

INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE ALICANTE

Unidad de Neurobiología Molecular

Universidad Miguel Hernández

Consejo Superior de Investigaciones Científicas



TESIS DOCTORAL

Microdominios funcionales de proteínas SNARE en células cromafines

INMACULADA BELÉN LÓPEZ FONT

Director de Tesis

Dr. Luis Miguel Gutiérrez Pérez

Sant Joan d'Alacant, abril de 2008

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento es un sentimiento lleno de satisfacción porque indica que siempre hubo a nuestro alrededor personas que fueron el empuje que necesitamos, día a día, para lograr lo que nos hemos propuesto.

Por ello, por fin ha llegado el momento de agradecer a todas esas personas que me han apoyado durante estos años y han hecho posible cumplir mi sueño de realizar esta tesis doctoral.

En primer lugar, mil gracias a mis padres, José Luis y Concha, porque me habéis apoyado en todas mis decisiones y habéis estado a mi lado cuando os he necesitado; y a mis hermanas, Davinia y Laura, simplemente porque os quiero y sois las mejores hermanas del mundo. Sin duda alguna, sois el pilar de esta tesis y sin vosotros nunca podría haber llevado a cabo este largo trabajo.

En segundo lugar, agradecer a mi director de tesis, el Doctor Luis Miguel Gutiérrez. Ha sido un placer trabajar contigo y madurar científicamente a tu lado. Gracias por todo Luis Mi.

Al Doctor Salvador Viniegra, por su gentileza cuando llegué a su laboratorio, y porque de alguna manera forma parte de esta tesis.

También me gustaría agradecer a todos mis compañeros, los que están y los que se han ido: Pep Mulet, Mar Francés, Vanesa Torres, Daniel Giner, Patricia Ñeco, Cristina Torregrosa, Cecilia Palazzetti, José Villanueva, Vero Murcia, Francisco Castelán, Marcos Aldea, Mar Castillo, José Antonio Ortiz, José Antonio Bernal y Eva Aznar. Os doy mil gracias a todos por haber aguantado mis enfados, estreses y prisas, y por haberme obsequiado con vuestra amistad. Con todos, y cada uno de vosotros, he compartido muchas experiencias que estoy segura serán difíciles de olvidar.

Gracias a mi Marita, por ser mi gran amiga, mi ángel de la guarda, sin tu ayuda, cariño y amistad nunca hubiese llegado tan lejos. Y a la Vane, por los momentos que hemos pasado juntas, pero sobre todo por lo mucho que nos hemos reído y compartido el día a día. Va a ser difícil encontrar a dos compañeras como vosotras y a las que aprecie tanto. Siempre recordaré los años que hemos compartido y la suerte que he tenido por haberos conocido.

A Francisco, por todos y cada uno de los momentos que hemos compartido, pero sobre todo por haberte conocido. No sabes cuanto te echo de menos.

A Vero, por estar siempre pendiente de mí, no sabes como han cambiado las tardes sin ti, y a Mar Castillo, porque siempre he encontrado en ti palabras de ánimo. Se que me llevo dos grandes amigas.

A Marcos, Dani y Bernal, por tantos ratos, cenas, comidas y conversaciones divertidas, pero sobre todo por vuestro ánimo y ayuda en todo momento.

A José Antonio Ortiz, por tus sabios consejos a nivel científico y personal, pero sobre todo por tus palabras de ánimo cuando más las necesitaba.

A Eva, con la que comencé mi andadura en los cursos de doctorado, por estar siempre dispuesta a escucharme y animarme en mis peores momentos. Gracias Eva, has sido un gran apoyo para mí estos últimos años.

A mis amigas de siempre y que tanto he echado de menos: Ali, Clara, Cris, Debo, Grachi, Hali, Helen, Horten, Inma Beltrán, Inma Castelló, Lourdes, Maite, Olga, Presen, Rosa, Sandra, Sofía, Susi, Vanesa y Vero, a todas y cada una de vosotras, gracias por ser mis amigas después de tanto tiempo y a pesar de la distancia.

A Olga e Inma, por vuestra amistad incondicional y por todo lo que hemos compartido en los innumerables años de nuestra amistad, pero sobre todo gracias por ser tan increíbles y verdaderas amigas.

A mi familia, primas y primos, tías y tíos, cuñados y cuñadas, por la gran familia que formamos tan atípica y divertida a la vez, y a mi segunda familia, mi gente de Gata, por lo bien que me acogéis cada vez que voy a vuestra casa.

A Pep, por estar a mi lado cada día, por saber comprenderme y ayudarme, pero sobre todo porque nadie me ha querido tanto como tú.

Para finalizar, no quiero dejar de recordar a muchas otras personas del Instituto y de mi unidad que de alguna manera u otra han sido importantes colaboradores en la realización de este proyecto.

A todos vosotros, MUCHÍSIMAS GRACIAS.

**Con todo mi cariño,
a mis padres y hermanas**

... y a Pep

“No dubta qui vol, sinó qui pot. Esforça't a dubar, tanmateix”

“No tingueu més conviccions que les absolutament imprescindibles”

Joan Fuster, *Proposicions Deshonestes*, 1968

“No duda quien quiere sino quien puede. Aun así, esfuérzate a dudar”

“No tengáis más convicciones que las absolutamente imprescindibles”

Joan Fuster, *Proposiciones Deshonestas*, 1968

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

<i>$\alpha/\beta/\gamma$-SNAP</i>	Proteínas solubles de anclaje para NSF
<i>Abs</i>	Absorción
<i>ADN</i>	Ácido desoxirribonucleico
<i>ADNasa</i>	Desoxirribonucleasa
<i>ACh</i>	Acetilcolina
<i>AG</i>	Aparato de Golgi
<i>ATP</i>	Trifosfato de adenosina
<i>BH₄</i>	(6R)-5, 6, 7, 8-tetra-L-hidrobiopterina
<i>BSA</i>	Albúmina Sérica Bovina
<i>Ca²⁺</i>	Calcio
<i>CaM</i>	Calmodulina
<i>CaMK II</i>	Proteína quinasa de tipo II dependiente de Ca ²⁺ /calmodulina
<i>CCDV</i>	Canales de calcio dependientes de voltaje
<i>C-term</i>	Carboxi-terminal
<i>D</i>	Coefficiente de difusión
<i>DBH</i>	Dopamina β -hidroxilasa
<i>DMEM</i>	Dulbecco's Modified Eagles Medium
<i>DMSO</i>	Dimetil sulfóxido
<i>D.O</i>	Densidad óptica
<i>DsRed</i>	Proteína roja fluorescente
<i>Em</i>	Emisión
<i>FIT</i>	Isocianato de Fluoresceína
<i>GDF</i>	"GDI dissociation factor"
<i>GDI</i>	"GDP-dissociation inhibitor"
<i>GEF</i>	"guanidine nucleotide exchange factor"
<i>GFP</i>	Proteína verde fluorescente

HVA	Alto umbral de activación (del inglés: "High voltaje-activated")
HVS-1	Virus del Herpes Simplex tipo 1
Imag.	Imagen
IRP	" <i>immediately releasable pool</i> "
IP₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
K/H	Krebs Hepes
L_{II-III}	Lazo citoplasmático que une los segmentos transmembrana II y III de la subunidad α_1 de los canales de calcio dependientes de voltaje
LAAD	L-aminoácido aromático descarboxilasa
LDCV	Vesículas grandes de núcleo denso (del inglés: "Large Dense Core Vesicles")
L-Dopa	3,4-dihidroxifenilalanina
LVA	Bajo umbral de activación (del inglés: "Low voltaje-activated")
min.	minuto/s
ms	milisegundo/s
MSD	Desplazamiento cuadrático medio
Na⁺	Sodio
NEM	N-etilmaleimida (del inglés "N-ethylmaleimide")
nm	nanómetros
NSF	Factor sensible a N-etilmaleimida (del inglés "N-ethylmaleimide sensitive factor protein")
NTBo	Neurotoxina botulínica
N-term	Amino-terminal
NTTe	Neurotoxina tetánica
PA	Ácido fosfatídico
PBS	Tampón Fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIP₂	Fosfatidilinositol 4.5-bifosfato
PNMT	Fenil-etanolamina-N-metil transferasa
RBD	Dominio de unión a Rab (del inglés: "Rab-binding domain").
RE	Reticulo endoplasmático

RRP	<i>"ready release pool"</i>
RP	"reserve pool"
s	segundo/s
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIF	<i>"intermediate small intensely fluorescent"</i>
SLMVs	Microvesículas sinápticas (del inglés: "synaptic-like microvesicles")
SNAP-25	Proteína de 25 KDa asociada a sinaptosomas
SNAPs	Proteínas solubles de unión a NSF (del inglés "soluble NSF attachment proteins")
SNAREs	Proteínas receptoras de SNAP (del inglés: "soluble NSF attachment proteins receptors"),
SRP	<i>"slowly releasable pool"</i>
synprint	Lugar de interacción de proteínas sinápticas (del inglés: "synaptic protein interaction site")
TA	Temperatura ambiente
TH	Tirosina hidroxilasa
TIRFM	Microscopía de fluorescencia de reflexión total interna
TM	Región transmembrana
TRIC	Isocianato de Tetrametilrodamina
UPP	<i>"unprimed pool"</i>
VAMP	Proteína de membrana vesicular (del inglés: "vesicle associated membrane protein")
Δt	Intervalo de tiempo



Índice

UNIVERSITAS
Miguel
Hernández

ÍNDICE

Introducción	1
1.- La glándula suprarrenal	1
1.1.- Estructura y componentes de la glándula suprarrenal	1
1.2.- Las células cromafines	2
1.2.1.- Las vesículas cromafines	3
1.2.2.- Biosíntesis y almacenamiento de catecolaminas	4
1.3.- Interés de las células cromafines como modelo neuronal: el término de paraneurona	6
2.- La exocitosis	8
2.1.- Acoplamiento “excitación-secreción” en las células cromafines	9
2.2.- El calcio como mensajero fundamental de la exocitosis	10
2.2.1.- Tipos de canales de calcio	10
2.2.2.- Diferencias entre especies	13
2.3.- Etapas de la exocitosis regulada	14
2.3.1.- Movimiento de las vesículas hacia las zonas activas de secreción	15
2.3.2.- Atrque y maduración de las vesículas en las zonas de liberación	15
2.4.- Física de la fusión de membranas celulares. El poro de fusión	17
3.- El complejo SNARE. Hipótesis SNARE	19
3.1.- Principales proteínas del complejo SNARE	21
3.1.1.- Sinaptobrevina o VAMP	21
3.1.2.- SNAP-25	22
3.1.3.- Sintaxina	25
3.2.- Estructura del complejo SNARE	28
3.3.- Disociación del complejo SNARE. Proteínas NSF y SNAP	30
3.4.- Proteínas reguladoras del complejo SNARE	31
3.4.1.- Sec1/Munc18; Proteínas SM	32
3.4.2.- Munc13/ Unc-13	32
3.4.3.- Complexinas	32
3.4.4.- Sinaptotagminas	33

3.4.5.- Proteínas Rab y efectores	34
3.4.6.- Sinaptofisina	36
3.5.- Mecanismo de fusión basado en las proteínas SNARE	36
4.- Determinantes de la ubicación focal de la exocitosis en las células cromafines	38
Objetivos	43
Materiales y métodos	45
1.- Preparaciones celulares	45
1.1.- Aislamiento y cultivo de células cromafines bovinas	45
1.1.1.- Obtención y preparación del tejido	45
1.1.2.- Digestión de la médula con colagenasa	45
1.1.3.- Dispersión mecánica de la médula	45
1.1.4.- Gradiente de Percoll	46
1.1.5.- Recuento celular	46
1.1.6.- Siembra de las células	46
1.2.- Preparación de rodajas de médula adrenal	47
1.2.1.- Obtención y preparación del tejido	47
1.2.2.- Proceso del corte	47
1.2.3.- Incubación de las rodajas	47
1.2.4.- Montaje de la rodajas en la cámara de registro	48
2.- Microscopía confocal en células cromafines en cultivo y rodajas de médula adrenal	48
2.1.- Inmunocitoquímica en células fijadas	49
2.2.- Inmunohistoquímica en rodajas de tejido	49
2.3.- Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica en células vivas	50
2.4.- Anticuerpos utilizados	50
2.4.1.- Anticuerpos primarios	50
2.4.2.- Anticuerpos secundarios	51
2.5.- Análisis de las imágenes obtenidas mediante microscopía confocal	52

3.- Técnicas básicas de manipulación y clonaje del ADN	52
3.1.- Generación de los constructos pEGFP-C3-SNAP-25, pEGFP-C3-SNAP-25 Δ 9, pDsRed-C3-SNAP-25, pDsRed-C3-SNAP-25 Δ 9 y pEGFP-N1-VAMP-2	53
3.2.- Generación de los constructos pHSVpuc-GFP-SNAP-25, pHSVpuc-GFP-SNAP-25 Δ 9, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 Δ 9 y pHSVpuc-VAMP-2-GFP	53
3.3.- Preparación y análisis del ADN	53
3.3.1.- Preparación de células competentes	53
3.3.2.- Transformación de células competentes	54
3.3.3.- Chequeo de las colonias obtenidas	55
3.3.4.- Purificación del ADN a pequeña escala	55
3.3.5.- Cuantificación del ADN	56
3.3.6.- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción	56
3.3.7.- Electroforesis del ADN	56
3.3.8.- Amplificación y purificación del ADN a mayor escala	56
4.- La línea celular c 2.2	58
4.1.- Técnicas generales de mantenimiento de la línea celular c 2.2	58
4.1.1.- Descongelación	58
4.1.2.- Mantenimiento del stock	58
4.1.4.- Subdivisión (tripsinización)	58
4.1.5.- Recuento	58
4.1.6.- Siembra	59
4.2.5.- Congelación	59
4.2.- Producción de virus	59
4.3.- Infección de las células cromafines	61
5.- Microscopía de luz evanescente en células cromafines en cultivo: TIRFM	62
5.1.- Estudio de la movilidad de los microdominios formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ 9 en células cromafines en cultivo	64
5.2.- Estudio de la movilidad de las vesículas cromafines en células cromafines que sobre-expresan SNAP-25 y SNAP-25 Δ 9	65
5.3.- Análisis del movimiento lateral de las vesículas y de los parches de expresión de las proteínas SNARE. Cálculo del desplazamiento cuadrático medio	66
5.4.- Análisis del movimiento axial de las vesículas y de los parches de expresión de las proteínas SNARE	67

