentado por vesículas de células tratadas con FTY720 en un mayor grado similar al de vesículas tratadas con AA (Figura 5). C. Distribución de la distancia Z correspondiente a vesículas en cada una de las condiciones experimentales. D. Cálculo del incremento de la distancia Z (ΔZ) obtenido de vesículas de células control y tratadas con FTY720. La escala representa $1 \mu\text{m}$ en A. * $P < 0'05$ *** $P < 0'0001$ comparación respecto al control de acuerdo con el Test de t-Student.

Observamos un cambio notable en la movilidad de gránulos cromafines inducida por el tratamiento con FTY720 (Figura 30). Este cambio queda patente en la gráfica que describe la velocidad, dónde la reducción de este parámetro de movilidad en el plano XY es altamente significativa para el tratamiento con FTY720. La representación del desplazamiento cuadrático medio frente al tiempo, también nos revela un claro cambio en la restricción del movimiento tras el tratamiento con esta droga. Incluso, esta gráfica presenta unos valores asintóticos menores que la curva control que caracteriza las vesículas no tratadas (Figura 30 B). El coeficiente de difusión calculado fue de $5'48 \pm$

$0.4 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para las vesículas control (N=145 de 29 células distintas), mientras que el coeficiente teórico de difusión fue estimado en $2.12 \pm 0.5 \times 10^{-6} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para las vesículas de células tratadas con FTY720 (N= 57 de 31 células diferentes). El análisis del movimiento en el plano Z no nos revela una tendencia a una constricción en el movimiento de las vesículas como debería ser. Esto es debido a que la membrana de las células queda afectada por el tratamiento, las células tienden a redondearse y a tener menos puntos de adhesión con el cobre (Figura 30 C y D).

Tomando en conjunto los resultados obtenidos sobre la movilidad de parches y de las vesículas, queda claro que tras el tratamiento de células con FTY720, los gránulos aparecen mucho más inmóviles que en cualquiera de los tratamientos anteriores con los lípidos señal AA y esfingosina, lo que sugiere un estado de anclaje y maduración (*docked and primed*) (Nofal y col., 2007; Lopez y col., 2009).

1.9. FTY720 imita la acción de los lípidos señal sobre la fusión vesicular.

Los resultados anteriores ponen de manifiesto que el FTY720 se comporta como un lípido señal que interacciona a nivel molecular con las proteínas SNARE, moldeándolas para potenciar la formación de complejos SNARE y por lo tanto acelerando la fusión vesicular. Además, la restricción en la movilidad de parches de SNARE y de vesículas analizados por métodos ópticos nos muestra que los gránulos cromafines aparecen en un estado de anclaje y maduración en la membrana plasmática.

Para determinar el impacto de esta droga a nivel de vesícula única se recurrió a la amperometría. Podemos observar en la Figura 31 A y B un ejemplo de un registro amperométrico en una célula control (Figura 31 A) y en una célula tratada con FTY720 (Figura 31 B). Se aprecia que tras el tratamiento con FTY720 las células presentan una mayor sensibilidad a la despolarización con KCl 59 mM, descargando catecolaminas con mayor frecuencia e intensidad.

La Figura 31 C muestra que bajo el tratamiento de FTY720 la amplitud media de los eventos amperométricos aumenta dos veces respecto del control, alcanzando una liberación de catecolaminas dos veces mayor (Figura 31 D). Además, veremos que el análisis cinético de los parámetros amperométricos agrupando los resultados por célula, y de sus distribuciones, revela que este aumento en la liberación de neurotransmisores en cada evento implica tanto la aceleración de la fase *onset* de la cinética como un aumento del tiempo de apertura del poro de fusión (fase *offset*).

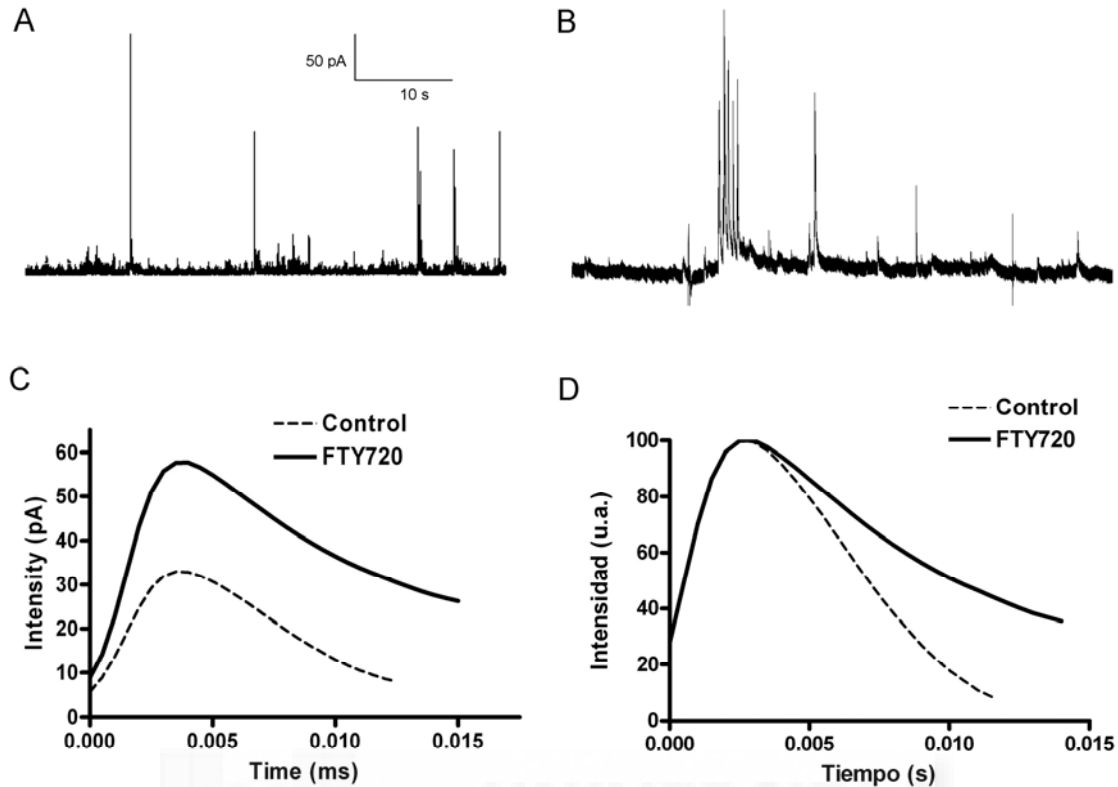


Figura 31. Efecto del FTY720 sobre los eventos amperométricos de fusión. Se representan registros amperométricos obtenidos por despolarización con KCl 59 mM en células control (A), y células tratadas con FTY720 (B). C y D. Las espigas amperométricas se analizaron y a partir de ellas se construyeron las espigas medias de cada condición experimental, control (N=1262), y FTY720 (N=901). El FTY720 aumenta drásticamente la amplitud, la liberación de catecolaminas.

El tratamiento con FTY720 induce un aumento de 1'4 veces en la amplitud (I_{max}) (Figura 18 B, $p < 0'005$), así como un desplazamiento a valores más elevados en la distribución con respecto al control (Figura 32 A). Es más, la cantidad de catecolaminas liberada es 2'1 veces mayor que en condiciones control (Figura 32 D), confirmandose el hecho de que el FTY720 estimula drásticamente la exocitosis en células cromafines bovinas.

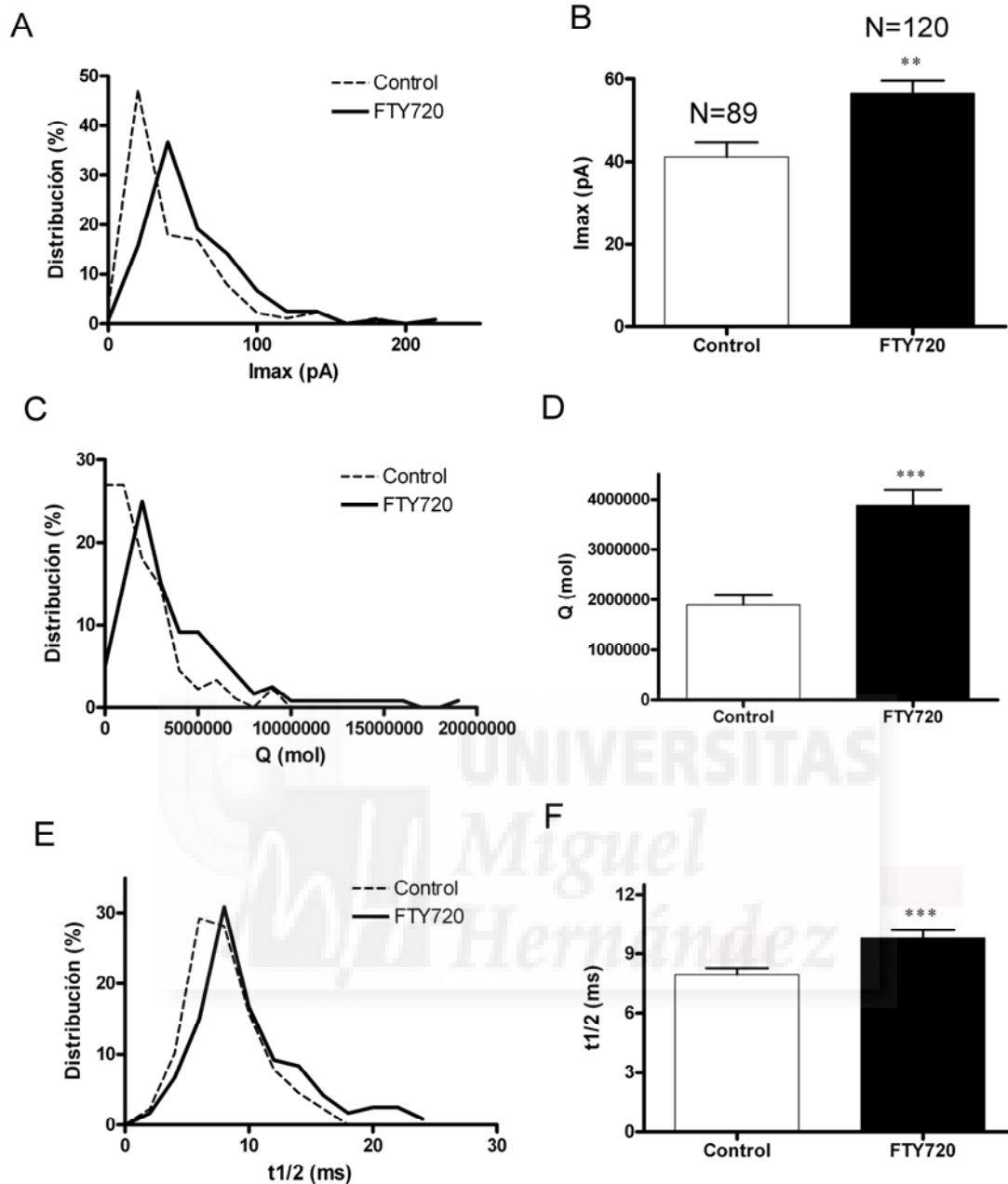


Figura 32. El FTY 720 reduce la movilidad de clusters y vesículas, induciendo la fusión de vesículas únicas. El análisis de los parámetros cinéticos de la fusión obtenidos por amperometría, para 89 células control y 120 células tratadas con FTY720 a una concentración de 20 μ M durante 15 minutos, nos dan los resultados que se exponen en las gráficas siguiente. **A.** Distribución de la amplitud media por célula, separación 20 pA. **B.** La amplitud media de las espigas aumenta 1'4 veces con el tratamiento con FTY720, $p < 0'005$. **C.** Distribución de la cantidad de catecolaminas liberadas por célula, separación 1000.000. **D.** La cantidad de catecolaminas liberada en cada fusión se duplica con el tratamiento con FTY720, $p < 0'0001$. **E.** Distribución de $t_{1/2}$ por célula, separación 2 ms. **F.** El valor medio de $t_{1/2}$ aumenta drásticamente en 1'2 veces en células tratadas con FTY720 con respecto a células control, $p < 0'0005$, $p = 0'0003$. $**P < 0'005$, $***P < 0'0005$, de acuerdo con el Test de la T-Student comparando respecto al control.