5.5.- Análisis del movimiento axial y lateral de los parches de expresión de la proteína alterada después de un aumento en la concentración del calcio intracelular.	69
6.- Análisis de las fusiones vesiculares	70
7.- Análisis estadístico	72
<i>Resultados</i>	73
1.- La proteína vesicular dopamina β-hidroxilasa colocaliza con parches syntaxina 1A y SNAP-25 después de la exocitosis en células cromafines bovinas en cultivo	73
2.- Análisis de las zonas de secreción en secciones polares de células cromafines en cultivo	76
3.- La intensidad y duración del estímulo condiciona el número de parches de proteínas t-SNARE empleados para la secreción	78
4.- Syntaxina 1A y SNAP-25 también colocalizan con la proteína vesicular dopamina β-hidroxilasa después de la exocitosis en rodajas de médula adrenal	80
5.- Microdominios de syntaxina 1A y SNAP-25 están presentes en forma de parches en la membrana plasmática de las células cromafines bovina tanto en cultivo como en rodajas de médula adrenal	82
6.- Munc18-1 se encuentra presente en los microdominios de proteínas SNARE tanto en células cromafines en cultivo como en rodajas de médula adrenal	86
7.- El grado de colocación de los diferentes tipos de canales de calcio dependientes de voltaje con las proteínas SNARE depende del tipo de preparación	88
8.- La sobre-expresión de la proteína GFP fusionada a SNAP-25 y a SNAP-25 Δ9 forma parches en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas	91
9.- Los microdominios SNARE formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ9 presentan diferencias en cuanto a su movilidad	94
10.- El movimiento de las vesículas cromafines se correlaciona con el movimiento de los parches de expresión de las proteínas SNARE a los que se asocian	101
11.- El aumento en la concentración del calcio intracelular disminuye el movimiento de los parches de expresión de SNAP-25 Δ9	105
12.- Las vesículas altamente móviles de células infectadas con SNAP-25 Δ9 presentaron una baja probabilidad de fusión.	109
13.- Las fusiones vesiculares son en promedio cinéticamente más lentas cuando se expresan los microdominios SNARE altamente móviles	113

Discusión	115
1.- Caracterización de las zonas de secreción en un modelo neuroendocrino	115
1.1.- Relación entre las proteínas SNARE y las zonas de secreción en las células cromafines bovinas	116
1.2.- Syntaxina 1A y SNAP-25 se encuentran formando microdominios estables en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas definiendo las zonas de secreción	118
1.3.- Munc18-1 forma parte de los microdominios de proteínas SNARE	120
1.4.- Relación entre los microdominios de proteínas SNARE y los canales de calcio dependientes de voltaje	121
2.- Análisis del comportamiento de los microdominios SNARE en las células cromafines bovinas en cultivo y su relación con las vesículas cromafines	123
2.1.- Estudio de la formación y dinámica de los microdominios SNARE	125
2.2.- El movimiento de las vesículas cromafines se correlaciona con el movimiento de los microdominios SNARE a los que se asocia	127
2.3.- El aumento en la concentración del calcio intracelular disminuye el movimiento de los parches de expresión de la proteína alterada	129
2.4.- La probabilidad de fusión de las vesículas disminuye en las células en las que se sobre-expresa la proteína alterada	131
2.5.- Un modelo integrado de la función de los microdominios de proteínas SNARE en la exocitosis	132
Conclusiones	135
Bibliografía	137
Anexos	155



Introducción

INTRODUCCIÓN

1.- La glándula suprarrenal

1.1.- Estructura y componentes de la glándula suprarrenal

Las glándulas adrenales, también conocidas como glándulas suprarrenales, son dos pequeñas glándulas triangulares aplanadas localizadas, cada una de ellas, en la parte superior de los riñones de los vertebrados.

Funcionalmente, están compuestas por una zona estructural y otra secretora. La zona estructural, conocida como cápsula suprarrenal, está constituida por una gruesa cápsula de tejido conectivo que recubre la zona o tejido secretor y que se extiende hacia el interior de esta formando conductos a través de los cuales transcurren los vasos sanguíneos y los nervios. La zona secretora se organiza en dos regiones con origen embriológico y funciones fisiológicas diferentes: la médula y la corteza.

La corteza proviene del tejido mesodérmico, no posee inervación y se encuentra dividida en tres capas: la glomerular, que es la más externa y produce mineralocorticoides; la fasciculada, que es la intermedia y produce glucocorticoides y la reticular, que es la más interna y produce hormonas sexuales.

La médula adrenal, formada principalmente por las células cromafines, está inervada por fibras colinérgicas procedentes de la médula espinal y se desarrolla a partir de células ganglionares simpáticas inmaduras que tienen su origen embriológico, al igual que las neuronas, en la cresta neural (Weston, 1970; Patterson, 1990). Diferentes estudios han mostrado evidencias de que los glucocorticoides secretados por la corteza suprarrenal son en parte los responsables de que una célula procedente de la cresta neural se diferencie en una célula cromafín. Estos glucocorticoides también estimulan la actividad de la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), que como veremos más adelante, cataliza la conversión de la noradrenalina en adrenalina (Hodel, 2001).

La función principal de la médula adrenal consiste en sintetizar, almacenar y liberar catecolaminas, adrenalina, noradrenalina y dopamina, al torrente sanguíneo para asegurar en todo momento la homeostasis del organismo y situar al individuo en actitud de alerta y rendimiento máximo.

La médula adrenal está formada principalmente por células cromafines de dos tipos, adrenérgicas y noradrenérgicas (Hillarp y Hokfekt, 1953). Existe un tercer tipo de célula cromafín de vesículas pequeñas denominada SIF (del inglés: "intermediate small intensely fluorescent") (Michel y col., 1963; Kanno, 1998; Huber, 2006). Estas células, que poseen un fenotipo intermedio entre las células noradrenérgicas y las neuronas (Aunis y Langley, 1999), se encuentran fácilmente en algunas especies como el ratón y son difíciles de observar en otras como la rata. Secretan noradrenalina pero su papel fisiológico no se conoce.

Las células cromafines se encuentran intercaladas por células de sostén. Estas células, pequeñas e irregulares, están consideradas como componentes neurogliales de la médula adrenal (Cocchia y Michetti, 1981).

Por último, en la médula adrenal también se encuentran células endoteliales y fibroblastos formado un estroma de fibras reticulares que rodea los acinos de células secretoras (Coupland, 1965).

1.2.- Las células cromafines

Las células cromafines deben su nombre al color producido por la reacción química de la adrenalina. En el siglo XIX se comprobó que una sustancia no identificada de la médula adrenal reaccionaba con sales de cromo produciendo una coloración pardo-amarillenta. Alfred Khon, en Praga, acuñó a principios del siglo XX el término cromafín para las células teñidas por el cromo. Casi simultáneamente era aislada y sintetizada en el laboratorio la sustancia responsable de dicha reacción; la adrenalina.

En un corte transversal de una glándula adrenal se puede observar como las células cromafines se organizan en grupos o acinos rodeadas de tejido conectivo y con una distribución en torno a los vasos sanguíneos. Cada acino constituye una unidad funcional independiente para la liberación de catecolaminas, secretando todas las células del acino de manera sincronizada tras la estimulación por las fibras del nervio esplácnico (Iijima y col., 1992; Kajiwara y col., 1997). La morfología de estas células es bastante homogénea, tienen una apariencia poligonal en la glándula intacta pero adoptan una morfología esférica cuando son aisladas mediante cultivo celular (Kajiwara y col., 1997).

Como se ha reseñado con anterioridad hay dos tipos principales de células cromafines, las adrenérgicas y las noradrenérgicas. La proporción y distribución en la médula de cada uno de estos tipos depende de las necesidades fisiológicas de cada especie. En rata, por ejemplo, el 80-85 % de las células son adrenérgicas, mientras que en humanos y bovinos esta proporción

baja hasta el 75 % (Aunis y Langley, 1999; Hodel y col, 2001). En cuanto a su distribución en la médula, las células noradrenérgicas se encuentran mayoritariamente en el centro de esta mientras que las adrenérgicas predominan en áreas adyacentes a la corteza adrenal, es decir, en la periferia de la médula (Coupland y col, 1965).

Debido a su semejanza morfológica, ambos tipos celulares son imposibles de diferenciar tanto en cultivo celular como en rodajas de tejido. Una manera adecuada para diferenciarlos es mediante la utilización de anticuerpos específicos contra la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT) (Goldstein y col., 1971), ya que esta enzima, que cataliza la síntesis de adrenalina a partir de noradrenalina, se encuentra únicamente en las células adrenérgicas. Otra forma es mediante microscopía electrónica, ya que las células adrenérgicas poseen gránulos cromafines menos electrón-densos y más homogéneamente repartidos que las células noradrenérgicas.

Existen diferencias significativas entre ambos tipos celulares como son la expresión de diferentes moléculas de adhesión, por ejemplo NCAM y L1 (Langley y Aunis, 1984; León y col., 1992 a y b), de diversos receptores moleculares en su superficie celular, por ejemplo los de histamina, angiotensina II y muscarínicos (Choi y col., 1993), y de algunas proteínas como GAP-43 (Grant y col., 1994) y ambas isoformas de SNAP-25 (Grant y col., 1999).

1.2.1. Las vesículas cromafines

Las vesículas de secreción de las células cromafines han sido clasificadas en función de su aspecto al microscopio electrónico de transmisión. Aunque atendiendo a su forma y tamaño se han llegado a diferenciar hasta cinco tipos de vesículas diferentes (Koval y col., 2001), las más abundantes son las denominadas vesículas cromafines o vesículas grandes de núcleo denso (LDCV, del inglés: "Large Dense Core Vesicles") que reciben este nombre por su alto contenido peptídico denso a los electrones.

Se han publicado muchos análisis morfológicos de las células cromafines y del número de vesículas que contienen en su interior (Coupland, 1968; Fenwick y col., 1978; Phillips, 1982; Phillips y Pryde, 1987; Vitale y col., 1995; Plattner y col., 1997). Dependiendo del tipo de análisis y de si son adrenérgicas o noradrenérgicas (Vitale y col., 1995), el número de vesículas varía sustancialmente entre las 17.000 (Vitale y col., 1995) y las 30.000 (Phillips, 1982), y su tamaño medio se sitúa entre los 200 y los 400 nm de diámetro (Vitale y col., 1995; Giner y col., 2007).

Las vesículas cromafines son activas metabólicamente, interviniendo, entre otros procesos bioquímicos, en la síntesis de noradrenalina y en el procesamiento de precursores neuropeptídicos. Su membrana está constituida principalmente por fosfolípidos, siendo el más abundante la fosfatidiletanolamina (Dreifuss, 1975), y se caracteriza por su alto contenido en colesterol. Aparte de estos componentes lipídicos contiene más de cuarenta polipéptidos diferentes, siendo la proteína mayoritaria una enzima reguladora de la cadena de síntesis de catecolaminas; la dopamina β -hidroxilasa o DBH. Además, posee una bomba de protones que proporciona la energía necesaria para la acumulación de catecolaminas, así como un transportador de las mismas, y proteínas comunes a otras vesículas de secreción como los transportadores de calcio y nucleótidos (Winkler, 1997).

La matriz de las vesículas cromafines contiene catecolaminas (0,5-1 M) (Phillips, 1982; Jankowski y col., 1993), ATP, nucleótidos, ácido ascórbico, e iones Ca^{2+} (Silinsky, 1975). Además, contiene cromograninas, de naturaleza ácida, que permiten, con la ayuda del ATP, Ca^{2+} y Mg^{2+} , el empaquetamiento de las catecolaminas en una matriz o gel que reduce el gradiente osmótico de la célula (Winkler, 1976). También se encuentran péptidos opiáceos como Met y Leu-encefalinas y en menor proporción otros péptidos como bombesina, neuropéptido Y, péptido vasoactivo intestinal y dinorfina (Fischer-Colbrie y col., 1986).

Otro tipo de vesículas secretoras de las células cromafines son unas vesículas pequeñas, de unos 50 nm de diámetro, parecidas a las sinápticas y que han sido denominadas microvesículas sinápticas o SLMV (del inglés: "synaptic-like microvesicles"). Estas microvesículas, son otro elemento importante de la similitud existente entre las neuronas y las células cromafines y se asemejan a las vesículas sinápticas neuronales en la composición de su membrana, su biogénesis y su ciclo vital. Resultados obtenidos en células β pancreáticas y cromafines sugieren que estas vesículas comparten con las sinápticas la capacidad de almacenar y secretar moléculas de comunicación no-peptídicas, sustancias parecidas a los neurotransmisores que actúan como elementos de señalización paracrina o endocrina (Thomas-Reetz y De Camilli, 1994).