Estos resultados y el análisis del parámetro $t_{1/2}$ de las espigas amperométricas por célula (Figura 32 E, F) nos indican un aumento en la duración de la apertura del poro de fusión. Ya que encontramos un aumento de 1'2 veces en este parámetro con respecto a las condiciones control (Figura 32 F, $p < 0'0005$), así como un desplazamiento del valor medio de $t_{1/2}$ a valores mayores en la distribución de este parámetro (Figura 32 E) con el tratamiento con FTY720 con respecto las condiciones control. Este hecho se pone de manifiesto al estudiar las fase de encendido (*onset*) y apagado (*offset*) de las espigas amperométricas por célula (Figura 33).

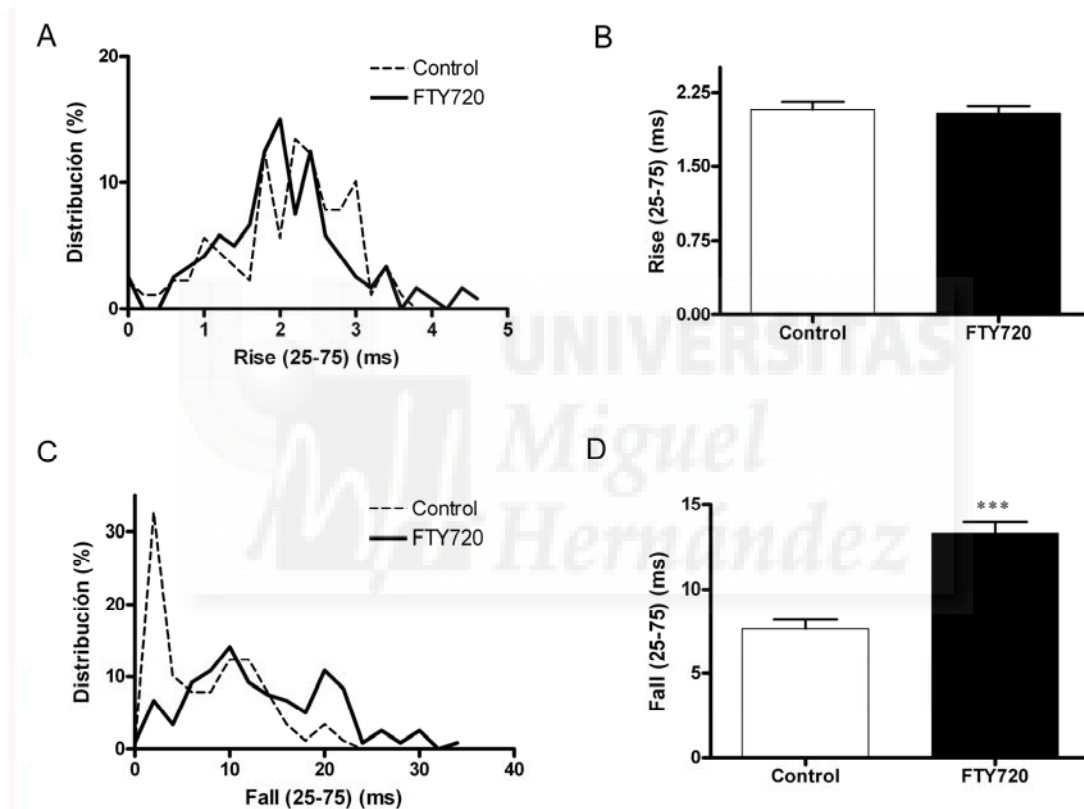
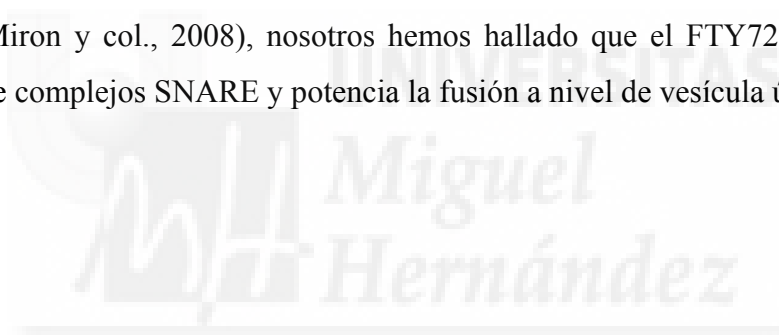


Figura 33. La cinética de fusión por célula se encuentra drásticamente afectada por el tratamiento con FTY720. **A.** La distribución del parámetro de la fase de *onset* (tiempo correspondiente al aumento de la amplitud del pico entre un 25 y un 75% de la amplitud máxima) de las diferentes condiciones experimentales, nos muestra un desplazamiento a valores menores en el tratamiento con FTY720 con respecto al control, separación de 0'2 ms. **B.** El valor medio se ve reducido en el tratamiento con FTY720, pero esta reducción no es estadísticamente significativa. **C** y **D.** Análisis correspondiente a la fase de caída, o parámetro *offset* de los eventos amperométricos. Resulta evidente que el FTY720 afecta esta fase, prolongando la liberación de catecolaminas a lo largo del tiempo. *** $P < 0'0001$, de acuerdo con el Test de t-Student en comparación con la condición control.

En la Figura 33 podemos observar una aceleración de la fase de encendido al estudiar el parámetro Rise (25-75). Aún no siendo estadísticamente significativa la reducción observada en este parámetro (Figura 33 B), el estudio de las distribuciones de los datos obtenidos en condiciones control y en células tratadas con FTY720 (Figura 33 A) nos muestra que existe un desplazamiento a valores menores del parámetro Rise (25-75) cuando las células son tratadas con FTY720. Por último, el análisis exhaustivo de la fase de caída nos muestra un claro aumento del tiempo de apertura del poro de fusión (Figura 33 D, $p < 0'0001$), siendo el parámetro Fall (25-75) 1'7 veces mayor con respecto al control. Además, como podemos observar en la gráfica de distribuciones (Figura 33 C) los valores medios por célula para este parámetro tienen una distribución tanto más ancha como desplazada a valores mayores cuando las células son tratadas con esta droga.

Dentro de la multitud de efectos que conlleva el uso del FTY720, y lo describen como un compuesto neuroprotector por actuar sobre neuronas, oligodendrocitos y astrositos (Miron y col., 2008), nosotros hemos hallado que el FTY720 promueve la formación de complejos SNARE y potencia la fusión a nivel de vesícula única.



CONCLUSIONES



1. Existe un alto grado de colocalización entre los parches de SNAREs y balsas lipídicas de la membrana plasmática.
2. Hay un grado de colocalización parcial entre los lípidos señal ácido araquidónico y esfingosina añadidos exógenamente con los parches de SNAREs.
3. Los lípidos señal ácido araquidónico y esfingosina interactúan con los parches de SNAREs a nivel molecular, tal como demuestran los experimentos de FRET.
4. El movimiento de los parches de SNARE se ve reducido por el ácido araquidónico y la esfingosina.
5. El movimiento de las vesículas se encuentra reducido por el ácido araquidónico y la esfingosina.
6. La esfingosina induce el atraque de las vesículas en la membrana plasmática (*tethering*), mientras que el ácido araquidónico induce un estado de anclaje de las mismas (*docking*).
7. Tanto el ácido araquidónico como la esfingosina afectan a la cinética del poro de fusión:
 - 7.1. Los dos lípidos señal aumentan la velocidad de apertura del poro de fusión (*Rise (25-75)*), si bien para la esfingosina la velocidad de las espigas de amperometría es aún más rápida que para ácido araquidónico.
 - 7.2. El ácido araquidónico prolonga la apertura del poro de fusión (*Fall(25-75)*) de forma drástica, aumentando así la cantidad de neurotransmisores liberada en tres veces con respecto al control. Esto lleva a pensar que en condiciones control la fusión ocurre en condiciones subóptimas (*kiss and run*), siendo necesaria la intervención de los lípidos señal para que ocurra una fusión completa.
8. El FTY720 se comporta como un lípido señal que interacciona a nivel molecular con las proteínas SNARE, facilitando la formación de complejos SNARE.
9. El FTY720 promueve los estados de atraque y maduración (*docking* y *priming*), ya que inmoviliza los parches de SNAREs y las vesículas de una forma aún más drástica que el ácido araquidónico.
10. El FTY720 presenta características funcionales que se encuentran entre las de ácido araquidónico y las de la esfingosina. El FTY720 induce un aumento del

tiempo de apertura del poro de fusión produciendo un incremento en la liberación de catecolaminas de dos veces con respecto al control, como en el caso del ácido araquidónico.



BIBLIOGRAFÍA



- Adam-Klages S., Schwandner R., Adam D., Kreder D., Bernardo K., y Kronke M. (1998). Distinct adapter proteins mediate acid versus neutral sphingomyelinase activation through the p55 receptor for tumor necrosis factor. *J Leukoc Biol* 63:678–682.
- Albillos A., Dernick G., Horstmann H., Almers W., Alvarez de Toledo G., y Lindau M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 389:509–12;
- Alés E., Tabares L., Poyato J.M., Valero V., Lindau M., y Álvarez de Toledo G. (1999). High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. *Nat. Cell Biol.* 1, 40-44.
- Almeida T., Cunha R.A., y Ribeiro J.A. (1999). Facilitation by arachidonic acid of acetylcholine release from the rat hippocampus. *Brain Res* 826:104–111.
- Álvarez de Toledo G., Fernández-Chacón R., y Fernández J.M. (1993). Release of secretory products Turing transient Vehicle fusion. *Nature*, 363: 554-558.
- Amatore C., Arbault S., Bouret Y., Guille M., Lemaitre F., y Verchier Y. (2006). Regulation of exocytosis in chromaffin cells by trans-insertion of lysophosphatidylcholine and arachidonic acid into the outer leaflet of the cell membrane. *Chembiochem* 7:1998–2003
- An S.J., Grabner C.P., y Zenisek D. (2010). Real-time visualization of complexin during single exocytic events. *Nat. Neurosci.* 13(5), 577–583.
- Aoyagi K., Sugaya T., Umeda M., Yamamoto S., Terakawa S., y Takahashi M. (2005). The activation of exocytotic sites by the formation of phosphatidylinositol 4,5 bisphosphate microdomains at syntaxin clusters. *J. Biol. Chem.* 280(17), 17346–17352
- Arévalo J.C. & Wu S.H. (2006). Neurotrophin signaling: many exciting surprises! *Cell Mol Life Sci* 63:1523–1537.
- Archer D.A., Graham M.E., y Burgoyne R.D. (2002). Complexin regulates the closure of the fusion pore during regulated vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277:18249–18252.
- Artalejo C.R., Adams M.E., y Fox A.P. (1994). Three types of Ca²⁺ channel trigger secretion with different efficacies in chromaffin cells. *Nature* 367, 72-76.
- Arunachalam L., Han L., Tassew N.G., He Y., Wang L., Xie L., Fujita Y., Kwan E., Davletov B., Monnier P.P., Gaisano H.Y., y Sugita S. (2008). Munc18–1 is critical for plasma membrane localization of syntaxin1 but not of SNAP-25 in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* 19(2), 722–734.
- Axelrod, D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J. Cell Biol.* 89, 141-145.
- Axelrod, D., Burghardt, T.P., y Thompson, N.L. (1984). Total internal reflection fluorescence. *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* 13, 247-268.
- Axelrod, D. (2001 a). Selective imaging of surface fluorescence with very high aperture microscope objectives. *J. Biomed. Opt.* 6, 6-13.
- Axelrod, D. (2001 b). Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Traffic.* 2, 764-774.
- Bai J., Wang C.T., Richards D.A., Jackson M.B., y Chapman E.R. (2004). Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin t-SNARE interactions. *Neuron* 41:929–942.
- Balsinde J., Winstead M.V., y Dennis E.A. (2002). Phospholipase A2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett.* 531(1), 2–6.
- Bandhuvula P., Li Z., Bittman R., y Saba J.D. (2009) Sphingosine 1-phosphate lyase enzyme assay using a BODIPY-labeled substrate. *Biochem Biophys Res Commun* 380: 366-370.
- Barclay J.W., Craig T.J., Fisher R.J., Ciufo L.F., Evans G.J., Morgan A., y Burgoyne R.D. (2003). Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 278(12), 10538–10545.
- Bark I.C. & Wilson M.C. (1994). Human cDNA clones encoding two different isoforms of nerve terminal protein SNAP-25. *Gene* 139: 291-292.