1.2.2.- Biosíntesis y almacenamiento de catecolaminas

La adrenalina, noradrenalina y dopamina son sintetizadas en las células cromafines a partir de un precursor común, la tirosina (Figura 1). Los eventos moleculares implicados en la síntesis de estas catecolaminas fueron propuestos por primera vez por Blaschko en 1942 (Blaschko, 1942) y confirmados y ampliados posteriormente por otros grupos (Udenfried y col., 1953; Axelrod, 1962).

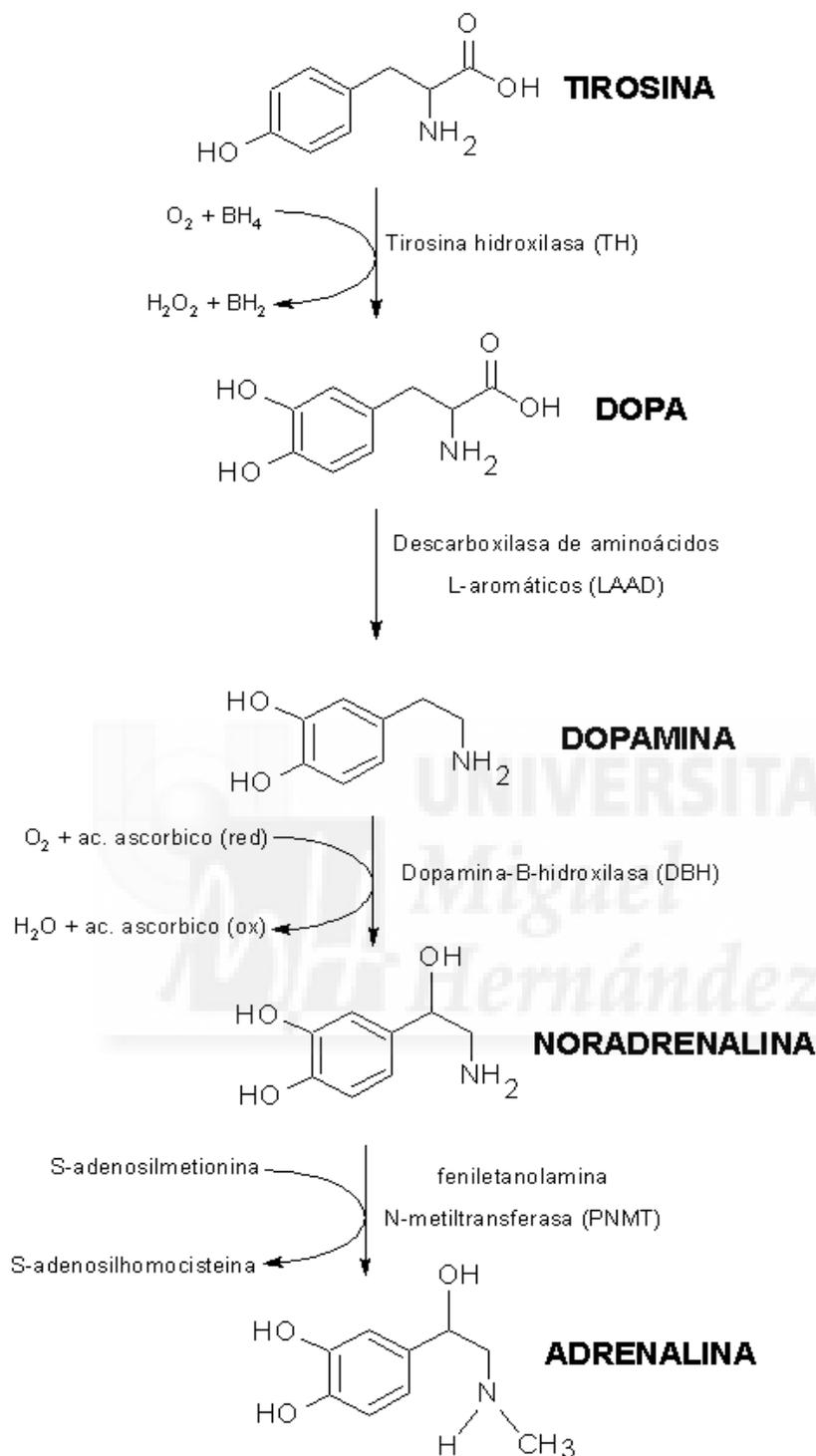


Figura 1. Ruta de biosíntesis de las catecolaminas en las células cromafines

La reacción que transforma la dopamina en noradrenalina tiene lugar en el interior de los gránulos secretores. El resto de reacciones tienen lugar en el citosol celular.

La primera etapa de esta síntesis consiste en la hidroxilación del aminoácido L-tirosina para dar lugar a 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Esta reacción, catalizada por la enzima tirosina-hidroxilasa (TH), es el paso limitante de todo el proceso de síntesis de las catecolaminas, ya que está sujeta a activación e inhibición por factores externos (Levitt y col., 1965; Ikeda y col., 1966).

El segundo paso de la cascada se corresponde con una reacción de descarboxilación de la L-DOPA para dar lugar a dopamina. Esta reacción es catalizada por la enzima citosólica descarboxilasa de aminoácidos L-aromáticos (LAAD).

El tercer paso se corresponde con la biosíntesis de noradrenalina a partir de dopamina, reacción catalizada por la enzima dopamina β -hidroxilasa (DBH) (Stewart y Klinman, 1988). Esta enzima se encuentra en la membrana de las vesículas cromafines por lo que es necesaria una captación previa de la dopamina por las vesículas. Esta reacción necesita oxígeno, ascorbato y cobre como cofactor (Helle, 1971).

Finalmente, y sólo en las células adrenérgicas, la noradrenalina es transportada al citoplasma donde se lleva a cabo su metilación a adrenalina (Axelrod, 1962) por la enzima feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT). A continuación, la adrenalina es reintegrada al gránulo.

1.3.- Interés de las células cromafines como modelo neuronal: el término de paraneurona

Las células cromafines han sido empleadas como modelo para el estudio de la neurosecreción debido a que presentan un gran parentesco con las neuronas simpáticas postganglionares (Douglas, 1968). Embriológicamente, ambas derivan de la cresta neural y secretan catecolaminas en respuesta a la estimulación por acetilcolina (ACh) (Feldberg y col., 1934). Además, ambos tipos celulares comparten características funcionales; así, las células cromafines también poseen receptores nicotínicos (Wilson y Kirshner, 1977) y muscarínicos (Douglas y Poisner, 1965) sobre los que actúa la ACh, disparan potenciales de acción (Biales y col., 1976) y poseen canales de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje (Fenwick y col., 1982 a; Artalejo y col., 1993; García y col., 2006).

Ambos tipos celulares también presentan similitudes morfológicas. La forma inicial de las células cromafines cuando son aisladas mediante cultivo celular es esférica, pero con el tiempo puede cambiar y manifestar prolongaciones axoniformes (Lee y Trifaró, 1981; Gutiérrez y col., 1998) similares morfológicamente a las exhibidas por las neuronas sensoriales y simpáticas (Bunge, 1973).

El término de paraneurona fue utilizado por primera vez en 1988 para describir a las células endocrinas y sensoriales que mostraban similitudes estructurales, funcionales y metabólicas con las células nerviosas (Fujita, 1988 y 1989). Las células cromafines son consideradas como paraneuronas debido a que cumplen los siguientes requisitos: sintetizan neurotransmisores o productos relacionados con estos (adrenalina, noradrenalina, dopamina, histamina y serotonina), poseen vesículas sinápticas y/o vesículas de secreción, y secretan el contenido de dichas vesículas en respuesta a estímulos específicos.

Por tanto, debido a la disponibilidad de tejido medular, a su fácil aislamiento y mantenimiento en cultivo (Livett, 1984), y a su semejanza con las neuronas, las células cromafines han sido utilizadas extensamente en la investigación del acoplamiento entre el estímulo y la secreción, así como para identificar las biomoléculas más importantes que participan en este proceso y su posible regulación. De hecho, en estudios realizados en este tipo de células es donde se acuñó por primera vez el término acoplamiento “excitación-secreción” para describir el papel del Ca^{2+} extracelular en la liberación de hormonas (Douglas y Rubin, 1961; Douglas, 1968). Como ilustración de su importancia experimental en estudios de secreción, se pueden encontrar en la bibliografía una gran variedad de temas que han sido investigados en estas células, entre ellos, la evaluación de los canales iónicos (Fenwick y col., 1982 a y b), el papel del calcio intracelular (Knight y Kesteven, 1983), la biología de las vesículas secretoras (Winkler y Westhead, 1980) y la biología de la maquinaria secretora (Burgoyne y Morgan, 1993).

En cuanto a la biología de la maquinaria secretora, que es la base de este trabajo, se ha comprobado que muchos sistemas celulares comparten elementos comunes del tráfico vesicular y la fusión regulada. Por ello, los resultados que se obtengan en este modelo celular, inciden, no solamente en el conocimiento del proceso neurosecretor de las células cromafines, sino en cualquier modelo neuronal o endocrino.

2.- La exocitosis

La exocitosis consiste en la fusión de la membrana de las vesículas con la membrana plasmática de la célula con la finalidad de liberar al espacio extracelular las sustancias almacenadas en el interior de las vesículas. Se trata de un proceso celular universal y es la manera más común de secretar mensajeros químicos y renovar componentes celulares. Además, es el procedimiento mediante el cual las células neuroendocrinas y neuronales liberan los neurotransmisores de forma cuántica.

Las primeras aportaciones que dieron luz sobre la liberación de neurotransmisores mediante el mecanismo de exocitosis llegaron de la mano de Bernard Katz y sus colaboradores en los años 50 (Fatt y Katz, 1952; Del Castillo y Katz, 1954). Estudiaron la liberación del neurotransmisor ACh en los terminales nerviosos de la placa motora y descubrieron que se producía de manera discreta en forma de paquetes o cuantos. Más tarde, Klein observó la vesícula en fusión con un microscopio electrónico y la denominó estructura en omega (Klein y Thureson-Klein, 1971).

Durante la década de los años 60 y 70 se establecieron los requerimientos iónicos necesarios para la liberación de los neurotransmisores, con la demostración de que el calcio y el ATP son elementos imprescindibles para que tenga lugar la secreción, mientras que en las últimas tres décadas se han ido precisando los mecanismos moleculares que desencadenan y regulan la secreción.

Existen dos tipos de exocitosis en las células eucariotas: la constitutiva y la regulada (Kelly, 1985; Burgess y Kelly, 1987). Durante la exocitosis constitutiva, que tiene lugar en todos los tipos celulares, las sustancias químicas son secretadas constantemente y las reacciones que conducen a dicha secreción no están reguladas por señales intracelulares. La exocitosis como mecanismo de secreción regulada es un proceso dependiente de calcio, una especialización de la ruta de secreción constitutiva que tiene lugar en tipos celulares específicos como las neuronas y los sistemas endocrinos y neuroendocrinos (Zucker, 1996).

La combinación de técnicas electrofisiológicas y de fluorescencia han permitido relacionar los fenómenos de membrana con la concentración del calcio intracelular y la exocitosis, dando soporte a la definición clásica del término acoplamiento "excitación-secreción" (Douglas., 1968), donde un aumento en la concentración del calcio intracelular es el nexo entre la excitación y la secreción (Douglas y Rubin, 1961; Douglas y col., 1965).

2.1.- Acoplamiento “excitación-secreción” en las células cromafines

El principal estímulo fisiológico que provoca la secreción de catecolaminas por las células cromafines es la ACh liberada por las terminaciones nerviosas del nervio esplácnico (Feldberg y col., 1934).

La ACh activará receptores nicotínicos (ionotrópicos) y/o muscarínicos (metabotrópicos) situados en la membrana plasmática de las células cromafines. El porcentaje de uno u otro receptor varía entre las distintas especies; y aunque el receptor muscarínico se ha visto implicado en la secreción de estas células (Douglas y Poisner., 1965), la respuesta secretora está dominada por la acción de la ACh sobre el receptor nicotínico (Douglas y Rubin., 1961).

La activación del receptor nicotínico implicará la apertura de dicho canal posibilitando la entrada de iones Na^+ . Junto con el Na^+ entrarán en menor cantidad iones Ca^{2+} (Douglas y col., 1967 a y b), produciéndose una despolarización suficiente para activar los canales de Na^+ dependientes de voltaje (Ceña y col., 1983). La entrada de Na^+ por estos canales aumentará la despolarización celular activando 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).

Paralelamente, la ACh activará receptores muscarínicos cuyos efectos en la secreción de catecolaminas van a ser muy variables y dependientes de la especie. En la especie bovina, por ejemplo, tras la estimulación muscarínica apenas se detecta secreción aunque sí ligeros incrementos en la concentración del calcio citosólico debido a la liberación de calcio de los depósitos intracelulares (Kao y Schneider, 1985; Olivos L y Artalejo R., 2008).

Además de los receptores colinérgicos se han encontrado otros receptores en estas células como los de histamina, bradiquinina y angiotensina II, cuya estimulación aumenta la concentración de calcio mediante la activación de la vía del inositol 1,4,5 trifostato (IP_3) (O'Sullivan y Burgoyne, 1989; Stauderman y Pruss, 1990; Stauderman y Murawsky, 1991).

La secreción de catecolaminas también puede ser disparada con concentraciones elevadas de K^+ extracelular que activará canales dependientes de voltaje sin requerir la activación del receptor nicotínico. Otros cationes divalentes, como el estroncio y el bario, permean por los canales de Ca^{2+} e inducen la secreción (von Rüden y col., 1993; Neves y col., 2001).