- Barrett G.L. (2000). The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis. *Prog Neurobiol* 61:205–229.
- Bauer C.S., Woolley R.J., Teschemacher A.G., y Seward E.P. (2007). Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13–1. *J. Neurosci.* 27(1), 212–219.
- Bazan NG. (2005)a. Lipid signaling in neural plasticity, brain repair, and neuroprotection. *Mol Neurobiol* 32:89–103.
- Bazan NG. (2005)b. Neuroprotectin D1 (NPD1): A DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol* 15:159–166.
- Bazan N. G., Birkle D. L., Tang W., y Reddy, T. S. (1986). The accumulation of free arachidonic acid, diacylglycerols, prostaglandins and lipoxygenase reaction products in the brain during experimental epilepsy. *Adv. Neurol.* 44: 879 –902.
- Becherer U. & Rettig J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release *Cell Tissue Res* 326:393–407.
- Bennett M.K., Calakos N., y Scheller R.H. (1992). Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science* 257, 255-259.
- Betz A., Ashery U., Rickmann M., Augustin I., Neher E., Südhof T.C., Rettig J., y Brose N. (1998). Munc13–1 is a presynaptic phorbol ester receptor that enhances neurotransmitter release. *Neuron* 21(1), 123–136.
- Betz A., Okamoto M., Benseler F., y Brose N. (1997). Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13–1 with then terminus of syntaxin. *J. Biol. Chem.* 272(4), 2520–2526.
- Betz A., Thakur P., Junge H.J., Ashery U., Rhee J.S., Scheuss V., Rosenmund C., Rettig J., y Brose N. (2001). Functional interaction of the active zone proteins Munc13–1 and RIM1 in synaptic vesicle priming. *Neuron* 30(1), 183–196.
- Bhalla A., Chicka M.C., Tucker W.C., y Chapman E.R. (2006). Ca(2+)-synaptotagmin directly regulates t-SNARE function during reconstituted membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:323–30
- Birch E.E., Garfield S., Hoffman D.R., Uauy R., y Birch D.G. (2000). A randomized controlled trial of early dietary supply of long-chain polyunsaturated fatty acids and mental development in term infants. *Dev. Med. Child Neurol.* 42, 174–181.
- Bisogno T., Howell F., Williams G., Minassi A., Cascio M.G., Ligresti A., Matias I., Schiano-Moriello A., Paul P., Williams E.J., Gangadharan U., Hobbs C., Di Marzo V., y Doherty P. (2003). Cloning of the first *sn1*-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J. Cell. Biol.* 163(3), 463–468.
- Blöchl A. & Sirrenberg C. (1996). Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75LntR receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 271: 21100–21107.
- Bode C., Sensken S-C., Peest U., Beutel G., Thol F., Levkau B., Li Z., Bittman R., Huang T., Tölle M., van der Giet M., y Gräler M.H. (2010). Erythrocytes serve as a reservoir for cellular and extracellular sphingosine 1-phosphate. *J Cell Biochem* 109: 1232-1243.
- Bootman M.D., Collins T.J., Peppiatt C.M., Prothero L.S., MacKenzie L., De Smet P., Travers M., Tovey S.C., Seo J.T., Berridge M.J., Ciccolini F., y Lipp P. (2001). Calcium signalling – an overview. *Semin. Cell Dev. Biol.* 12(1), 3–10.

- Borisovska M., Zhao Y., Tsytsyura Y., Glyvuk N., Takamori S., Matti U., Rettig J., Südhof T., y Bruns D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *EMBO J.* 24:2114–26.
- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Bradford P. G., Marinetti G. V., y Abood L. G. (1983). Stimulation of phospholipase A2 and secretion of catecholamines from brain synaptosomes by potassium and A23187. *J. Neurochem.* 41: 1684 – 1693.
- Brailoiu E., Cooper R.L., y Dun N.J. (2002). Sphingosine 1-phosphate enhances spontaneous transmitter release at the frog neuromuscular junction. *Br. J. Pharmacol.* 136: 1093-1097.
- Brash A. R. (2001). Arachidonic acid as a bioactive molecule. *J. Clin. Invest.* 107: 1339 – 1345.
- Breckenridge L.J. & Almers W. (1987). Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* 328, 814-817.
- Brinkmann V. (2009). FTY720 (fingolimod) in multiple sclerosis: therapeutic effects in the immune and the central nervous system. *British Pharmacological Society.* 158 : 1173-1182.
- Brown W.J., Chambers K., y Doody A. (2003). Phospholipase A2 (PLA2) enzymes in membranetrafficking: mediators of membrane shape and function. *Traffic* 4(4), 214–221.
- Brown D.A. & London E. (2000). Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J. Biol. Chem.* 275(23), 17221–17224.
- Brose N. & Rosenmund C. (2002). Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J. Cell. Sci.* 115(Pt 23), 4399–4411.
- Burgess T.L. & Kelly R.B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu Rev Cell Biol* 3: 243–293.
- Burgoyne R.D., Barclay J.W., Ciuffo L.F., Graham M.E., Handley M.T.W., y Morgan A. (2009). The functions of Munc18–1 in regulated exocytosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 1152, 76–86;
- Burgoyne R.D. & Morgan A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 83: 581–632.
- Burré J., Sharma M., Tsetsenis T., Buchman V., Etherton M., y Südhof T.C. (2010). α -Synuclein promotes SNARE-complex assembly in vivo and in vitro. *Science* 329: 1664–1668.
- Cai H., Reim K., Varoqueaux F., Tapechum S., Hill K., Sørensen J.B., Brose N., y Chow R.H. (2008). Complexin II plays a positive role in Ca²⁺- triggered exocytosis by facilitation vesicle priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:19538–19543.
- Calderon, F. & Kim H.Y. (2004). Docosahexaenoic acid promotes neurite growth in hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 90, 979–988.
- Camoletto P.G., Vara H., Morando L., Connell E., Marletto F.P., Giustetto M., Sassoè-Pognetto M., Van Veldhoven P.P., Ledesma M.D., y Camoletto PG. (2009). Synaptic vesicle docking: sphingosine regulates syntaxin1 interaction with Munc18. *PLoS One* 4(4), E5310.
- Canals D., Jenkins R.W., Roddy P., Hernández-Corbacho M.J., Obeid L.M., y Hannun Y.A. (2010). Differential Effects of Ceramide and Sphingosine 1-Phosphate on ERM

- Phosphorylation. *PROBING SPHINGOLIPID SIGNALING AT THE OUTER PLASMA MEMBRANE*. The Journal of Biological Chemistry 285: 32476–32485.
- Cao D., Xue R., Xu J., y Liu Z. (2005). Effects of docosahexaenoic acid on the survival and neurite outgrowth of rat cortical neurons in primary cultures. *J. Nutr. Biochem.* 16, 538–546.
- Carlson S.E. & Werkman S.H. (1996). A randomized trial of visual attention of preterm infants fed docosahexaenoic acid until two months. *Lipids* 31, 85– 90;
- Ceccarelli B., Hurlbut W.P., y Mauro A. (1973). Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell.Biol.* 57(2), 499–524.
- Chamberlain L.H., Burgoyne R.D., y Gould G.W. (2001). Snare proteins are highly enriched in lipid rafts in PC12 cells: implications for the spatial control of exocytosis. *Proc. Natl Acad.Sci. USA* 98(10), 5619–5624.
- Chamberlain L.H. y Gould G.W. (2002). The vesicle- and target-SNARE proteins that mediate Glut4 vesicle fusion are localized in detergent-insoluble lipid rafts present on distinct intracellular membranes. *J. Biol. Chem.* 277: 49750–49754.
- Chandra S., Gallardo G., Fernández-Chacón R., Schlüter O.M., y Südhof T.C. (2005). α -Synuclein cooperates with CSP α in preventing neurodegeneration. *Cell* 123: 383–396.
- Chang W. C., Nelson C. y Parekh A. B. (2006). Ca²⁺ influx through CRAC channels activates cytosolic phospholipase A2, leukotriene C4 secretion and expression of c-fos through ERK-dependent and -independent pathways in mast cells. *FASEB J.* 20: 2381 – 2383.
- Chanturiya A., Chernomordik L.V., y Zimmerberg J. (1997). Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:14423–14428.
- Chapman E.R. (2002). Synaptotagmin: a Ca²⁺ sensor that triggers exocytosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3(7), 498–508.
- Chasserot-Golaz S., Coorsen J.R., Meunier F.A. y Vitale N. (2010). Lipid dynamics in Exocytosis. *Cell. Mol. Neurobiol.* 30: 1335-1342.
- Chernomordik L.V., Leikina E., Kozlov M.M., Frolov V.A., y Zimmerberg J. (1999). Structural intermediates in influenza haemagglutinin-mediated fusion. *Mol. Membr. Biol.* 16, 33-42.
- Chernomordik L.V. & Kozlov M.M. (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem*; 72:175–207
- Chernomordik L.V., Melikyan G.B., y Chizmadzhev Y.A. (1987)a. Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* ;906:309–52;
- Chernomordik L.V., Sukharev S.I., Popov S.V., Pastushenko V.F., Sokirko A.V., Abidor I.G., y Chizmadzhev Y.A. (1987)b. The electrical breakdown of cell and lipid membranes: the similarity of phenomenologies. *Biochim Biophys Acta*; 902: 360–73.
- Chernomordik L.V., Vogel S.S., Sokoloff A., Onaran H.O., Leikina E.A., y Zimmerberg J. (1993). Lysolipids reversibly inhibit Ca(2+)-, GTP- and pH-dependent fusion of biological membranes. *FEBS Lett.* 318:71–76.
- Chernomordik L.V. & Zimmerberg J. (1995). Bending membranes to the task: structural intermediates in bilayer fusion. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5(4), 541–547.
- Chen X., Arac D., Wang T.M., Gilpin C.J., Zimmerberg J., y Rizo J. (2006). SNARE-mediated lipid mixing depends on the physical state of the vesicles. *Biophys. J.* 90(6), 2062–2074.
- Chow R.H., von Ruden L., y Neher E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356:60–63.

- Churchward M.A., Rogasevskaia T., Brandman D.M., Khosravani H., Nava P., Atkinson J.K., y Coorssen J.R. (2008). Specific lipids supply critical negative spontaneous curvature – an essential component of native Ca²⁺-triggered membrane fusion. *Biophys. J.* 94(10), 3976–3986.
- Churchward M.A., Coorssen J.R. (2009). Cholesterol, regulated exocytosis and the physiological fusion machine. *Biochem. J.* 423(1), 1–14.
- Colombaioni L. & Garcia-Gil M. (2004). Sphingolipid metabolites in neural signalling and function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 46(3), 328–355.
- Connell E., Darios F., Broersen K., Gatsby N., Peak-Chew S.Y., Rickman C., y Davletov B. (2007). Mechanism of arachidonic acid action on syntaxin–Munc18. *EMBO Rep.* 8(4), 414–419.
- Contreras M.A. & Rapoport S.I. (2002). Recent studies on interactions between n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids in brain and other tissues. *Curr. Opin. Lipidol.* 13, 267–272;
- Contreras M.A., Greiner R.S., Chang M.C., Myers C.S., Salem N. Jr., y Rapoport S.I. (2000). Nutritional deprivation of alpha-linolenic acid decreases but does not abolish turnover and availability of unacylated docosahexaenoic acid and docosahexaenoyl-CoA in rat brain. *J. Neurochem.* 75, 2392–2400.
- Coorssen J.R. (1996). Phospholipase activation and secretion: evidence that PLA₂, PLC, and PLD are not essential to exocytosis. *Am J. Physiol.* 270(4 Pt 1), C1153–C1163.
- Coorssen J.R., Blank P.S., Albertorio F., Bezrukov L., Kolosova I., Chen X., Backlund P.S. Jr., y Zimmerberg J. (2003). Regulated secretion: SNARE density, vesicle fusion and calcium dependence. *J. Cell. Sci.* 116(Pt 10), 2087–2097.
- Cosgaya J.M., Chan J.R., y Shooter E.M. (2002). The neurotrophin receptor p75^{NTR} as a positive modulator of myelination. *Science* 298:1245–1248.
- Craig T., Evans G., y Morgan A. (2003). Physiological regulation of Munc18/nSec1 phosphorylation on serine-313. *J. Neurochem.* 86(6), 1450–1457.
- Criado M., Gil A., Viniegra S., y Gutierrez L.M. (1999). A single amino acid near the C-terminus of the synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) is essential for exocytosis in chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7256–7261.
- Cuvillier O. (2002). Sphingosine in apoptosis signaling. *Biochim. Biophys. Acta* 1585(2–3), 153–162.
- Darios F., Connell E., y Davletov B. (2007). Phospholipases and fatty acid signalling in exocytosis. *J. Physiol.* 585(Pt 3), 699–704.
- Darios F. & Davletov B. (2006). Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* 440(7085), 813–817.
- Darios F., Wasser C., Shakirzyanova A., Giniatullin A., Goodman K., Munoz-Bravo J.L., Raingo J., Jorgacevski J., Kreft M., Zorec R., Rosa J.M., Gandia L., Gutiérrez L.M., Binz T., Giniatullin R., Kavalali E.T., y Davletov B. (2009). Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* 62(5), 683–694.
- Darios F., Ruipérez V., López I., Villanueva J., Gutierrez L.M., y Davletov B. (2010). Lipid function at synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 20: 543–549.
- Dasgupta S., Adams J.A., y Hogan E.L. (2007). Maternal alcohol consumption increases sphingosine levels in the brains of progeny mice. *Neurochem. Res.* 32: 2217–2224.
- Davletov B. y Montecucco C. (2010). Lipid function at synapses. *Current Opinion in Neurobiology* 20: 543–549.
- De Stefanis D., Reffo P., Bonelli G., Baccino F.M., Sala G., Ghidoni R., Codogno P., e Isidoro C. (2002). Increase in ceramide level alters the lysosomal targeting of cathepsin D prior to onset of apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Biol Chem* 383:989–999.

- Dennison S.M., Bowen M.E., Brunger A.T., y Lentz B.R. (2006). Neuronal snares do not trigger fusion between synthetic membranes but do promote PEG-mediated membrane fusion. *Biophys. J.* 90(5), 1661–1675.
- Donaldson J.G. (2009). Phospholipase D in endocytosis and endosomal recycling pathways. *Biochim. Biophys. Acta* 1791(9), 845–849.
- Douglas W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 34: 453–474.
- Douglas, W.W., y Rubin, R.P. (1961). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J. Physiol* 159, 40-57.
- Dulubova I., Lou X., Lu J., Huryeva I., Alam A., Schneggenburger R., Südhof T.C., y Rizo J. (2005). A Munc13/ RIM/Rab3 tripartite complex: from priming to plasticity? *EMBO J.* 24(16), 2839 -2850.
- Dulubova I., Mikhail K., Siqi L., Huryeva I., Südhof T.C., y Rizo J. (2007). Munc18–1 binds directly to the neuronal snare complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104(8), 2697–2702.
- Dulubova I., Sugita S., Hill S., Hosaka M., Fernandez I., Südhof T.C., y Rizo J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.* 18(16), 4372–4382.
- Eaton B.A., Haugwitz M., Lau D., y Moore H.P. (2000). Biogenesis of regulated exocytotic carriers in neuroendocrine cells. *J Neurosci.* 20: 7334-7344.
- El Alwani M., Wu B.X.J., Obeid L.M., y Hannun Y.A. (2006). Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. *Pharmacol Ther* 112:171–183.
- Fairbanks G., Steck T.L. y Wallach D.F.H. (1971). Coomassie Blue R-250 used in isopropanol-acetic acid. *Biochemistry*, 10: 2606-2618.
- Fang Q, Berberian K., Gong L-W., Hafez I., Sørensen J.B., y Lindau M. (2008). The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics. *PNAS.* 105: 15388–15392.
- Farooqui A.A., Anderson D.K., y Horrocks L.A. (1994). Potentiation of diacylglycerol and monoacylglycerol lipase activities by glutamate and its analogs. *J Neurochem* 62:S74B.
- Farooqui A.A., Horrocks L.A., y Farooqui T. (2007). Interactions between neural membrane glycerophospholipid and sphingolipid mediators: A recipe for neural cell survival or suicide. *Journal of Neuroscience Research* 85:1834–1850.
- Farooqui A.A., Ong W.Y., y Horrocks L.A. (2004)a. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem Res* 29:1961–1977.
- Farooqui A.A., Ong W.Y., y Horrocks L.A. (2004)b. Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A2. *Neurochem Res* 29:1961–1977.
- Farooqui A.A., Ong W.Y., Lu X.R., y Horrocks L.A. (2002). Cytosolic phospholipase A2 inhibitors as therapeutic agents for neural cell injury. *Curr Med Chem-Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents* 1:193–204.
- Farooqui A.A., Yang H.C., y Horrocks L. (1997). Involvement of phospholipase A2 in neurodegeneration. *Neurochem Int.* 30: 517-522.
- Fasshauer D., Sutton R.B., Brunger A.T., y Jahn R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-snares. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 95(26), 15781–15786.

- Feldberg, W., Minz, B., y Tsudzimura, H. (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J. Physiol* 81, 286-304.
- Feldberg W and Mintz B. (1932). Die wirkung von azetylcholin auf die nebennieren. *Arch Exp Path Pharmacol* 168: 287–291.
- Fernández, J.M., Neher, E., y Gomperts, B.D. (1984). Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature* 312, 453-455.
- Fernández-Chacón R., Wölfel M., Nishimune H., Tabares L., Schmitz F., Castellano-Muñoz M., Rosenmund C., Montesinos M.L., Sanes J.R., Schneggenburger R., Südhof T.C. (2004). The synaptic vesicle protein CSP prevents presynaptic degeneration. *Neuron* 42: 237–251.
- Fisher R.J., Pevsner J., y Burgoyne R.D. (2001). Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* 291:875–78.
- Francis H.W., Scott J.C., y Manis P.B. (2002). Protein kinase C mediates potentiation of synaptic transmission by phorbol ester at parallel fibers in the dorsal cochlear nucleus. *Brain Res.*951(1), 9–22.
- Fujita T. (1977). Concept of paraneurons. *Arch Histol Jpn* 40 *Suppl*: 1–12.
- Galvin J.E., Lee V.M., y Trojanowski J.Q. (2001). Synucleinopathies: Clinical and pathological implications. *Arch Neurol* 58: 186–190.
- García A.G., Padín F., Fernández-Morales J.C., Maroto M., García-Sancho J. (2012). Cytosolic organelles shape calcium signals and exo-endocytotic responses of chromaffin cells. *Cell Calcium* ; 51(3-4):309-20.
- García A.G., Sala F., Reig J.A., Viniegra S., Frias J., Fonteriz R., y Gandía. L. (1984). Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* 309, 69-71.
- García-Sancho J. & Verkhratsky A. (2008). Cytoplasmic organelles determine complexity and specificity of calcium signalling in adrenal chromaffin cells, *Acta hysiol. (Oxf.)* 192 263–271
- Gersdorff H. von & Matthews G. (1999). Electrophysiology of synaptic vesicle cycling. *Annu Rev Physiol* 61:725–752.
- Gil A., Gutierrez L.M., Carrasco-Serrano C., Alonso M.T., Viniegra S., y Criado M. (2002). Modifications in the C terminus of the synaptosome-associated protein of 25 kDa (SNAP-25) and in the complementary region of synaptobrevin affect the final steps of exocytosis. *J. Biol. Chem.* 277:9904–9910.
- Gingell D., Ginsberg L. In: Poste G., Nicolson G.L., editors. (1978). In membrane fusion. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press.: 791–833.
- Goncalves P.P., Stenovec M., Chowdhury H.H., Grilc S., Kreft M., y Zorec R. (2008). Prolactin secretion sites contain syntaxin-1 and differ from ganglioside monosialic acid rafts in rat lactotrophs. *Endocrinology* 149(10), 4948–4957.
- Grote E., Carr C.M., y Novick P.J. (2000). Ordering the final events in yeast exocytosis. *J. Cell Biol.* 151(2), 439–452.
- Graham M.E., Barclay J.W., y Burgoyne R.D. (2004). Syntaxin/Munc18 interactions in the late events during Vesicle fusion and release in exocytosis. *J. Biol. Chem.* 279:32751–32760.
- Greenberg A. & Zinder O. (1982). Alpha- and beta-receptor control of catecholamine secretion from isolated adrenal medulla cells. *Cell Tissue Res.* 226, 655-665.
- Grishanin R.N., Kowalchuk J.A., Klenchin V.A., Ann K., Earles C.A., Chapman E.R., Gerona R.R., y Martin T.F. (2004). CAPS acts at a pre-fusion step in dense-core vesicle exocytosis as a PIP2 binding protein. *Neuron* 43(4), 551–562.
- Guan R., Dai H., y Rizo J. (2008). Binding of the Munc13–1 Mun domain to membrane anchored snare complexes. *Biochemistry* 47, 1474–1481.