2.2.- El calcio como mensajero fundamental de la exocitosis

Independientemente del inductor de la secreción utilizado, el aumento de la concentración del calcio intracelular es el elemento clave para que se produzca la exocitosis. En las células cromafines, el calcio que entra a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) es el principal estímulo fisiológico para la secreción de catecolaminas (Douglas y Rubin, 1961; Douglas y Poisner, 1965; Douglas, 1968; Cheek y col., 1989).

Existen una gran diferencia entre la concentración de calcio dentro y fuera de la célula. La concentración de calcio extracelular es aproximadamente 2 mM, mientras que en condiciones basales la concentración de calcio intracelular es del orden de 100 nM o inferior. Por lo general, en las células nerviosas la apertura de los CCDV, que ocurre tras la despolarización celular, produce un aumento en la concentración del calcio intracelular que va desde 100 nM a aproximadamente 100 μ M en cuestión de microsegundos. En este sistema, los canales de calcio forman complejos proteicos multiméricos donde las vesículas sinápticas se encuentran a pocos nanómetros de distancia de la membrana plasmática y la exocitosis tiene lugar en cuestión de milisegundos. En cambio, en las células cromafines la cinética de liberación es más lenta, y por este motivo, como veremos detalladamente en posteriores apartados, se ha pensado que los sitios de liberación de las vesículas no se encuentran en íntima asociación con la localización de los canales de calcio. En estas células, concentraciones de calcio intracelulares de entre 0,5 a 10 μ M son suficientes para disparar la exocitosis (Kao y Schneider, 1986; Chow y col., 1994).

Sin duda, esta diferencia responde a las funciones fisiológicas que desempeñan las neuronas y las células cromafines. En las neuronas, la liberación tiene que ser muy rápida para que la transmisión nerviosa siga su ritmo, mientras que en las células cromafines, la liberación rápida no es necesaria, las catecolaminas y demás sustancias se liberan a la sangre y el paso limitante no es la velocidad de secreción sino el tiempo que tardan hasta llegar al órgano diana.

2.2.1.- Tipos de canales de calcio

Gracias a cuatro aproximaciones experimentales se ha podido estudiar la gran diversidad existente de CCDV en las células excitables (García y col., 2006). Mediante la técnica de "patch-clamp" se han podido caracterizar las propiedades biofísicas de estos canales (cinéticas de activación, desactivación, inactivación, conductancia, etc.) (Hamill y col., 1981). A través de la utilización de diferentes sondas de calcio fluorescentes se han podido seguir los cambios en la concentración del calcio intracelular (Tsien y col., 1982). El aislamiento, purificación y síntesis de diferentes neurotoxinas han permitido diferenciar entre los diferentes subtipos de CCDV

existentes en un tipo celular (Olivera y col., 1994); y por último, mediante técnicas de biología molecular se ha podido determinar la estructura molecular de estos canales (Baldelli y col., 2004).

Los canales de calcio se pueden clasificar atendiendo a sus propiedades biofísicas y farmacológicas. Según el voltaje necesario para su activación se pueden clasificar en dos grupos: canales de calcio de bajo umbral de activación o LVA (del inglés: "Low voltaje-activated"), que se abren a potenciales superiores a -50 mV y de los que únicamente se ha descrito un subtipo denominado T, y canales de calcio de alto umbral de activación o HVA (del inglés: "high voltaje-activated"), que requieren una mayor despolarización de la membrana para abrirse (superior a -30 mV) y de los que han sido descritos 5 subtipos denominados L, N, P, Q, y R (Catterall y col., 2005).

Los canales de calcio son proteínas hetero-oligoméricas compuestas por varias subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β y γ (Hofmann y col., 1999; Catterall., 2000). La subunidad $\alpha 1$ está constituida por cuatro dominios que a su vez están formados por seis segmentos transmembrana. Esta subunidad forma el poro del canal y contiene el filtro de selectividad, el sensor del voltaje y los sitios de interacción de bloqueantes y potenciadores del canal. Las subunidades auxiliares, $\alpha 2\delta$, β y γ , son las responsables de la localización adecuada del canal en la membrana y de modular ciertas propiedades del canal.

La diversidad funcional en mamíferos entre los diferentes subtipos de canales de calcio puede ser explicada por la existencia de múltiples genes que codifican para las subunidades $\alpha 1$ y β , así como por las diferentes isoformas de estos genes generadas por un procesamiento alternativo del transcrito primario (del inglés: "splicing"). De acuerdo con la subunidad $\alpha 1$, los CCDV han sido clasificados en tres subfamilias (Catterall., 2000): Ca_v1 , Ca_v2 y Ca_v3 . La subfamilia Ca_v1 media las corrientes de tipo L y está formada por 4 miembros, $Ca_v1.1$, $Ca_v1.2$, $Ca_v1.3$ y $Ca_v1.4$, que fueron denominados previamente como α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} y α_{1F} . La subfamilia Ca_v2 media las corrientes de tipo P/Q, N y R y está formada por 3 miembros, $Ca_v2.1$, $Ca_v2.2$ y $Ca_v2.3$, denominados previamente como α_{1A} , α_{1B} y α_{1E} . Por último, la subfamilia Ca_v3 media las corrientes de tipo T y está formada por 3 miembros, $Ca_v3.1$, $Ca_v3.2$ y $Ca_v3.3$, previamente denominados α_{1G} , α_{1H} y α_{1I} . La tabla 1 resume algunas de las propiedades de estos canales además de su clasificación actual y tradicional (García y col, 2006).

NOMENCLATURA ACTUAL	NOMENCLATURA TRADICIONAL	CORRIENTES	BLOQUEANTES	POTENCIADORES	TEJIDO
Ca _v 1.1	α _{1S}	L	Nifedipino Nisoldipino Nitrendipino	BAY K 8644 FLP64176	Músculo esquelético
Ca _v 1.2	α _{1C}	L	Nifedipino Nisoldipino Nitrendipino	BAY K 8644 FLP64176 PCA50941	Corazón Músculo liso Cerebro Pituitaria Médula Adrenal
Ca _v 1.3	α _{1D}	L	Nifedipino Calcicludina	BAY K 8644 FLP64176 PCA50941	Corazón Páncreas Médula Adrenal Riñón Ovario Cóclea
Ca _v 1.4	α _{1F}	L	Nifedipino	BAY K 8644 FLP64176	Retina
Ca _v 2.1	α _{1A}	P/Q	ω-Aga-IVA ω-Ctx-MVIIC ω-Ctx-MVIID		Cerebelo Pituitaria Médula Adrenal Cóclea
Ca _v 2.2	α _{1B}	N	ω-Ctx-GVIA ω-Ctx-MVIA		Cerebro Sist. Nervioso Periférico Médula Adrenal
Ca _v 2.3	α _{1E}	R	SNX-482		Corazón Retina Cóclea Cerebro Médula Adrenal Pituitaria
Ca _v 3.1	α _{1G}	T	Mibefradilo		Cerebro Sist. Nervioso Periférico Médula Adrenal Cerebro
Ca _v 3.2	α _{1H}	T			Médula Adrenal Riñón Corazón Cerebro Hígado
Ca _v 3.3	α _{1I}	T			Cerebro

Tabla 1. Clasificación actual y tradicional de los diferentes subtipos de canales de calcio con respecto a la subunidad α1.

En la tabla se ha representado la nomenclatura actual y tradicional de los diferentes tipos de CCDV acorde a la subunidad α1, el tipo de corrientes que median, los diferentes bloqueantes y potenciadores de la secreción conocidos hasta el momento y su localización tisular (García y col., 2006).

2.2.2.- Diferencias entre especies

En las células cromafines, mediante diversas aproximaciones farmacológicas y electrofisiológicas se han identificado CCDV de tipo L, N, P/Q y R (Artalejo y col., 1992; Albillos y col., 1993, Jiménez y col., 1993; Artalejo y col., 1994; Kim y col., 1995, Engisch y Nowycky, 1996; O'Farrell y col., 1997). Estos diferentes subtipos de canales HVA presentan una densidad relativa dependiendo de la especie; por ejemplo, los canales de tipo P/Q predominan en la especie humana y bovina, los de tipo N en el cerdo, y los de tipo L en el gato, ratón y rata (García y col., 2006). Respecto al canal R, se sabe que las células cromafines expresan el ARNm de la subunidad α_{1E} (García-Palomero y col., 2000), implicada en la formación del poro de este canal. Además, las células cromafines de ratón y bovinas presentan una fracción de corrientes de calcio que no se bloquean por ninguno de los bloqueantes selectivos para el resto de subtipos, lo que hace que se atribuyan a canales de tipo R (Albillos y col., 2000).

En cuanto a los CCDV de tipo T (LVA), se sabe que las células cromafines bovinas expresan el ARNm de las subunidades α_{1G} y α_{1H} (García-Palomero y col., 2000) pero existe cierta dificultad a la hora de registrar corrientes de tipo T en estas células. A pesar de ello, existen trabajos en la bibliografía realizados en células cromafines bovinas (Diverse-Pierluissi y col., 1991) y en cromafines de rata (Hollins y Ikeda, 1996, Bournaud y col., 2001) en los que reportan este tipo de corrientes.

También difiere entre especies el grado en que cada uno de los subtipos contribuye a la secreción; por ejemplo, en las células cromafines bovinas los canales de tipo N y P/Q parecen ser los principales implicados en la secreción con alguna contribución de los de tipo L (López y col., 1994 b; Engisch y Nowycky, 1996; Currie y Fox, 1997; Lukyanetz y Neher, 1999), mientras que en las cromafines de rata parecen ser los canales de tipo L y N (Kim y col., 1995). En ratón, aunque las características del acoplamiento "excitación-secreción" parecen depender del tipo de preparación, células en cultivo o rodajas de tejido, los principales implicados en la secreción parecen ser los canales de tipo L, con importantes contribuciones de los de tipo N, P/Q y R (Moser y Neher, 1997; Albillos y col., 2000; Aldea y col., 2002; Chan y col., 2005).

Por otro lado, también se han encontrado importantes diferencias en cuanto al tipo de canal utilizado cuando se trata de células cromafines aisladas mediante cultivo celular o de la glándula intacta (Albillos y col., 2000; Benavides y col., 2004; Chan y col., 2005).

2.3.- Etapas de la exocitosis regulada

Diferentes estudios han demostrado que la exocitosis regulada requiere de varias etapas sucesivas donde se ven implicadas la interacción y la fina coordinación de complejas estructuras moleculares que dan lugar a (Figura 2):

- El movimiento o traslocación de las vesículas hacia las zonas activas de secreción.
- El atraque y maduración de dichas vesículas en las zonas activas.
- La fusión y liberación de los contenidos vesiculares.
- La recuperación de la membrana o endocitosis.

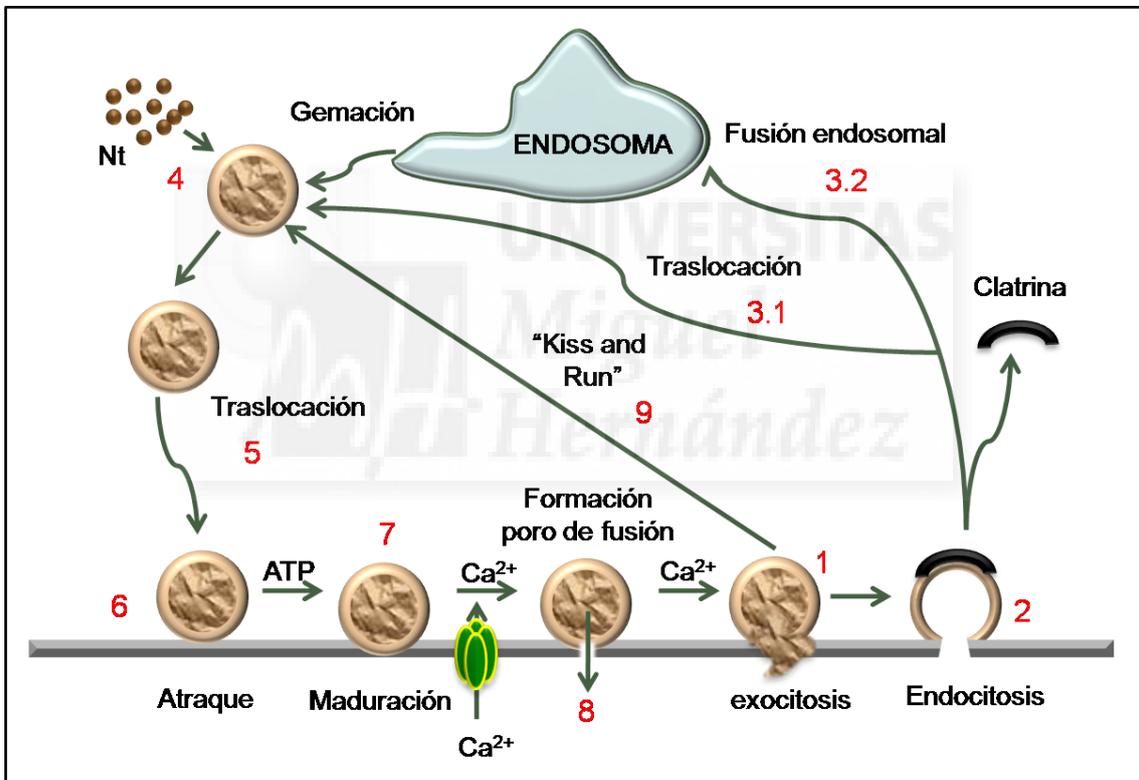


Figura 2. Etapas que componen el ciclo vesicular sináptico

El ciclo vital de las vesículas sinápticas no finaliza con la exocitosis (1), ya que son recicladas mediante un proceso conocido como endocitosis mediada por clatrina (2). Dentro de la célula, la vesícula es traslocada (3.1) y cargada con su correspondiente neurotransmisor (Nt) (4), o fusionada con un endosoma temprano (3.2) del que gemarán nuevas vesículas que serán cargadas con su correspondiente neurotransmisor (4). A continuación, estas vesículas serán traslocadas a la membrana celular (5) donde entrarán en contacto físico con esta mediante un proceso conocido como atraque (6). De todas las vesículas atracadas, algunas experimentarán un proceso de maduración (7) que las facultará para liberar su contenido (1) gracias a la formación de un poro de fusión (8). El poro de fusión puede volver a cerrarse tras liberar todo o parte del contenido de la vesícula, es el denominado mecanismo "Kiss and Run" (9). En la exocitosis regulada la elevación de la concentración del calcio intracelular es la señal que pone en marcha el proceso de fusión de membranas. Imagen adaptada de Südhof (Südhof., 2004).

2.3.1.- Movimiento o traslocación de las vesículas hacia las zonas activas de secreción

En esta etapa, las vesículas secretoras se empaquetarán en el aparato de Golgi donde sufrirán un proceso de “ordenación” (del inglés: “sorting”). Una serie de proteínas harán que la célula las reconozca como vesículas de secreción y las envíe como tales hacia la membrana plasmática. En este camino, las vesículas se acidificarán y comenzarán a captar catecolaminas, ATP, calcio y ácido ascórbico.

En el movimiento de las vesículas hacia la membrana plasmática participarán activamente microtúbulos, actina y las miosinas II y V (Trifaró y Vitale, 1993; Ñeco y col., 2002, 2003 y 2004). Una vez en la membrana plasmática, antes de que se produzca el atraque vesicular, una serie de proteínas dependientes de GTP, Go, Rho-A y ARF6, controlarán el trasiego de las vesículas y la actividad de proteínas diana claves para que se produzca el atraque (Vitale y col., 2000).

2.3.2.- Atraque y maduración de las vesículas en las zonas de liberación

El atraque (del inglés: “docking”), es una etapa dependiente de ATP (Martin, 1997) que consiste en el reclutamiento, reconocimiento del sitio de liberación por la vesícula y anclaje de dicha vesícula en la membrana plasmática. Únicamente una fracción de las vesículas atracadas experimentará una maduración o preparación (del inglés: “priming”), dependiente de ATP y Ca^{2+} (von Rüden y Neher, 1993), que las facultará para liberar su contenido mediante el proceso de fusión. Se ha sugerido que durante esta etapa podría ocurrir un proceso parcial de fusión donde las vesículas se detendrían esperando una señal de calcio (Südhof, 1995).

El paso final de fusión es dependiente del Ca^{2+} y del pH pero no del ATP (Heinemann y col., 1994). El proceso de fusión, tratado de manera detallada en el apartado siguiente, conlleva la formación de un poro entre el interior de la vesícula y el entorno extracelular, la expansión de dicho poro, y la liberación del contenido vesicular al espacio extracelular (Jackson y Chapman, 2006; Jackson, 2007).

En las células endocrinas, del análisis de la capacidad de la membrana celular (después de una elevación rápida y uniforme de la concentración del calcio intracelular por fotólisis rápida de compuestos fotoliberables de Ca^{2+}), se han podido distinguir varias fases cinéticas que representan las vesículas posicionadas en diferentes estadios a lo largo de la vía excitotóxica que conduce a la fusión (Neher y Zucker, 1993). La primera de estas fases se corresponde con la fase de la secreción rápida o de “estallido” excitotóxico y va seguida de una fase lenta o de secreción “sostenida”. La fase de estallido excitotóxico, que además puede resolverse en dos

componentes cinéticos (Voets y col., 1999; Voets, 2000), representaría la fusión de dos poblaciones de vesículas listas para experimentar exocitosis, es decir, dos poblaciones de vesículas atracadas en la membrana plasmática pero con diferentes estados de maduración. La fase de secreción sostenida, procedería de vesículas que en el momento de producirse el estímulo secretor todavía tienen que experimentar la traslocación a la membrana plasmática desde el interior celular, el atraque a dicha membrana, y el proceso de maduración.

Hasta el momento, se han establecido hasta cuatro tipos diferentes de depósitos o poblaciones de vesículas secretoras en función de su estado de madurez para experimentar la exocitosis:

- RP (del inglés: “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 (del inglés: “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 (del inglés: “slowly releasable pool”): son vesículas que se encuentran atracadas en la membrana plasmática y que han comenzado con el proceso de maduración.
- IRP (del inglés: “inmediately releasable pool”) o RRP (del inglés: “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 un población de RRP localizada cerca de agrupaciones de CCDV (Voets y col., 1999).

2.4.- Física de la fusión de membranas celulares. El poro de fusión

La fusión de membranas celulares ocurre cuando dos membranas lipídicas separadas se funden en una bicapa lipídica continua. Este proceso requiere la acción de proteínas especializadas que actúen como maquinaria de fusión exocitótica. Estas proteínas, serán las encargadas de mediar el reconocimiento inicial entre las membranas que se van a fusionar, aproximándolas entre sí para superar las elevadas fuerzas electrostáticas de repulsión existentes entre ellas antes de que los lípidos de las capas puedan interactuar. Una vez desestabilizado el límite de las zonas hidrofóbicas e hidrofílicas de la bicapa, se producirán estados de transición dirigidos a minimizar la exposición de las superficies no polares al medio acuoso. Estos estados culminarán con la formación de un poro de fusión que se expandirá y completará la fusión. De este modo, el proceso de fusión, según la hipótesis del tallo lipídico (del inglés: "stalk"), es una secuencia de pasos ordenada que incluye la aproximación de las capas lipídicas, la formación de un tallo lipídico, la generación de intermediarios de hemifusión, y la apertura del poro de fusión (Kozlov y Markin, 1983; Chernomordik y col., 1987; Jahn y col., 2003).

Los poros de fusión crean una conexión acuosa a través de las capas que se están fusionando. 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 o contraerse, dando como resultado diferentes estados intermedios moderadamente estables con distintas conductancias (Breckenridge y 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 y Almers, 1995), mientras que en otros se vuelve a cerrar dando lugar al denominado "Kiss and run" (Alés y col., 1999).

La composición molecular del poro de fusión es objeto de debate en la literatura. Se han propuesto dos modelos para la fusión de membranas lipídicas mediada por proteínas: el lipídico y el proteico.

El modelo lipídico defiende que el poro de fusión es de naturaleza exclusivamente lipídica (Monck y Fernández, 1992 y 1994; Jahn y col., 2003). De esta forma, las proteínas de la maquinaria de fusión exocitótica acercarían las membranas que se van a fusionar, y la fusión tendría lugar de manera espontánea cuando estas membranas alcanzaran una cierta distancia crítica. El mecanismo mediante el cual la proximidad de las membranas da lugar a la fusión no está del todo claro. Una gran variedad de factores, incluyendo la estructura molecular de los

lípidos, dictan la energía necesaria para la fusión (Burgess y col., 1992; Helm y col., 1992; Markin y Albanesi, 2002; Marrink y Mark, 2003). En un estudio en el que se utilizaron liposomas pequeños, de unos 15 nm, se vio que al aproximarlos se producía una pequeña fluctuación en una de las bicapas que desencadenaba la fusión de unos pocos lípidos de esa membrana con lípidos de la membrana opuesta. A continuación, el sitio de contacto se expandía de manera radial hasta formar un tallo lipídico que iba progresando hacia un estadio de hemifusión, y por último, daba lugar a un poro pequeño de naturaleza lipídica (Marrink y Mark, 2003).

El modelo proteico propone que al menos inicialmente el poro es de naturaleza proteica. Este poro se asemejaría a un canal acuoso tipo nexo (uniones con hendidura, del inglés: "gap junction"), en el cual miembros de la familia de las conexinas formarían dos hemicanales, uno en cada una de las membranas, que se combinarían para dar lugar a un poro de fusión (Lindau y Almers, 1995).

En ambos modelos se necesita de un estado intermedio de hemifusión. La diferencia fundamental entre ellos es que en el primer caso el poro se encuentra alineado con lípidos y en el segundo con proteínas. 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) y complexina (Archer y col., 2002) y con mutantes de Munc18 en células PC12 (Fisher y col., 2001). 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 excitotónica. El colesterol junto con el fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) parecen tener 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).

3.- El complejo SNARE. Hipótesis SNARE

En las dos últimas décadas se han identificado un gran número de proteínas que juegan un papel crítico en la exocitosis vesicular (Chen y Scheller, 2001; Jahn y col., 2003). Tres aproximaciones independientes llevaron a la identificación de estas proteínas con un papel clave en la fusión de las membranas.

Rothman y colaboradores mediante un ensayo de transporte en el aparato de Golgi identificaron un número de proteínas esenciales, a las que denominaron “factores”, para el tráfico de membranas. El primer factor que aislaron fue una ATPasa que era inactivada por N-etilmaleimida o NEM (del inglés “N-ethylmaleimide”) y que fue denominada factor sensible a NEM o NSF (del inglés: “N-ethylmaleimide sensitive factor protein”) (Block y col., 1988; Malhotra y col., 1988). Posteriormente, se purificaron una serie de proteínas adaptadoras requeridas para la función de NSF que fueron denominadas proteínas solubles de unión a NSF o SNAPs (del inglés: “soluble NSF attachment proteins”) (Clary y col., 1990), de las que hasta el momento se han identificado tres isoformas: α , β y γ -SNAP. La caracterización de estas proteínas permitió la identificación de un grupo de proteínas denominadas proteínas receptoras de SNAP o SNAREs (del inglés: “soluble NSF attachment proteins receptors”), las cuales no sólo servían de sitio de unión para las proteínas NSF y SNAP, sino que también mediaban la especificidad del anclaje y la fusión de las vesículas. Estas proteínas se clasificaron inicialmente en dos grupos: las que se asociaban a la membrana de las vesículas (v-SNAREs), y las que se encontraban en membranas diana (t-SNAREs) (Söllner y col., 1993 b). De estos trabajos iniciales se llegó a la conclusión de que las proteínas SNARE, junto con los factores solubles NSF y SNAP, formaban un complejo que parecía ser fundamental en la maquinaria de fusión de las membranas.

Simultáneamente, otros laboratorios demostraron que las neurotoxinas clostridiales (botulínicas y tetánica) bloqueaban la exocitosis mediante la proteólisis de una o más proteínas SNARE (Schiavo y col., 1992; Blasi y col., 1993 a y b; Schiavo y col., 1993 a, b y c; Montecucco y Schiavo, 1994 y 1995). Estos trabajos sirvieron para establecer que efectivamente las proteínas SNARE eran factores esenciales para la secreción.

Por último, los estudios en levaduras del laboratorio de Schekman revelaron que las versiones de NSF, SNAP y proteínas SNARE en levaduras mediaban el transporte *in vivo* de las vesículas de secreción (Novick y col., 1980; Ferro-Novick y Jahn, 1994).

Todos estos hallazgos dieron lugar a la denominada hipótesis SNARE (Rothman, 1994), hipótesis que considera que las proteínas SNARE son las responsables del tráfico específico de las vesículas (Söllner y col., 1993 a); además, propone que cada tipo vesicular posee una clase específica de v-SNARE que interacciona con tipos específicos de t-SNAREs localizadas en diferentes compartimentos diana. Esta especificidad de unión es la que determina que la fusión entre la membrana de la vesícula y la membrana diana sea a su vez específica.

Esta hipótesis inicial ha variado en muchos aspectos desde entonces. En estudios *in vivo*, se ha visto cómo distintas proteínas SNARE pueden reemplazarse las unas a las otras (Bhattacharya y col., 2002; Liu y Barlowe, 2002; Borisovska y col., 2005) y participar en múltiples reacciones (Fasshauer, 2003). Esto sugiere una redundancia entre las distintas proteínas como fenómeno más extendido que el esperado de la hipótesis, que considera a estas proteínas como las responsables de la especificidad de compartimientos del transporte intracelular (Söllner y col., 1993 b; McNew y col., 2000). Dicha especificidad es en parte debida a las proteínas reguladoras del complejo SNARE, que junto con las proteínas SNARE, van a hacer que el transporte vesicular en la célula sea altamente selectivo.

En la actualidad se han identificado muchas proteínas SNARE las cuales poseen una secuencia característica conocida como motivo SNARE. Esta secuencia, está compuesta por unos 60 residuos con estructura de hélice α ("coiled coil") conservados a lo largo de la evolución, y es la responsable de mediar las interacciones entre las distintas proteínas SNARE (Terrian y White, 1997).

Hasta el momento se han identificado 36 proteínas SNARE en mamíferos y 22 en *Saccharomyces cerevisiae* (Pelham, 1999). A pesar del gran número de proteínas descritas, el primer complejo SNARE neuronal identificado por Söllner y colaboradores sigue siendo el más estudiado (Söllner y col., 1993 b). Muchas de las posibles funciones propuestas para estas proteínas se basan en este modelo que está a su vez 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.

Originalmente, a este complejo neuronal se le propuso el papel de atraque de las vesículas sinápticas en las denominadas zonas activas de la secreción (Tahara y col., 1998; Ungermann y col., 1998). Posteriormente, se vio que células tratadas con diferentes neurotoxinas tenían un atraque de sus vesículas aparentemente normal pero su fusión estaba bloqueada (Schiavo y col., 2000), sugiriendo un papel de las proteínas SNARE posterior al

atraque, en los últimos pasos de la exocitosis (Gil y col., 1998; Xu y col., 1998 y 1999; Sorensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005; Sakaba y col., 2005).