- Gulyás-Kovács A., de Wit H., Milosevic I., Kochubey O., Toonen R., Klingauf J., Verhage M., y Sørensen J.B. (2007). Munc18-1: sequential interactions with the fusion machinery stimulate vesicle docking and priming. *J. Neurosci.* 27: 8676–8686.
- Hamilton J. A. (2004). Fatty acid interactions with proteins: what X-ray crystal and NMR solution structures tell us. *Prog. Lipid Res.* 43: 177 – 199.
- Han X., Holtzman M., McKeel D.W., Jr., Kelley J., y Morris J.C. (2002). Substantial sulfatide deficiency and ceramide elevation in very early Alzheimer's disease: potential role in disease pathogenesis. *J Neurochem* 82:809–818.
- Han X. & Jackson M.B. (2005). Electrostatic interactions between the syntaxin membrane anchor and neurotransmitter passing through the fusion pore. *Biophys. J.* 88:L20–22;
- Han X. & Jackson M.B. (2006). Structural transitions in the synaptic SNARE complex during Ca²⁺-triggered exocytosis. *J. Cell Biol.* 172:281–93;
- Han X., Wang C.T., Bai J., Chapman E.R., y Jackson M.B. (2004). Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis. *Science* 304:289–292.
- Hannun Y.A. & Obeid L.M. (2002). The ceramide-centric universe of lipid-mediated cell regulation: stress encounters of the lipid kind. *J Biol Chem* 277:25847–25850.
- Hashizume T., Nakao M., y Sato T. (1996). Sphingosine enhances phosphatidylinositol 4-kinase activity in rabbit platelets. *J Biochem* 120:61–65.
- Hashizume T., Nakao M., Kageura T., y Sato T. (1997). Sphingosine enhances arachidonic acid liberation in response to U46619 through an increase in phospholipase A2 activity in rabbit platelets. *J Biochem* 122:1034–1039.
- Hata Y., Slaughter C.A., y Südhof T.C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366(6453), 347–351.
- He X., Huang Y., Li B., Gong C.X., y Schuchman E.H. (2010). Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 31: 398-408.
- Henkel A.W., Upmann I., R. Bartl Ch. R., Bönsch D., Reichardt C., Maler J.M., Nürnberger M., Umstätter R., Reulbach U., Johannes Kornhuber J., y Jens Wiltfang J. (2006). Light-induced exocytosis in cell development and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry* 97:1393–1406.
- Heuser J.E. & Reese T.S. (1973) Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol.* 57(2), 315–344.
- Hevekerl H., Spielmann T., Chmyrov A., y Windergren J. (2011) Foster resonance energy transfer beyond 10 nm: Exploiting the triplet state kinetics of organic fluorophores. *J. Phys. Chem. B.* 115: 13360-13370.
- Higdon A.N., Dranka B.P., Hill B.H., Oh J., Johnson M.S., Landar A., y Darley-Usmar V.M. (2009). *Free Radical Biology & Medicine*, 47: 201–212.
- Holz R.W., Hlubek M.D., Sorensen S.D., Fisher S.K., Balla T., Ozaki S., Prestwich G.D., Stuenkel E.L., y Bittner M.A. (2000). A pleckstrin homology domain specific for phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate (PtdIns-4,5-P₂) and fused to green fluorescent protein identifies plasma membrane PtdIns-4,5-P₂ as being important in exocytosis. *J. Biol. Chem.* 275, 17878-17885.
- Hong S., Gronert K., Devchand P.R., Moussignac R.L., y Serhan C.N. (2003). Novel docosatrienes and 17S-resolvins generated from docosahexaenoic acid in murine brain, human blood, and glial cells: autacoids in antiinflammation. *J Biol Chem* 278:14677–14687.
- Hong W. (2005). Snares and traffic. *Biochim. Biophys. Acta* 1744(3), 493–517.

- Hu K., Carroll J., Fedorovich S., Rickman C., Sukhodub A., y Davletov B. (2002). Vesicular restriction of synaptobrevin suggests a role for calcium in membrane fusion. *Nature* 415: 646 – 650.
- Huang F.D., Matthies H.J., Speese S.D., Smith M.A., y Broadie K. (2004). Rolling blackout, a newly identified PIP2–DAG pathway lipase required for *Drosophila* phototransduction. *Nat. Neurosci.* 7(10), 1070–1078.
- Huang F.D., Woodruff E., Mohrmann R., y Broadie K. (2006). Rolling blackout is required for synaptic vesicle exocytosis. *J. Neurosci.* 26(9), 2369–2379.
- Humeau Y., Vitale N., Chasserot-Golaz S., Dupont J.L., Du G., Frohman M.A., Bader M.F., Poulain B. (2001). A role for phospholipase D1 in neurotransmitter release. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98(26), 15300–15305.
- Hullin-Matsuda F., Ishitsuka R., Takahashi M., y Kobayashi T. (2010). Imaging Lipid Membrane Domains with Lipid-Specific Probes. Donald Armstrong (ed.). *Lipidomics, Methods in Molecular Biology*, vol. 580: 203-220.
- Irvine R. F. (1982). How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204: 3 – 16.
- Jackson M.B. & Chapman E.R. (2006). Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:135–160.
- Jahn R. & Scheller R.D. (2006). SNAREs – engines for membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7 (9), 631–643.
- Jahn R., Lang T., y Südhof T. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112(4), 519–533.
- James D.J., Khodthong C., Kowalchuk J.A., y Martin T.F. (2008). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates SNARE-dependent membrane fusion. *J. Cell. Biol.* 182(2), 355–366.
- Jeon H.J., Lee D.H., Kang M.S., Lee M.O., Jung K.M., Jung S.Y., y Kim D.K. (2005). Dopamine release in PC12 cells is mediated by Ca²⁺-dependent production of ceramide via sphingomyelin pathway. *J Neurochem.* 95: 811-820.
- Johns, L.M., Levitan, E.S., Shelden, E.A., Holz, R.W., y Axelrod, D. (2001). Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 153, 177-190.
- Jorgacevski J., Fosnarić M., Vardjan N., Stenovec M., Potokar M., Kreft M., Kralj-Iglic V., Iglic A., y Zorec R. (2010). Fusion pore stability of peptidergic vesicles. *Mol. Membr. Biol.* 27(2–3), 65–80.
- Kaesler P.S. & Südhof T.C. (2005). RIM function in short- and long-term synaptic plasticity. *Biochem. Soc. Trans.* 33(Pt 6), 1345–1349.
- Kajimoto T., Okada T., Yu H., Goparaju S.K., Jahangeer S., y Nakamura S. (2007). Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Mol. Cell. Biol.* 27: 3429-3440.
- Kappos L., Antel J., Comi G., Montalban X., O'Connor P., Polman C.H., Haas T., Korn A.A., Karlsson G., y Radue E.W. (2006). Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 355: 1124–1140.
- Karli U.O., Schäfer T., y Burger M.M. (1990). Fusion of neurotransmitter vesicles with target membrane is calcium independent in a cell-free system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87(15), 5912–5915.
- Katsuki H. & Okuda S. (1995). Arachidonic acid as a neurotoxic and neurotrophic substance. *Prog Neurobiol.* 46: 607-636.
- Kawakita E., Hashimoto M., y Shido O., (2006). Docosahexaenoic acid promotes neurogenesis in vitro and in vivo. *Neuroscience* 139, 991–997.
- Kelly R.B. (1985). Pathways in protein secretion in eukaryotes. *Science* 230: 25–32.

- Kesavan J., Borisovska M., y Bruns D. (2007). v-SNARE actions during Ca(2+)-triggered exocytosis. *Cell* 131:351–363.
- Kim H.Y., Edsall L., Garcia M., y Zhang H. (1999). The release of polyunsaturated fatty acids and their lipoxygenation in the brain. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447, 75–85.
- Kim H.Y., Akbar M., Lau A., y Edsall L. (2000). Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). Role of phosphatidylserine in antiapoptotic effect. *J. Biol. Chem.* 275, 35215–35223.
- Kinnunen P.K. & Holopainen J.M. (2000). Mechanisms of initiation of membrane fusion: role of lipids. *Biosci. Rep.* 20(6), 465–482.
- Kobayashi H., Ohta N., y Umeda M. (2004). Biology of Lysenin, a Protein in the Coelomic Fluid of the Earthworm *Eisenia foetida*. *International Review of Cytology* 236: 45-99.
- Kozlovsky Y. & Chernomordik L.V. (2002). Lipid intermediates in membrane fusion: formation, structure, and decay of hemifusion diaphragm. *Biophys. J.* 83, 2635–2651.
- Kweon D.H., Kim C.S., y Shin Y.K. (2003). Regulation of neuronal SNARE assembly by the membrane. *Nat. Struct. Biol.* 10: 440–447.
- Laemly U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lam A.D., Tryoen-Toth P., Tsai B., Vitale N., y Stuenkel E.L. (2008). SNARE-catalyzed fusion events are regulated by Syntaxin1A-lipid interactions. *Mol. Biol. Cell* 19:485–97;
- Lands W.E., (1989). n-3 Fatty acids as precursors for active metabolic substances: dissonance between expected and observed events. *J. Intern. Med. Suppl.* 731, 11–20.
- Lang T. (2007). SNARE proteins and ‘membrane rafts’. *J. Physiol.* 585.3: 693-698.
- Lang T., Bruns D., Wenzel D., Riedel D., Holroyd P., Thiele C., y Jahn R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* 20(9), 2202–2213.
- Lang T., Halemani N.D., y Rammner B. (2008). Interplay between lipids and the proteinaceous membrane fusion machinery. *Prog. Lipid Res.* 47, 461–469.
- Lapillonne A., DeMar J.C., Nannegari V., y Heird W.C. (2002). The fatty acid profile of buccal cheek cell phospholipids is a noninvasive marker of long-chain polyunsaturated fatty acid status in piglets. *J. Nutr.* 132, 2319–2323.
- Lahiri S. & Futerman A.H. (2007). The metabolism and function of sphingolipids and glycosphingolipids. *Cell. Mol. Life Sci.* 64(17), 2270–2284.
- Latham C. F., Osborne S. L., Cryle M. J., y Meunier, F. A. (2006) Arachidonic acid potentiates exocytosis and allows neuronal SNARE complex to interact with Munc18a. *J. Neurochem.* 100: 1543 – 1554
- Lentz B.R. & Lee J.K. (1999). Poly(ethylene glycol) (PEG)-mediated fusion between pure lipid bilayers: a mechanism in common with viral fusion and secretory vesicle release? *Mol Membr Biol*; 16: 279–296.
- Lin T.N., Wang Q., Simonyi A., Chen J.J., Cheung W.M., He Y.Y., Xu J., Sun A.Y., Hsu C.Y., y Sun G.Y. (2004). Induction of secretory phospholipase A2 in reactive astrocytes in response to transient focal cerebral ischemia in the rat brain. *J Neurochem* 90:637–645.
- Li Z. & Bittman R. (2007). Synthesis and Spectral Properties of Cholesterol- and FTY720-Containing Boron Dipyrromethene Dyes. *J. Org. Chem.*: 72, 8376-8382.
- Lin T.N., Wang Q., Simonyi A., Chen J.J., Cheung W.M., He Y.Y., Xu J., Sun A.Y., Hsu C.Y., y Sun G.Y. (2004). Induction of secretory phospholipase A2 in reactive astrocytes in response to transient focal cerebral ischemia in the rat brain. *J Neurochem.* 90: 637-645.
- Lindau, M., y Almers, W. (1995). Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 509-517.