3.1.- Principales proteínas del complejo SNARE

3.1.1.- Sinaptobrevina o VAMP

La proteína sinaptobrevina o VAMP (del inglés: “vesicle associated membrane protein”), fue identificada por primera vez como componente de las vesículas sinápticas (Trimble y col., 1988; Baumert y col., 1989) y posteriormente como elemento que participaba en la unión de proteínas SNAP *in vitro*.

Se trata de una proteína vesicular de unos 120 aminoácidos clonada por primera vez a partir de una librería del órgano eléctrico del torpedo (Trimble y col., 1988; Elferink y col., 1989) y posteriormente en otras especies (Südhof y col., 1989; Protopopov y col., 1993; Sweeney y col., 1995). Es una proteína integral de membrana que estructuralmente consta de cuatro regiones (Figura 3). En la zona amino terminal (N-term) de la proteína se encuentran una región de unos 25 a 35 aminoácidos rica en prolina y el motivo SNARE, conservado entre las diferentes isoformas. La región rica en prolinas, también denominada RRP, presenta una baja homología entre las diferentes isoformas pero el carácter dominante de prolinas se mantiene siempre (Elferink y col., 1989). En la zona carboxi-terminal (C-term) se encuentran un dominio transmembrana, a través del cual la proteína se ancla a la membrana vesicular, y un corto segmento variable situado dentro del lumen de las vesículas (Trimble y col., 1988).

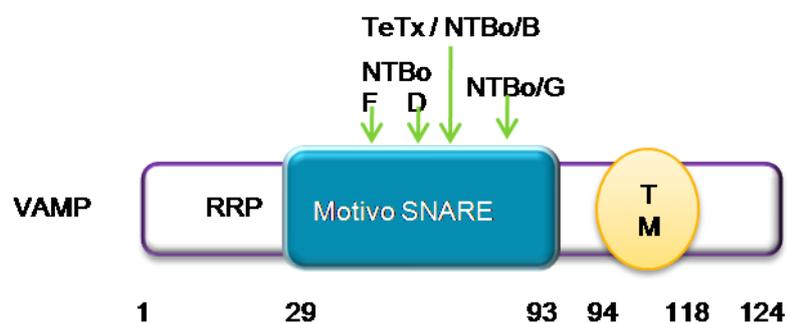


Figura 3. Estructura de sinaptobrevina neuronal

En la imagen se ha representado VAMP-2 desde el extremo N-term al extremo C-term. En la zona N-term de la proteína se encuentran la región rica en prolinas (RRP) y el motivo SNARE, mientras que en la zona C-term se encuentra la región transmembrana (TM) y un corto segmento variable situado dentro del lumen de las vesículas. También se pueden apreciar los sitios de corte de la toxina botulínica D (Lys⁵⁹-Leu⁶⁰), F (Gln⁵⁸-Lys⁵⁹), G (Ala⁸¹-Ala⁸²) y la tetánica y botulínica B que cortan en el mismo sitio (Gln⁷⁶-Phe⁷⁷). Imagen adaptada de Mc New y colaboradores (McNew y col., 1999).

VAMP es una proteína conservada a lo largo de la evolución (DiAntonio y col., 1993 a). Hasta el momento se han descrito 7 isoformas en mamíferos (VAMP 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8) sin tener en cuenta la gran variedad generada por el procesado alternativo del transcrito primario (Gerst, 1999). Las isoformas VAMP-1 y 2, presentes en el cerebro con distribuciones no solapantes (Trimble y col., 1990) y en las organelas secretoras de las células neuroendocrinas (Elferink y col., 1989), son las principales implicadas en la exocitosis neuronal y en la secreción regulada. El resto de isoformas tienen una distribución más ubicua y se ha visto que participan en el tráfico intracelular de vesículas.

Esta proteína, al igual que el resto de proteínas SNARE, es sustrato de neurotoxinas del género *Clostridium* tales como las toxinas botulínicas (NTBo/A-G) y la tetánica (TeTx) (Schiavo y col., 1992), las cuales proteolizan dianas específicas en la membrana presináptica e inhiben la transmisión sináptica (Montecucco y Schiavo, 1993). Todas las toxinas clostridiales son heterodímeros homólogos cuyas cadenas pesadas median la entrada de la molécula en la célula. Una vez dentro, las cadenas ligeras bloquean la exocitosis proteolizando a constituyentes específicos de la maquinaria de fusión exocitótica en una reacción dependiente de Zn^{2+} (Niemann y col., 1994). Las NTBo/B, D, F, G y la TeTx actúan específicamente sobre algunas isoformas de VAMP (Link y col., 1992; Schiavo y col., 1992 y 1993 a y b; Yamasaki y col., 1994). En la figura 3 se han representado los sitios de corte de la toxina botulínica D (Lys⁵⁹-Leu⁶⁰), F (Gln⁵⁸-Lys⁵⁹), G (Ala⁸¹-Ala⁸²) y el de la tetánica y botulínica B que cortan en el mismo lugar (Gln⁷⁶-Phe⁷⁷).

3.1.2.- SNAP-25

SNAP-25 (proteína de 25 KDa asociada a sinaptosomas) es una proteína con una longitud aproximada de unos 206 aminoácidos (Figura 4). Carece de segmentos transmembrana por lo que se une a la membrana plasmática de la célula mediante la palmitoilación de 4 cisteínas localizadas en el centro de la molécula (Oyler y col., 1989). Esto permite que las regiones amino y carboxi-terminal de la proteína miren al citoplasma y puedan unirse a otras proteínas a través de sus motivos SNARE. Concretamente, el motivo SNARE de la región N-term interacciona con sintaxina y ayuda a formar el lugar de unión de α -SNAP (apartado 3.3) (Chapman y col., 1994; Hayashi y col., 1994), mientras que el motivo SNARE de la región C-term se une a sinaptobrevina o VAMP y podría jugar un papel importante en el desensamblaje del complejo SNARE (Hayashi y col., 1995).

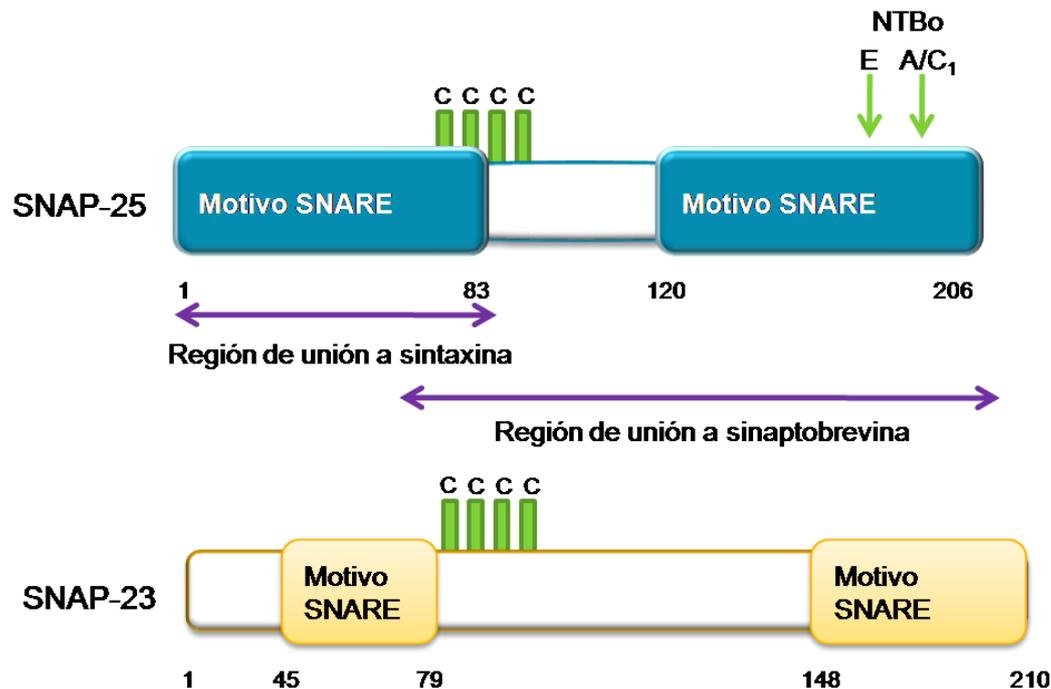


Figura 4. Estructura de SNAP-25 neuronal y su homólogo SNAP-23

En la imagen están representadas SNAP-25b y SNAP-23 desde el extremo N-term al extremo C-term. En ambas proteínas se pueden apreciar los motivos SNARE y la región de unión a la membrana plasmática de la célula a través de 4 cisteínas (c). Se ha representado la región de unión de SNAP-25 a sintaxina 1A (Stx; residuos 2-82) y a VAMP-2 (residuos 41-206). También se pueden apreciar los sitios de corte en SNAP-25 de la toxina botulínica A (Glu¹⁹⁷-Arg¹⁹⁸), C1 (Arg¹⁹⁸-Ala¹⁹⁹) y E (Arg¹⁸⁰-Ile¹⁸¹). Imagen de SNAP-25 tomada y modificada de Ybe y colaboradores (Ybe y col., 2000) e imagen de SNAP-23 tomada y modificada de Hodel y colaboradores (Hodel, 1998).

SNAP-25 es una proteína altamente conservada a lo largo de la evolución (Risinger y col., 1993). Hasta el momento se han descrito dos isoformas, formadas por un procesado alternativo del exón 5, que difieren únicamente en nueve aminoácidos. Seis de estos aminoácidos se encuentran en el motivo SNARE situado en la región N-term y los otros tres en la zona central de la proteína afectando a una de las 4 cisteínas de unión a la membrana plasmática (Bark, 1993; Bark y Wilson, 1994). Ambas isoformas, denominadas SNAP-25a y b, exhiben un patrón de expresión restringido siendo más abundantes en neuronas y células neuroendocrinas (Bark y col., 1995; Boschert y col., 1996).

Los niveles de expresión de ambas isoformas sufren cambios durante la embriogénesis. En ratas, por ejemplo, la expresión de SNAP-25a es más abundante durante el desarrollo del cerebro, mientras que la de SNAP-25b predomina en el sistema nervioso adulto (Bark y col., 1995; Boschert y col., 1996). Sin embargo, este cambio en la expresión no ocurre en las células neuroendocrinas; SNAP-25a es más abundante en células PC12 y en cromafines de rata,

mientras que en cromafines bovinas ambas isoformas se expresan casi por igual, siendo ligeramente mayor la expresión de SNAP-25b en las células adrenérgicas (Bark y col., 1995; Kannan y col., 1996; Grant y col., 1999). Las diferencias funcionales entre ambas isoformas han sido examinadas en células cromafines de ratón, y se ha visto que cuando SNAP-25a se sustituye por SNAP-25b se produce un aumento en el número de vesículas que forman parte de la población de vesículas listas para secretar (Sorensen y col., 2003) (RRP o IRP, apartado 2.3.2).

Otro miembro de esta familia es SNAP-23 (Figura 4). Esta proteína presenta aproximadamente un 60 % de homología con SNAP-25 pero su distribución es más ubicua (Ravichandran y col., 1996; Wang y col., 1997). De forma similar a SNAP-25, SNAP-23 se une a la membrana plasmática de la célula mediante la palmitoilación de 5 cisteínas (Wang y col., 1997); además, se ha visto que puede formar complejos SNARE con VAMP-2 y algunas isoformas de syntaxina (Ravichandran y col., 1996). Las células cromafines en cultivo expresan tanto SNAP-25 como SNAP-23 (Grant y col., 1999). En un estudio realizado en células cromafines de ratones deficientes en SNAP-25 y en las que se sobre-expresó SNAP-23, se vio que esta proteína sustituía a SNAP-25 pero la secreción tenía una cinética diferente caracterizada por la ausencia del componente rápido de secreción (estallido excitotico, apartado 2.3.2) (Sorensen y col., 2003).

Aunque SNAP-23 parece ser un buen candidato para un mecanismo alternativo de secreción, también parecen serlo los otros dos miembros de esta familia: SNAP-29 (Steedmaier y col., 1998) y SNAP-47 (Holt y col., 2006).

SNAP-29 presenta aproximadamente un 17 % de homología con SNAP-25 pero su distribución es más ubicua (Steedmaier y col., 1998). Aunque se ha visto principalmente implicada en el transporte trans-Golgi (Hohenstein y Roche, 2001), algunos estudios la sitúan como una proteína reguladora del complejo SNARE, ya que inhibiría su desensamblaje compitiendo con α -SNAP por la unión a syntaxina 1A (Su y col., 2001). Otros estudios argumentan que actúa como un regulador negativo de la secreción impidiendo el reciclaje de las proteínas SNARE (Pan y col., 2005).

SNAP-47 ha sido identificada recientemente (Holt y col., 2006). Se trata de una proteína con una distribución ubicua de la que todavía no se conoce su porcentaje de homología con SNAP-25. Es capaz de formar complejos SNARE con una afinidad menor que SNAP-25 (Holt y col., 2006), pero su sobre-expresión no es capaz de restablecer la excitosis en ratones

deficientes para SNAP-25 (Bock y col., 2001). Por estos motivos, se piensa que está implicada principalmente en el transporte trans-Golgi (Holt y col., 2006).

SNAP-25 es sensible a la NTBo/A, C1 y E (Blasi y col., 1993 a; Schiavo y col., 1993 b; Binz y col., 1994; Foran y col., 1996). En la figura 4 se han representado los sitios de corte de la NTBo/A (Glu¹⁹⁷-Arg¹⁹⁸), C1 (Arg¹⁹⁸-Ala¹⁹⁹) y E (Arg¹⁸⁰-Ile¹⁸¹). Un tratamiento con estas toxinas proteoliza la región C-term de la proteína liberando un péptido de 8, 9 y 26 aminoácidos respectivamente. Dependiendo del tipo de toxina los efectos en la secreción son diferentes. La proteólisis con la NTBo/E bloquea por completo la secreción (Lawrence y col., 1997), inhibe el estallido exocitótico y bloquea la fase de secreción sostenida (apartado 2.3.2) (Xu y col., 1998). Por otro lado, un tratamiento de las células con la NTBo/A únicamente inhibe la secreción de forma parcial, aunque sí parece que tenga lugar un bloqueo del componente lento de la secreción. Debido a esto, muchos trabajos apuntan que la NTBo/A tiene un doble efecto, uno en etapas relativamente tempranas de la secreción, afectando el atraque de las vesículas, y otro modificando el estallido exocitótico (Gil y col., 1998; Xu y col., 1998 y 1999). En cuanto a SNAP-23, existe controversia en este aspecto, parece ser que la variante SNAP-23 de roedores, pero no la de humanos, es proteolizada por la NTBo/A y E con una eficacia menor (Vaidyanathan y col., 1999). SNAP-29 (Schiavo y col., 2000) y SNAP-47 (Holt y col., 2006) son resistentes a ambas neurotoxinas.

3.1.3.- Sintaxina

Las sintaxinas son una gran familia génica que se expresa en muchos tejidos y compartimentos de membrana. Actualmente se conocen 15 miembros en humanos (sintaxina 1A, 1B, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12/13, 16, 17 y 18) que, sumado a la gran diversidad producida por procesados alternativos del transcrito primario, hacen de esta familia la más amplia dentro de las proteínas SNARE. Las isoformas 1A y 1B son las más abundantes en células neuronales y endocrinas, y por lo tanto las implicadas en la exocitosis neuronal y la secreción regulada. El resto de isoformas tienen una distribución más ubicua (Tabla 2) (Teng y col., 2001).

Las sintaxinas son unas proteínas con una longitud aproximada de unos 300 aminoácidos. Todas las sintaxinas, a excepción de la sintaxina 11, son proteínas transmembrana con una región hidrofóbica C-term a través de la cual se anclan a la membrana plasmática y un dominio N-term orientado hacia el lado citosólico. Tras la región transmembrana contienen varias regiones hidrofóbicas que forman el motivo SNARE (Figura 5), muy conservado en todas las sintaxinas. A través de este motivo, sintaxina interacciona con motivos SNARE de otras proteínas como por ejemplo de SNAP-25 para formar complejos t-SNARE en las membranas

diana. La región N-term de algunas sintaxinas, como sintaxina 1A y 1B, contienen un dominio característico que consiste en 3 hélices α (Lerman y col., 2000) denominado dominio Habc. Este dominio, puede plegarse cerca del motivo SNARE haciendo que sintaxina adopte una conformación “cerrada” incapaz de formar complejos SNARE. Se ha sugerido que esta región podría ser la responsable de dirigir las diferentes isoformas de sintaxina a su destino (Rowe y col., 2001), y que es esencial para la interacción de sintaxina con otras proteínas como Munc18-1 (apartado 3.4.1) (Hata y col., 1993; Kee y col., 1995) y las diferentes isoformas de Munc13 (apartado 3.4.2) (Betz y col., 1997). Además, el dominio N-term también contiene una zona de unión, calcio dependiente, al dominio C2A de sinaptotagmina I (apartado 3.4.4) cuya función posiblemente sea de regulación de la neurotransmisión (Shao y col., 1997).

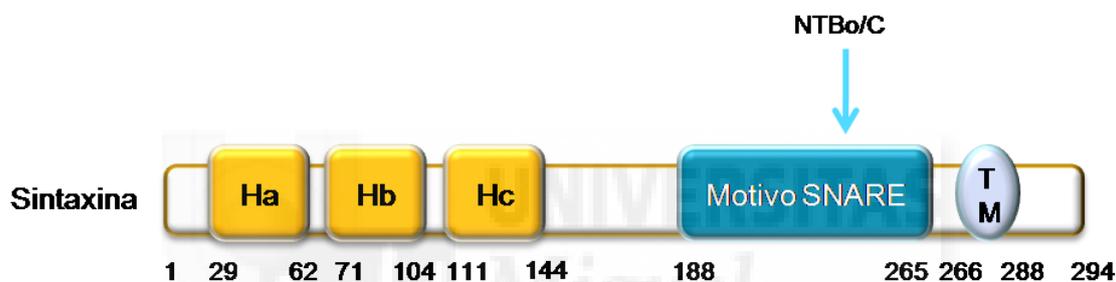


Figura 5. Estructura de sintaxina neuronal

En la imagen se encuentra representada sintaxina 1A desde el extremo N-term al extremo C-term. En la región N-term de la proteína se encuentra el dominio Habc y en la región C-term se encuentran el motivo SNARE y la región transmembrana (TM). También se puede apreciar el sitio de corte de la toxina botulínica C1 (Lys²⁵³-Ala²⁵⁴). Imagen adaptada de Mc New y colaboradores (McNew y col., 1999).

Al igual que ocurría con VAMP y SNAP-25, sintaxina es susceptible de ser proteolizada por las neurotoxinas botulínicas, concretamente por la NTBo/C1 (Figura 5), que también proteoliza a SNAP-25 (Figura 4) (Blasi y col., 1993 b; Foran y col., 1996). En células cromafines un tratamiento con esta toxina inhibe completamente la secreción, indicando la implicación de sintaxina en los últimos pasos de la exocitosis (Xu y col., 1998). En la figura 5 se ha representado el sitio de corte de esta toxina (Lys²⁵³-Ala²⁵⁴).

SINTAXINA	CROMOSOMA	CÉLULA (LOCALIZACIÓN)	TEJIDO	FUNCIÓN
Sintaxina 1A	7q11.23	Mb. plasmática presináptica	Neuronal y células secretoras	Exocitosis neuronal y secreción regulada
Sintaxina 1B	16p11.2	Mb. plasmática presináptica	Neuronal y células secretoras	Exocitosis neuronal y secreción regulada
Sintaxina 2	7	Mb. plasmática	ubicuo	Exocitosis: morforegulador durante el desarrollo
Sintaxina 3	11cen-11q12.3	Mb. plasmática	Ubicuo	Exocitosis
Sintaxina 4	16p13,13-16p12,3	Mb. plasmática	Ubicuo	Traslación de Glut4
Sintaxina 5	11cen-11q12.1	RE-AG	Ubicuo	Trasporte entre RE-AG
Sintaxina 6	1	Trans-Golgi	Ubicuo	Transporte AG-endosomas; Transporte endosoma- AG; Fusión de vesículas secretoras inmaduras
Sintaxina 7	6	Endosoma	Ubicuo	Fusión de endosoma tardío; Fusión endosoma-lisosoma
Sintaxina 8	17p12	Endosoma	Ubicuo	Fusión de endosoma tardío
Sintaxina 10	19p13.2	Trans-Golgi	Ubicuo	?
Sintaxina 11	6q23.1-6q25.3	Trans-Golgi; endosoma tardío	Ubicuo	?
Sintaxina 12/13	1	Endosoma	Ubicuo	Reciclaje de Proteínas de Superficie; Fusión endosoma temprano
Sintaxina 16	20p11.23-20p11.21	Golgi/trans-Golgi	Ubicuo	Endosoma temprano- transporte trans-Golgi
Sintaxina 17	?	RE liso	Tejidos Esteroides	Trafico a través del RE liso
Sintaxina 18	4	RE	?	Transporte ente RE-AG; Trasporte en RE

Tabla 2. Información genética, funcional y celular de las diferentes sintaxinas encontradas en mamíferos

La localización cromosómica indicada en la tabla corresponde a cromosomas humanos y está basada en información del Centro Nacional de Biotecnología.

3.2.- Estructura del complejo SNARE

La cristalización del complejo SNARE neuronal (Sutton y col., 1998) reveló una estructura de cuatro hélices α entrelazadas (Ybe y col., 2000; Figura 6 A). Esta estructura está formada por un motivo SNARE de VAMP-2, otro de sintaxina 1A y dos de SNAP-25b, donde las cadenas de cada uno de ellos se alinean en paralelo con las regiones transmembrana emergiendo desde el extremo carboxi-terminal (Lin y Scheller, 1997).

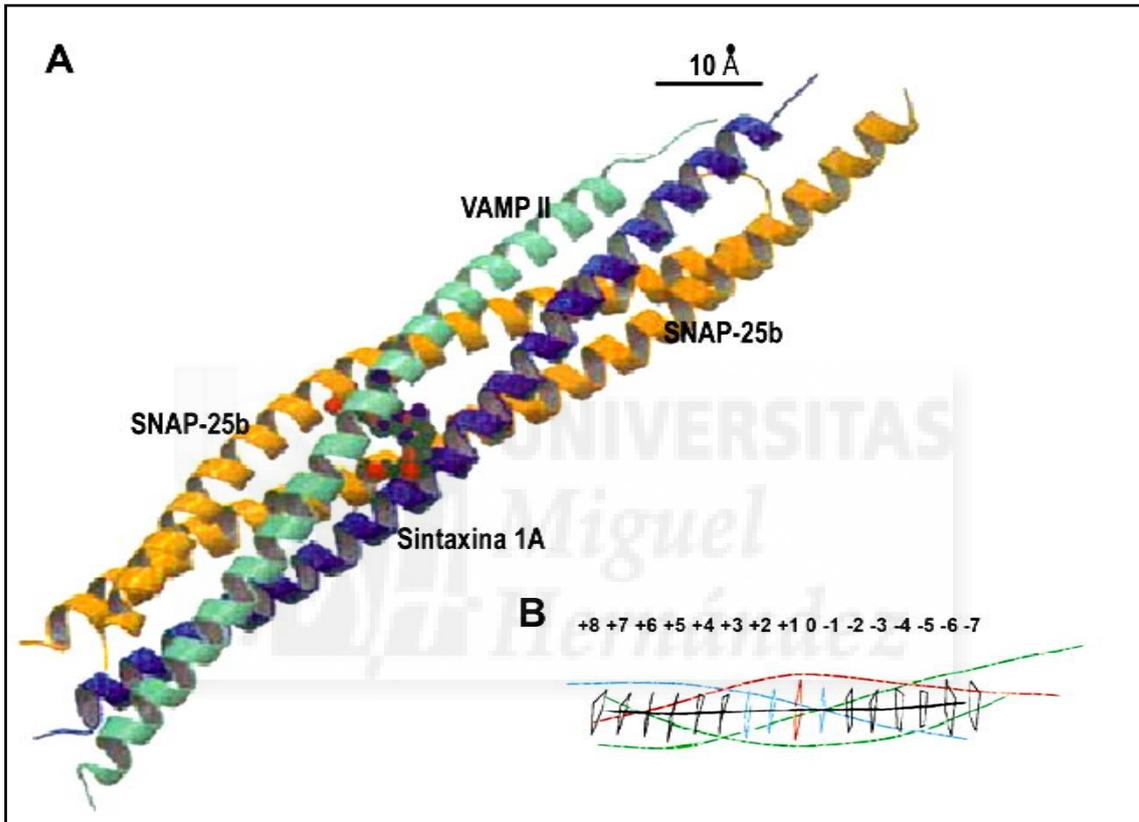


Figura 6. Estructura del complejo SNARE neuronal

A.- Para la formación del complejo SNARE neuronal, SNAP-25b (naranja) contribuye con dos hélices α mientras que VAMP-2 (verde) y sintaxina 1A (azul) contribuyen con una hélice α cada una. Imagen adaptada de Ybe y colaboradores (Ybe y col., 2000). B.- Representación de las 16 capas perpendiculares a los ejes del haz que forman los aminoácidos de las distintas hélices que interactúan entre ellas. Imagen adaptada de Sutton y colaboradores (Sutton y col., 1998).

Las cuatro hélices α , que forman el dominio central del complejo SNARE, interaccionan entre ellas a través de aminoácidos formando 16 capas perpendiculares a los ejes del haz. Estas capas, numeradas de la -7 a la +8, están formadas en su mayoría por aminoácidos hidrofóbicos, sobre todo las capas del centro del complejo, -1, +1 y +2, que presentan una geometría similar a las estructuras denominadas “cremalleras de leucina” (Figura 6 B). Sin embargo, en el centro justo de estas capas hidrofóbicas hay una capa iónica, la capa 0, que contiene tres residuos de glutamina ('Q') procedentes del motivo SNARE de syntaxina y de los dos motivos SNARE de SNAP-25, y un residuo de arginina ('R') procedente del motivo SNARE de sinaptobrevina (Sutton y col., 1998). Esta capa es de gran importancia porque los grupos guanidino cargados positivamente del residuo de arginina interaccionan con los grupos carboxilo de cada uno de los residuos de glutamina, mientras que las capas flanqueantes actúan como un sello hermético para el agua, de forma que protegen a los residuos de la capa 0 de las interacciones iónicas con el solvente. Además, este sello podría estabilizar el estado oligomérico de las 4 hélices α disminuyendo la constante dieléctrica local de manera que aumentaría la interacción electrostática con las capas iónicas. Si una proteína como α -SNAP o NSF (apartado 3.3) penetrase en este sello, la capa iónica quedaría expuesta al solvente incrementando la constante dieléctrica local y debilitando las interacciones entre las hélices, pudiendo este proceso facilitar el desensamblaje del complejo.