- Lippincott-Schwartz J. & Phair R.D. (2010). Lipids and cholesterol as regulators of traffic in the endomembrane system. *Annu. Rev. Biophys.* 39, 559–578.
- Liu T., Wang T., Chapman E.R., y Weisshaar J.C. (2008). Productive hemifusion intermediates in fast vesicle fusion driven by neuronal SNAREs. *Biophys. J.* 94:1303–14
- Livett B.G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev* 64: 1103–1161.
- López I., Ortiz J.A., Villanueva J., Torres V., Torregrosa-Hetland C.J., Francés M.M., Salvador Viniegra S. y Gutiérrez L.M. (2009). Vesicle Motion and Fusion are Altered in Chromaffin Cells with Increased SNARE Cluster Dynamics. *Traffic* 10: 172–185
- Lopez-Font I., Torregrosa-Hetland C.J., Villanueva J., y Gutierrez L.M. (2010). T-SNARE cluster organization and dynamics in chromaffin cells. *J. Neurochem.* 114(6), 1550–1556.
- Low S.H., Vasanthi A., Nanduri J., He M., Sharma N., Koo M., Drazba J., y Weimbs T. (2006). Syntaxins 3 and 4 are concentrated in separate clusters on the plasma membrane before the establishment of cell polarity. *Mol Biol Cell* 17: 977–989.
- Lu X., Zhang F., McNew J.A., y Shin Y.K. (2005). Membrane fusion induced by neuronal SNAREs transits through hemifusion. *J. Biol. Chem.* 280:30538–30541.
- Lu X., Xu Y., Zhang F., y Shin Y.K. (2006). Synaptotagmin I and Ca²⁺ promote half fusion more than full fusion in SNARE-mediated bilayer fusion. *FEBS Lett.* 580:2238–2246.
- Lu X., Zhang Y., y Shin Y.K. (2008). Supramolecular SNARE assembly precedes hemifusion in SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15:700–706.
- Luberto C., Kravetska J.M., y Hannun Y.A. (2002). Ceramide regulation of apoptosis versus differentiation: a walk on a fine line. *Lessons from neurobiology. Neurochem Res* 27:609–617.
- Lynch K.L., Gerona R.R., Kielar D.M., Martens S., McMahon H.T., y Martin T.F. (2008). Synaptotagmin-1 utilizes membrane bending and SNARE binding to drive fusion pore expansion. *Mol. Biol. Cell* 12:5093–5103.
- Mamidipudi V. & Wooten M.W. (2002). Dual role for p75(NTR) signalling in survival and cell death: can intracellular mediators provide an explanation? *J Neurosci Res* 68:373–384.
- Marcheselli V.L., Hong S., Lukiw W.J., Tian X.H., Gronert K., Musto A., Hardy M., Gimenez J.M., Chiang N., Serhan C.N., y Bazan N.G. (2003). Novel docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion-mediated leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression. *J Biol Chem* 278:43807–43817.
- Martin T. F. (2001). PI(4,5)P₂ regulation of surface membrane traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 493 – 499.
- Massey J.B. (2001). Interaction of ceramides with phosphatidylcholine, sphingomyelin and sphingomyelin/cholesterol bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1510(1–2), 167–184.
- Mathias S., Peña L.A., y Kolesnick R.N. (1998). Signal transduction of stress via ceramide. *Biochem J* 335:465–480.
- Mathieu G., Denis S., Langelier B., Denis I., Lavialle M., y Vancassel S. (2010). DHA enhances the noradrenaline release by SH-SY5Y cells. *Neurochemistry International* 56: 94-100.
- Matsuda J., Yoneshige A., y Suzuki K. (2007). The function of sphingolipids in the nervous system: lessons learnt from mouse models of specific sphingolipid activator protein deficiencies. *J. Neurochem.* 103 (Suppl 1): 32–38.
- Melia T.J., You D., Tareste D.C., y Rothman J.E. (2006). Lipidic antagonists to SNARE-mediated fusion. *J. Biol. Chem.* 281(40), 29597–29605.
- Miron V.E., Schubart A., y Antel J.P. (2008). Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *Journal Of Neurological Sciences* 274: 13-17.

- Milosevic I, Sørensen JB, Lang T, Krauss M, Nagy G, Haucke V, Jahn R, Neher E. (2005). Plasmalemmal phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate level regulates the releasable vesicle pool size in chromaffin cells. *J Neurosci* ;25:2557–2565.
- Misura K. M., Scheller R. H., y Weis W. I. (2000). Threedimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404: 355 – 362.
- Miura A., Kajita K., Ishizawa M., Kanoh Y., Kawai Y., Natsume Y., Sakuma H., Yamamoto Y., Yasuda K., y Ishizuka T. (2003). Inhibitory effect of ceramide on insulin-induced protein kinase C ζ translocation in rat adipocytes. *Metabolism* 52:19–24.
- Montesinos M.S., Machado J.D., Camacho M., Díaz J., Morales Y.G., Alvarez de la Rosa D., Carmona E., Castañeyra A., Viveros O.H., O'Connor D.T., Mahata S.K., y Borges R. y col. 2008. The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *J. Neurosci.* 28:3350–58;
- Moore S.A. (2001). Polyunsaturated fatty acid synthesis and release by brain-derived cells in vitro. *J. Mol. Neurosci.* 16, 195–200.
- Moore S.A. (1993). Cerebral endothelium and astrocytes cooperate in supplying docosahexaenoic acid to neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 331, 229–233.
- Mosharov E.V., y Sulzer D. (2005). Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat. Methods* 2, 651-658.
- Munson M., Chen X., Cocina A. E., Schultz S. M., y Hughson F. M. (2000). Interactions within the yeast t-SNARE Sso1p that control SNARE complex assembly. *Nat. Struct. Biol.* 7: 894 – 902.
- Nakajima K., Tohyama Y., Kohsaka S., y Kurihara T. (2002). Ceramide activates microglia to enhance the production/secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) without induction of deleterious factors in vitro. *J. Neurochem.* 80: 697-705.
- Neher E. (1998). Vesicle pools and Ca $_2^+$ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* 20: 389–399.
- Neher E. & Marty A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79(21), 6712–6716.
- Neher E., y Zucker R.S. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10, 21-30.
- Nofal S., Becherer U., Hof D., Matti U., y Rettig J. (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J. Neurosci.* 27: 1386-1395.
- Numakawa T., Nakayama H., Suzuki S., Kubo T., Nara F., Numakawa Y., Yokomaku D., Araki T., Ishimoto T., Ogura A., y Taguchi T. (2003). Nerve growth factor-induced glutamate release is via p75 receptor, ceramide, and Ca $_2^+$ from ryanodine receptor in developing cerebellar neurons. *J Biol Chem* 278:41259–41269.
- Ohanian J. & Ohanian V. (2001). Sphingolipids in mammalian cell signalling. *Cell Mol Life Sci* 58:2053–2068.
- Ohara-Imaizumi M., Nishiwaki C., Kikuta T., Kumakura K., Nakamichi Y., y Nagamatsu S. (2004). Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 β cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Biol. Chem.* 279: 8403-8408.
- Osborne S. L., Wen P. J., y Meunier F. A. (2006) Phosphoinositide regulation of neuroexocytosis: adding to the complexity. *J. Neurochem.* 98, 336 – 342.
- Oyler G.A., Higgins G.A., Hart R.A., Battenberg E., Billingsley M., Bloom F.E., y Wilson M.C. (1989). The identification of a novel synaptosomal-associated protein, SNAP-25, differentially expressed by neuronal subpopulations. *J. Cell Biol.* 109, 3039-3052.

- Pagano Re., Puri V., Dominguez M., y Marks D.L. (2000). Membrane traffic in sphingolipid storage diseases. *Traffic* 1(11), 807–815.
- Papahadjopoulos D., Hui S., Vail W.J., y Poste G. (1976). Studies on membrane fusion. I. Interactions of pure phospholipid membranes and the effect of myristic acid, lysolecithin, proteins and dimethylsulfoxide. *Biochim. Biophys. Acta* 448(2), 254–264.
- Pettus B.J., Bielawska A., Subramanian P., Wijesinghe D.S., Maceyka M., Leslie C.C., Evans J.H., Freiberg J., Roddy P., Hannun Y.A., y Chalfant C.E. (2004)a. Ceramide 1-phosphate is a direct activator of cytosolic phospholipase A2. *J Biol Chem* 279:11320–11326.
- Pettus B.J., Bielawska A., Spiegel S., Roddy P., Hannun Y.A., y Chalfant C.E. (2003). Ceramide kinase mediates cytokine- and calcium ionophore-induced arachidonic acid release. *J Biol Chem* 278:38206–38213.
- Pettus B.J., Chalfant C.E., y Hannun Y.A. (2004)b. Sphingolipids in inflammation: Roles and implications. *Curr Mol Med* 4:405–418.
- Phillis J.W., Horrocks L.A., y Farooqui A.A. (2006). Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurologic disorders. *Brain Res Rev* 52:201–243.
- Pike L.J. (2006). Rafts defined: a report on the Keystone Symposium on Lipids Rafts and Cell Function. *J. Lipid Res.* 47: 1597-1598.
- Pyne S. (2004). Lysolipids: sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid. In: Nicolaou A, Kokotos G, editors. *Bioactive lipids*. Bridgwater, England: The Oily Press. p 85–106.
- Poccia D. & Larijani B. (2009). Phosphatidylinositol metabolism and membrane fusion. *Biochem. J.* 418(2), 233–246.
- Pongrac J.L., Slack P.J., y Innis, S.M. (2007). Dietary polyunsaturated fat that is low in (n₃) and high in (n₆) fatty acids alters the SNARE protein complex and nitrosylation in rat hippocampus. *J. Nutr.* 137, 1852–1856.
- Powell C.M., Schoch S., Monteggia L., Barrot M., Matos M.F., Feldmann N., Südhof T.C., y Nestler E.J. (2004). The presynaptic active zone protein RIM1a is critical for normal learning and memory. *Neuron* 42(1), 143–153.
- Prasarnpun S., Walsh J., y Harris J. B. (2004). Betabungarotoxin- induced depletion of synaptic vesicles at the mammalian neuromuscular junction. *Neuropharmacology* 47: 304 – 314.
- Predescu S.A., Predescu D.N., Shimizu K., Klein I.K., y Malik A.B. (2005). Cholesterol-dependent syntaxin-4 and SNAP-23 clustering regulates caveolar fusion with the endothelial plasma membrane. *J Biol. Chem.* 280: 37130–37138.
- Qian H., Sheetz M.P., y Elson E.L. (1991). Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* 60: 910-921.
- Quetglas S., Leveque C., Miquelis R., Sato K., y Seagar M. (2000). Ca²⁺-dependent regulation of synaptic SNARE complex assembly via a calmodulin phospholipid-binding domain of synaptobrevin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9695–9700.
- Rand R.P. & Parsegian V.A. (1989). Hydration forces between phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta (BBA) – Rev Biomembr* ; 988: 351–376.
- Rao J.S., Lee H.J., Rapoport S.I., y Bazinet R.P. (2008) Mode of action of mood stabilizers: is the arachidonic acid cascade a common target? *Mol. Psychiatry* 13 585–596.
- Rapoport S.I. (2003). In vivo approaches to quantifying and imaging brain arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism. *J. Pediatr.* 143, S26–S34.
- Rhee J.S., Betz A., Pyott S., Reim K., Varoqueaux F., Augustin I., Hesse D., Südhof T.C., Takahashi M., Rosenmund C., y Brose N. (2002). Beta-phorbol ester- and

- diacylglycerol-induced augmentation of transmitter release is mediated by Munc13s and not by PKCs. *Cell* 108(1), 121–133.
- Rigoni M., Caccin P., Gschmeissner S., Koster G., Postle A.D., Rossetto O., Schiavo G., y Montecucco C. (2005). Equivalent effects of snake PLA2 neurotoxins and lysophospholipid-fatty acid mixtures. *Science* 310:1678–1680.
- Rigoni M., Pizzo P., Schiavo G., Weston A.E., Zatti G., Caccin P., Rossetto O., Pozzan T., y Montecucco C. (2007). Calcium influx and mitochondrial alterations at synapses exposed to snake neurotoxins or their phospholipid hydrolysis products. *J. Biol. Chem.* 282:11238–45.
- Reim K., Mansour M., Varoqueaux F., McMahon H.T., Südhof T.C., Brose N., y Rosenmund C. (2001). Complexins regulate a late step in Ca²⁺-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104(1), 71–81.
- Reese C., Heise F., y Mayer A. (2005). Trans-SNARE pairing can precede a hemifusion intermediate in intracellular membrane fusion. *Nature* 436:410–414.
- Reese C. & Mayer A. (2005). Transition from hemifusion to pore opening is rate limiting for vacuole membrane fusion. *J. Cell Biol.* 171:981–990.
- Rettig J. & Neher E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298:781–785.
- Rickman C. & Davletov B. (2005). Arachidonic acid allows snare complex formation in the presence of Munc18. *Chem. Biol.* 12(5), 545–553.
- Rickman C, Jiménez JL, Graham ME, Archer DA, Soloviev M, Burgoyne RD, Davletov B. (2006). Conserved prefusion protein assembly in regulated exocytosis. *Mol Biol Cell.* 17: 283-294.
- Rickman C., Medine C.N., Bergmann A., y Duncan R.R. (2007). Functionally and spatially distinct modes of Munc18-syntaxin 1 interaction. *J. Biol. Chem.* 282(16), 12097–12103.
- Rickman C., Medine C.N., Dun A.R., Moulton D.J., Mandula O., Halemani N.D., Rizzoli S.O., Chamberlain L.H., y Duncan R.R. (2010). t-SNARE Protein Conformations Patterned by the Lipid Microenvironment. *The Journal of Biological Chemistry* 285: 13535–13541.
- Richmond J.E., Weimer R.M., y Jorgensen E.M. (2001). An open form of syntaxin bypasses the requirement for unc-13 in vesicle priming. *Nature* 412, 338–341.
- Rizo J., Chen X., y Arac D. (2006). Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release. *Trends Cell Biol.* 16(7), 339–350.
- Rizo J. & Rosenmund C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15(7), 665–674.
- Rizo J. y Südhof T. C. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3: 641 – 653.
- Rodriguez-Lafresse C., y Vanier M.T. (1999). Sphingosylphosphorylcholine in Niemann-Pick disease brain: accumulation in type A but not in type B. *Neurochem. Res.* 24: 199–205.
- Rohrbough J. & Broadie K. (2005). Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nature Rev. Neurosci.* 6, 139–150.
- Rohrbough J., Rushton E., Palanker L., Woodruff E., Matthies H.J., Acharya U., Acharya J.K., y Broadie K. (2004). Ceramidase regulates synaptic vesicle exocytosis and trafficking. *J. Neurosci.* 24(36), 7789–7803.
- Rosa A.O. & Rapoport S.I. (2009). Intracellular- and extracellular-derived Ca(2+) influence phospholipase A(2)-mediated fatty acid release from brain phospholipids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1791: 697-705.

- Rosenmund C., Rettig J., y Brose N. (2003). Molecular mechanisms of active zone function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 509–519.
- Rosenmund C., Sigler A., Augustin I., Reim K., Brose N., y Rhee J. (2002). Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* 33(3), 411–424.
- Rossetto O., Morbiato L., Caccin P., Rigoni M., y Montecucco C. (2006). Presynaptic enzymatic neurotoxins. *J. Neurochem.* 97: 1534 – 1545.
- Roux P.P. & Barker P.A. (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor. *Prog Neurobiol* 67:203–233.
- Rupnik M., Kreft M., Sikdar S.K., Grilc S., Romih R., Zupancic G., Martin T.F., y Zorec R. (2000). Rapid regulated dense-core vesicle exocytosis requires the CAPS protein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97(10), 5627–5632.
- Salaün Ch., James D.J., y Camberlain L.H. (2004) Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic* 5: 255-264.
- Salem, N. Jr. y Niebylski C. D. (1995). The nervous system has an absolute molecular species requirement for proper function. *Mol. Membr. Biol.* 12: 131 – 134.
- Schapira A.H. (1996). Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Curr Opin Neurol* 9:260–264.
- Schaub J.R., Lu X., Doneske B., Shin Y.K., y McNew J.A. (2006). Hemifusion arrest by complexin is relieved by Ca²⁺-synaptotagmin I. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 13:748–750.
- Schneggenburger R., Sakaba T., y Neher E. (2002). Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci* 25:206–212.
- Schoch S., Castillo P.E., Jo T., Mukherjee K., Geppert M., Wang Y., Schmitz F., Malenka R.C., y Südhof T.C. (2002). RIM1a forms a protein scaffold for regulating neurotransmitter release at the active zone. *Nature* 415(6869), 321–326.
- Serhan CN. (2005)a. Novel eicosanoid and docosanoid mediators: resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8:115–121.
- Serhan C.N. (2005)b. Novel α -3-derived local mediators in anti-inflammation and resolution. *Pharmacol Ther* 105:7–21.
- Serhan C.N., Arita M., Hong S., y Gotlinger K. (2004). Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* 39:1125–1132.
- Sharma M., Burré J., y Südhof T.C. (2011). CSP α promotes SNARE-complex assembly by chaperoning SNAP-25 during synaptic activity. *Nature Cell Biol* 13: 30–39.
- (Schwandner y col., 1998).
- Sieber J.J., Willig K.I., Heintzmann R., Hell S.W., y Lang T. (2006). The SNARE motif is essential for the formation of syntaxin clusters in the plasma membrane. *Biophys J.* 90: 2843–2851.
- Simon C.G. Jr., Holloway P.W., y Gear A.R. (1999). Exchange of C(16)-ceramide between phospholipid vesicles. *Biochemistry* 38(44), 14676–14682.
- Simopoulos Artemis P. (2009). Omega-6/omega-3 essential fatty acids: biological effects. *World Rev. Nutr. Diet.* Volumen 99, páginas 1-16.
- Söllner T., Bennett M.K., Whiteheart S.W., Scheller R.H., y Rothman J.E. (1993). A protein assembly–disassembly pathway *in vitro* that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75(3), 409–418.
- Somers L.A., Hanchar H.J., Colliver T.L., Wittenberg N., Cans A., Arbault S., Amatore C., y Ewing A.G. (2004). The effects of vesicular volume on secretion through the fusion pore in exocytotic release from PC12 cells. *J. Neurosci.* 24:303–309.
- Song M.S., Posse de Chaves EI. (2003). Inhibition of rat sympathetic neuron apoptosis by ceramide. Role of p75NTR in ceramide generation. *Neuropharmacology* 45:1130–1150.

- Sørensen J.B. (2009). Conflicting views on the membrane fusion machinery and the fusion pore. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2009. 25:513–537.
- Sørensen J.B. (2004) Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflugers Arch* 448:347–362.
- Sørensen J.B., Nagy G., Varoqueaux F., Nehring R.B., Brose N., Wilson M.C., Neher E. (2003). Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114:75–86.
- Steyer J.A. & Almers W. (2001). A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 268-275.
- Stinchcombe J.C. & Griffiths G.M. (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* 147: 1–5.
- Strader Ch.R., Pearce C.L., y Oberlies N.H. (2011). Fingolimod (FTY720): A recently approved multiple sclerosis drug based on a fungal secondary metabolite. *Journal of Natural Products* 74: 900-907.
- Strokin M., Sergeeva M., y Reiser G. (2003). Docosahexaenoic acid and arachidonic acid release in rat brain astrocytes is mediated by two separate isoforms of phospholipase A2 and is differently regulated by cyclic AMP and Ca²⁺, *Br. J. Pharmacol.* 139: 1014–1022.
- Subramanian P., Stahelin R.V., Szulc Z., Bielawska A., Cho W., Chalfant C.E. (2005). Ceramide 1-phosphate acts as a positive allosteric activator of group IVA cytosolic phospholipase A2a and enhances the interaction of the enzyme with phosphatidylcholine. *J Biol Chem* 280:17601–17607.
- Südhof T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *27: 509–547*.
- Südhof T.C. & Jahn R. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *68, 863–911*.
- Südhof T.C. & Rizo J. (2011). Synaptic Vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.3: 1-14.
- Südhof T.C. & Rothman J. (2009). Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science* 323: 474-477.
- Svennerholm L. (1968). Distribution and fatty acid composition of phosphoglycerides in normal human brain. *J. Lipid Res.* 9(5), 570–579.
- Takamori S., Holt M., Stenius K., Lemke E.A., Grønborg M., Riedel D., Urlaub H., Schenck S., Brügger B., y Ringler P. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* 127: 831–846.
- Tandon A., Bannykh S., Kowalchuk J.A., Banerjee A., Martin T.F.J., y Balch W.E. (1998). Differential regulation of exocytosis by calcium and CAPS in semi-intact synaptosomes. *Neuron* 21: 147–154.
- Tanford C. (1978). The hydrophobic effect and the organization of living matter. *Science*. 1978 Jun 2; 200(4345):1012-1018.
- Terrian D.M. & White M.K. (1997). Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins: a family reunion and secondary structure predictions. *Eur J Cell Biol.* 73: 198-204.
- Tobaben S., Thakur P., Fernandez-Chacon R., Rettig J., Südhof T.C., Stahl B. (2001). A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. *Neuron* 31: 987–999.
- Toborek M., Malecki A., Garrido R., Mattson M.P., Hennig B., y Young B. (1999). Arachidonic acid-induced oxidative injury to cultured spinal cord neurons. *J Neurochem* 73:684–692.
- Thomas P., Wong J.G. y Almers W. (1993)a. Millisecond studies of secretion in single rat pituitary cells stimulated by flash photolysis of caged Ca⁺². *EMBO J.* 12: 303-306.

- Thomas P., Wong J.G., Lee A.K. y Almers W. (1993)b. A low affinity Ca^{+2} receptor controls the final step in peptide secretion from pituitary melanotrophs. *Neuron*. 11: 93-104.
- Toonen R.F. & Verhage M. (2003). Vesicle trafficking: pleasure and pain from SM genes. 13(4),177–186.
- Trimble W.S., Cowan D.M., y Scheller R.H. (1988). VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85: 4538-4542.
- Tse C.K., Dolly J.O., Hambleton P., Wray D., y Melling J. (1982). Preparation and characterisation of homogeneous neurotoxin typeA from *Clostridium botulinum*. Its inhibitory action on neuronal release of acetylcholine in the absence and presence of beta-bungarotoxin. *Eur. J. Biochem*. 122: 493 – 500.
- Tsukada H., Kakiuchi T., Fukumoto D., Nishiyama S., y Koga K. (2000). Docosahexaenoic acid (DHA) improves the agerelated impairment of the coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response: a PET study in conscious monkeys. *Brain Res*. 862, 180–186.
- Tyteca D., D'Auria L., Van Der Smissen P., Medts T., Carpentier S., Monbaliu J.C., de Diesbach P., Courtoy P.J. (2010). Three unrelated sphingomyelin analogs spontaneously cluster into plasma membrane micrometric domains. *Biochimica et Biophysica Acta* 1798: 909–927.
- Uchiyama Y., Maxson M.M., Sawada T., Nakano A., y Ewing A.G. (2007). Phospholipid mediated plasticity in exocytosis observed in PC12 cells. *Brain Research* 1151: 46-54.
- Ungar D. y Hughson F. M. (2003). SNARE protein structure and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol*. 19: 493 – 517.
- Urbe S, Page LJ, y Tooze SA. (1998). Homotypic fusion of immature secretory granules during maturation in a cell-free assay. *J Cell Biol* 143: 1831–1844.
- Van Blitterswijk W.J., Van Der Luit A.H., Veldman R.J., Verheij M., y Borst J. (2003). Ceramide: second messenger or modulator of membrane structure and dynamics? *Biochem. J*. 369(Pt 2), 199–211.
- Van Rheenen J., Langeslog M., y Jalink K. (2004). Correcting confocal acquisition to optimize imaging of fluorescence resonance energy transfer by sensitized emission. *Biophys J* 86: 2517-2529.
- Van Weering Jr., Toonen Rf., y Verhage M. (2007). The role of Rab3a in secretory vesicle docking requires association/dissociation of guanidine phosphates and Munc18–1. *PLoS ONE* 2(7), E616.
- Vardjan N., Stenovec M., Jorgacevski J., Kreft M., y Zorec R. (2007). Subnanometer fusion pores in spontaneous exocytosis of peptidergic vesicles. *J. Neurosci*. 27(17), 4737–4746.
- Varoqueaux F., Sigler A., Rhee J.S., Brose N., Enk C., Reim K., y Rosenmund C. (2002). Total arrest of spontaneous and evoked synaptic transmission but normal synaptogenesis in the absence of Munc13-mediated vesicle priming. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99(13), 9037–9042.
- Venkataraman K. & Futerman A.H. (2000). Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol*. 10(10), 408–412.
- Verhage M., Maia A.S., Plomp J.J., Brussaard A.B., Heeroma J.H., Vermeer H., Toonen R.F., Hammer R.E., van den Berg T.K., Missler M., Geuze H.J., y Südhof T.C. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864–869.
- Vijaykrishnan N. & Broadie K. (2006). Temperature-sensitive paralytic mutants: insights into the synaptic vesicle cycle. *Biochem. Soc. Trans*. 34(Pt 1), 81–87.
- Vijaykrishnan N., Woodruff E.A. 3rd y Broadie K. (2009). Rolling blackout is required for bulk endocytosis in non-neuronal cells and neuronal synapses. *J. Cell. Sci*. 122(Pt 1), 114–125.

- Vitale N., Caumont A., Chasserot-Golaz S., Du G., Wu S., Sciorra V.A., Morris A.J., Frohman M.A., y Bader M.F. (2001). Phospholipase D1: a key factor for the exocytotic machinery in neuroendocrine cells. *EMBO J.* 20(10), 2424–2434.
- Vogel S.S., Chernomordik L.V., y Zimmerberg J. (1992). Calcium-triggered fusion of exocytotic granules requires proteins in only one membrane. *J. Biol. Chem.* 267(36), 25640–25643.
- Vogel S.S., Leikina E.A., y Chernomordik L.V. (1993). Lysophosphatidylcholine reversibly arrests exocytosis and viral fusion at a stage between triggering and membrane merger. *J. Biol. Chem.* 268:25764–25768.
- Wainwright P.E. (2002). Dietary essential fatty acids and brain function: a developmental perspective on mechanisms. *Proc. Nutr. Soc.* 61(1), 61–69.
- Wakelam M.J. (1998). Diacylglycerol – when is it an intracellular messenger? *Biochim. Biophys. Acta* 1436(1–2), 117–126.
- Wang Y., Sugita S., y Sudhof T.C. (2000). The RIM/NIM family of neuronal C2 domain proteins. Interactions with Rab3 and a new class of src homology 3 domain proteins. *J. Biol. Chem.* 275(26), 20033–20044.
- Wang C.T., Bai J., Chang P.Y., Chapman E.R., y Jackson M.B. (2006). Synaptotagmin-Ca²⁺ triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J. Physiol.* 570:295–307.
- Wang C.T., Grishanin R., Earles C.A., Chang P.Y., Martin T.F., Chapman E.R., y Jackson M.B. (2001). Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. *Science* 294:1111–1115.
- Wang N., Kwan C., Gong X., De Chaves E., Tse A., y Tse F. (2010). Influence of cholesterol on catecholamine release from the fusion pore of large dense core chromaffin granules. *J. Neurosci.* 30(11), 3904–3911.
- Wang C.T., Lu J.C., Bai J., Chang P.Y., Martin T.F., Chapman E.R., y Jackson M.B. (2003). Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* 424:943–947.
- Wasser C.R., Ertunc M., Liu X., y Kavalali E.T. (2007). Cholesterol-dependent balance between evoked and spontaneous synaptic vesicle recycling. *J. Physiol.* 579(Pt 2), 413–429.
- Watanabe R., Funato K., Venkataraman K., Futerman A.H., Riezman H. (2002). Sphingolipids are required for the stable membrane association of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in yeast. *J. Biol. Chem.* 277(51), 49538–49544.
- Weis, R.M., Balakrishnan, K., Smith B.A., y McConnell, H.M. (1982). Stimulation of fluorescence in a small contact region between rat basophil leukemia cells and planar lipid membrane targets by coherent evanescent radiation. *J. Biol. Chem.* 257, 6440–6445.
- Wenk M.R., De Camilli P. (2004). Protein–lipid interactions and phosphoinositide metabolism in membrane traffic: insights from vesicle recycling in nerve terminals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 101(22), 8262–8269.
- Wierda K.D., Toonen R.F., De Wit H., Brussaard A.B., Verhage M. (2007). Interdependence of PKC-dependent and PKC independent pathways for presynaptic plasticity. *Neuron* 54(2), 275–290.
- Wiederhold K. & Fasshauer D. (2009). Is assembly of the SNARE complex enough to fuel membrane fusion? *J. Biol. Chem.* 284(19), 13143–13152.
- Wickner W. (2010). Membrane fusion: five lipids, four SNAREs, three chaperones, two nucleotides, and a Rab, all dancing in a ringon yeast vacuoles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 115–136.

- Williams D., Vicogne J., Zaitseva I., Mclaughlin S., y Pessin J.E. (2009). Evidence that electrostatic interactions between vesicle associated membrane protein 2 and acidic phospholipids may modulate the fusion of transport vesicles with the plasma membrane. *Mol. Biol. Cell* 20(23), 4910–4919.
- Wolf, M.K., y Aronson, S.B. (1961). Growth fluorescence and metachromasy of cells cultured in the presence of acridine orange. *J. Histochem. Cytochem.* 9, 22-29.
- Wolf B. A., Pasquale S.M., y Turk J. (1991). Free fatty acid accumulation in secretagogue-stimulated pancreatic islets and effects of arachidonate on depolarization-induced insulin secretion. *Biochemistry* 30: 6372 – 6379.
- Wong J.L., Koppel D.E., Cowan A.E., y Wessel G.M. (2007). Membrane hemifusion is a stable intermediate of exocytosis. *Dev. Cell* 12:653–659.
- Wu M.N., Littleton T.J., Bhat M.A., Prokop A., Bellen H.J. (1998). Rop, the *Drosophila* sec1 homolog, interacts with syntaxin and regulates neurotransmitter release in a dosage-dependent manner. *EMBO J.* 17(1), 127–139.
- Xu T., Rammner B., Margittai M., Artalejo A .R., Neher E., y Jahn R. (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99: 713-722.
- Yagasaki Y, Numakawa T, Kumamaru E, Hayashi T, Su TP, Kunugi H. (2006). Chronic antidepressants potentiate via sigma-1 receptors the brain-derived neurotrophic factor-induced signaling for glutamate release. *J Biol Chem.* 281: 12941-12949.
- Yamashima T. (2008). A putative link of PUFA, GPR40 and adult-born hippocampal neurons for memory. *Prog Neurobiol.* 84: 105-115.
- Yang H.C., Mosior M., Johnson C.A., Chen Y., y Dennis E.A. (1999). Group-specific assays that distinguish between the four major types of mammalian phospholipase A2. *Anal Biochem.* 269: 278-288.
- Yates M.L. & Barker E.L. (2009). Organized trafficking of anandamide and related lipids. *Vitam Horm.* 81:25-53.
- Yoon T.Y., Okumus B., Zhang F., Shin Y.K., y Ha T. (2006). Multiple intermediates in SNARE-induced membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 19731-19736.
- Yu Z.F., Nikolova-Karakashian M., Zhou D., Cheng G., Schuchman E.H., y Mattson M.P. (2000). Pivotal role for acidic sphingomyelinase in cerebral ischemia-induced ceramide and cytokine production, and neuronal apoptosis. *J Mol Neurosci.* 15: 85-97.
- Zampighi G.A., Zampighi L.M., Fain N., Lanzavecchia S., Simon S.A., y Wright E.M. (2006). Conical electron tomography of a chemical synapse: vesicles docked to the active zone are hemi-fused. *Biophys J.* 91: 2910-2918.
- Zeniou-Meyer M., Zabari N., Ashery U., Chasserot-Golaz S., Haeberlé A.M., Demais V., Bailly Y., Gottfried I., Nakanishi H., Neiman A.M., Du G., Frohman M.A., Bader M.F., y Vitale N. (2007). Phospholipase D1 production of phosphatidic acid at the plasma membrane promotes exocytosis of large dense-core granules at a late stage. *J. Biol. Chem.* 282(30): 21746–21757.

- Zhai R.G., Vardinon-Friedman H., Cases-Langhoff C., Becker B., Gundelfinger E.D., Ziv N.E., y Garner C.C. (2001). Assembling the presynaptic active zone: a characterization of an active one precursor vesicle. *Neuron*. 29: 131-143.
- Zhou Z., Mislser S., y Chow R.H. (1996). Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. *Biophys J*. 70: 1543-1552.
- Zhou Z. & Mislser S. (1996). Amperometric detection of quantal secretion from patch-clamped rat pancreatic beta-cells. *Biol Chem*. 271: 270-277.
- Zhu D, Zhou W, Liang T, Yang F, Zhang RY, Wu ZX, Xu T. (2007). Synaptotagmin I and IX function redundantly in controlling fusion pore of large dense core vesicles. *Biochem Biophys Res Commun*. 361: 922-927.
- Zimmerberg J., Cohen F.S., y Finkelstein A. (1980). Fusion of phospholipid vesicles with planar phospholipid bilayer membranes. I. Discharge of vesicular contents across the planar membrane. *J. Gen. Physiol*. 75: 241-250.
- Zoccarato F., Cavallini L., y Alexandre A. (1999). The pH-sensitive dye acridine orange as a tool to monitor exocytosis/endocytosis in synaptosomes. *J. Neurochem*. 72, 625-633.
- Zucker R.S. (1996). Exocytosis: a molecular and physiological perspective. *Neuron* 17, 1049-1055.