Debido a los residuos de arginina o glutamina de la capa 0, las proteínas SNARE también pueden ser clasificadas como Q- y R-SNAREs (Fasshauer y col., 1998). Según esta clasificación, SNAP-25 y syntaxina serían Q-SNAREs y sinaptobrevina R-SNARE. Posteriormente, las Q-SNAREs han sido clasificadas como Qa (syntaxina), Qb (N-term SNAP-25) y Qc-SNAREs (C-term SNAP-25) basándose en la secuencia de aminoácidos del motivo SNARE (Bock y col., 2001).

En ensayos *in vivo*, cuando las proteínas v- y t-SNAREs se encuentran ancladas a membranas fosfolípicas, se ha observado que el complejo SNARE puede estar bien en conformación cis, donde todas las proteínas del complejo están en la misma membrana, o en conformación trans, con las proteínas del complejo localizándose en membranas opuestas. Un complejo en conformación cis probablemente se parezca más a los complejos obtenidos *in vitro*, ya que en conformación trans las proteínas interaccionan entre ellas débil o parcialmente a causa de la resistencia creada por las membranas. Es por ello que la estructura *in vivo* del complejo es un tema que todavía no se ha resuelto.

3.3.- Disociación del complejo SNARE. Proteínas NSF y SNAP

Un complejo SNARE en conformación cis es altamente estable y para disociarlo es necesario someterlo a temperaturas superiores a los 80°C (Hayashi y col., 1994). Por ello, las células han desarrollado un sistema especial para disociar este complejo mediante la hidrólisis del ATP (Söllner y col., 1993 a). Las proteínas implicadas en este proceso son α -SNAP y NSF.

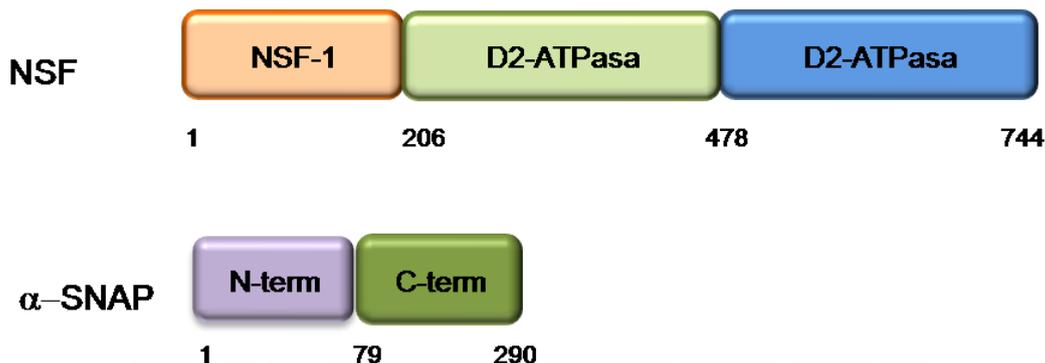


Figura 7. Estructura de NSF y α -SNAP

En la imagen se ha representado a NSF y α -SNAP desde el extremo N-term al extremo C-term. En la zona N-term de NSF (NSF-1) se encuentra el lugar de unión con la región C-term de α -SNAP. También se han representado los dominios D1 y D2 de NSF y la región N-term de α -SNAP. Imagen adaptada de Ybe y colaboradores (Ybe y col., 2000).

El desensamblaje del complejo SNARE se produce a través de la ATPasa homohexamérica NSF. Cada subunidad de NSF tiene un dominio N-term requerido para interactuar con α -SNAP (NSF-1) y dos dominios ATPasa AAA⁺, D1 y D2 (Figura 7), con distintas funciones (Whiteheart y col., 2001). La hidrólisis del ATP tiene lugar en el dominio D1 (Tagaya y col., 1993; Morgan y col., 1994; Whiteheart y col., 1994), mientras que la función del dominio D2, catalíticamente inactivo, es mediar la hexamerización de NSF (Lenzen y col., 1998). Estos dominios se estructuran de forma que el complejo SNARE queda en el interior del hexámero unido al dominio N-term de 3 proteínas α -SNAP (Hanson y col., 1997; Hohl y col., 1998; Whiteheart y col., 2001). α -SNAP, no sólo une NSF al complejo SNARE sino que también estimula la actividad ATPasa del dominio D1 (Haynes y col., 1998; Matveeva y Whiteheart, 1998; Steel y Morgan, 1998), función esencial para el desensamblaje del complejo (Barnard y col., 1997). Se piensa que los cambios conformacionales sufridos por NSF durante la hidrólisis del ATP se ven traducidos, vía α -SNAP, en un desenrollamiento de las 4 hélices del complejo SNARE. Aunque no está claro como se inicia el proceso de desensamblaje del complejo, parece

ser que el residuo Q conservado en syntaxina es esencial, sugiriendo que la hidratación del centro del complejo (capa 0) por NSF/ α -SNAP podría ser el mecanismo que iniciase el proceso (Scales y col., 2001).

Las proteínas NSF y SNAP, aunque se unen preferentemente al complejo SNARE, también se pueden asociar con menor afinidad a syntaxina y SNAP-25 de manera individual pero no a VAMP u otras SNARE (Hanson y col., 1995; Hayashi y col., 1995).

A pesar de la gran aceptación de este modelo, la disociación del complejo SNARE no es la única función de la proteína NSF. En los últimos años, se ha visto que NSF se une a diferentes receptores como el AMPA (Nishimune y col., 1998), el β_2 adrenérgico (Cong y col., 2001), el de la proteína inhibidora β -arrestina (McDonald y col., 1999) y el GABA_A (Kittler y col., 2001). Estos hechos parecen indicar una segunda función de NSF en un principio no relacionada con la maquinaria SNARE.

3.4.- Proteínas reguladoras del complejo SNARE

Mediante ensayos *in vitro* se ha observado que una v-SNARE localizada en la membrana de un lisosoma se asocia con una t-SNARE localizada en otra membrana diferente sugiriendo una especificidad en cuanto a la fusión (Parlati y col., 2000). Sin embargo, en estudios *in vivo* se ha visto que las proteínas SNARE por si solas no parecen ser las responsables de la alta especificidad de fusión, ya que algunas de estas proteínas participan en más de un proceso de fusión del transporte de membranas. De acuerdo con esto, Fasshauer y colaboradores (Fasshauer y col., 1999) observaron que complejos afines compartían las mismas propiedades biofísicas, sugiriendo que la especificidad del tráfico de membranas no era debida únicamente a la especificidad del emparejamiento entre las SNARE. Una gran diversidad de estudios parecen indicar que la célula requiere factores adicionales al complejo SNARE para regular el nivel de especificidad necesario para el tráfico vesicular; además, estos factores podrían prevenir las interacciones no productivas entre diferentes SNARE. De la misma forma, otros mecanismos deberán mediar las interacciones específicas para conferir una regulación tanto espacial como temporal al contacto y fusión de las membranas, de forma que la membrana diana a la que se fusionen las vesículas sea la adecuada.

A continuación, se describen de manera resumida algunas de las principales proteínas reguladoras del complejo SNARE.

3.4.1.- Sec1/Munc18; Proteínas SM

Hasta el momento se han identificado siete miembros de esta familia de proteínas denominada SM que son: Munc18-1, Munc18-2, Munc18-3, VPS33A, VPS33B, VPS45 y SLY1. La expresión de Munc18-1 es más abundante en células neuronales y endocrinas y se encuentra envuelta en la transmisión sináptica (Hata y col., 1993; Pevsner y col., 1994), mientras que la de Munc18-2 y 3 tiene una distribución más ubicua (Hata y Südhof., 1995; Halachmi y col., 1996). VPS33A y B actúan en la ruta endocitótica y VPS45 y SLY1 se encuentran envueltas en el tráfico cis-trans Golgi (Rizo y Südhof, 2002; Gallwitz y Jahn, 2003).

Se sabe que syntaxina 1A se asocia con Munc18-1 en la membrana plasmática de las células cromafines (Haynes y col., 1999) pero el papel que desempeña esta proteína no está del todo claro. Algunos autores apoyan un papel opuesto de esta proteína en la secreción (Pevsner y col., 1994; Yang y col., 2000), ya que su unión a syntaxina 1A impediría la formación del complejo SNARE, mientras que otros apoyan un papel facilitador de esta proteína en cuanto al atraque y la fusión de las vesículas (Fisher y col., 2001; Voets y col., 2001; Toonen y col., 2006). Por otro lado, también se ha propuesto que Munc18 tendría un papel indirecto en la exocitosis, ya que sería fundamental para el tráfico de syntaxina 1A hacia la membrana plasmática (Rowe y col., 1999 y 2001).

3.4.2.- Munc13/Unc-13

Hasta el momento se han identificado cuatro miembros de esta familia que son: Munc13-1, Munc13-2, Munc13-3 y Munc13-4. Se cree que Munc13-1/2 podrían facilitar la disociación de Munc18-1 y Syntaxina 1A; de esta forma, facilitaría la formación del completo t-SNARE para la correcta asociación con VAMP (Betz y col., 1997; Südhof, 2004). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en las células neuronales, los niveles de expresión de Munc13 en las células cromafines son muy bajos y se ha visto que ratones deficientes para esta proteína no tienen afectada la secreción; sin embargo, su sobre-expresión sí que aumenta considerablemente la secreción en estas células (Stevens y col., 2005).

3.4.3.- Complexinas

Las complexinas I y II son proteínas pequeñas de 134 aminoácidos. Se ha sugerido que estabilizan el complejo SNARE regulando los últimos pasos de la secreción (Chen y col., 2002).

3.4.4.- Sinaptotagminas

Las sinaptotagminas son una familia de proteínas de membrana presentes en orgánulos intracelulares. Estructuralmente, se encuentran orientadas con la región N-term en el lumen de las vesículas y la C-term en el citoplasma celular. La región C-term está formada por dos dominios de unión a Ca^{2+} dispuestos en tándem denominados C2A y C2B (Figura 8) (Brose y col., 1992; Fernández y col., 2001). Estos dominios están conectados por un lazo que varía entre 7 y 9 aminoácidos dependiendo de la isoforma (Sutton y col., 1999). Cada dominio une Ca^{2+} vía cinco aminoácidos conservados que residen en dos lazos flexibles (Sutton y col., 1995; Fernández y col., 2001). Bajo la unión del calcio, estos lazos penetran parcialmente en bicapas lipídicas que contienen fosfolípidos, en particular fosfatidilserina y PIP_2 (Chapman y Davis, 1998; Davis y col., 1999; Bai y col., 2002; Südhof, 2004; Bai y col., 2004 a).

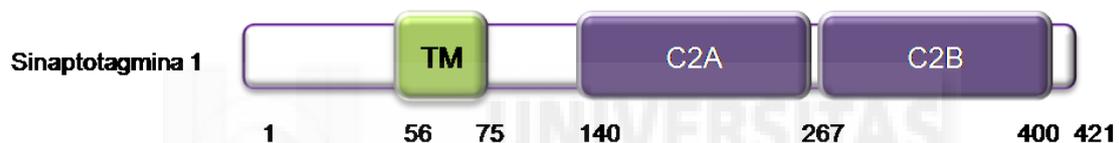


Figura 8. Estructura de sinaptotagmina 1

En la imagen se ha representado sinaptotagmina 1 desde el extremo N-term al extremo C-term. En la zona N-term se encuentra el dominio transmembrana (TM), responsable del anclaje de sinaptotagmina a las vesículas. En la zona C-term se pueden apreciar los dos dominios de unión a calcio, C₂A y C₂B. Imagen adaptada de Ybe y colaboradores (Ybe y col., 2000).

Hasta el momento, se han identificado 16 isoformas en vertebrados (Craxton, 2004) que han sido clasificadas en 3 grupos de acuerdo con sus propiedades cinéticas (Hui y col., 2005). Sinaptotagmina 1 y 2 han sido identificadas como sensores de calcio de la exocitosis regulada, estando su expresión restringida a las vesículas sinápticas y endocrinas (Perin y col., 1990; DiAntonio y col., 1993 b; Geppert y col., 1994; Fernández-Chacón y col., 2001; Südhof, 2002). Lo poco que se conoce de las otras isoformas es que la mayoría de ellas se co-expresan con sinaptotagmina 1 y 2 y se encuentran conservadas evolutivamente (Butz y col., 1999; Sugita y col., 2001). Por otro lado, las isoformas 3 y 7 se localizan en la membrana plasmática de las células y se cree que funcionan como sensores de calcio complementarios a las isoformas 1 y 2 (Butz y col., 1999; Sugita y col., 2001).

¿De qué manera estas proteínas regulan a las proteínas SNARE? Muchos trabajos apuntan una interacción dependiente de calcio entre sinaptotagmina 1 y las proteínas SNARE. Concretamente, la región C-term de SNAP-25 interacciona con la región citoplasmática de sinaptotagmina (Gerona y col., 2000; Lynch y col., 2007) y se ha visto que mutaciones en esa región de SNAP-25 tienen como consecuencia una disminución de la secreción (Gil y col., 1998; Xu y col., 1998; Criado y col., 1999; Gil y col., 2002; Zhang y col., 2002). Además, no se sabe si dicha interacción interfiere en etapas finales de la secreción, regulando el poro de fusión (Wang y col., 2001; Zhang y col., 2002; Bai y col., 2004 b), o si está mediando etapas más tempranas del proceso exocitótico como el atraque de las vesículas a la membrana plasmática (Chieregatti y col., 2002), o ambas. Experimentos en los que se llevó a cabo la reconstrucción *in vitro* de las proteínas SNARE sin sinaptotagmina, se vio un atraque rápido de las vesículas seguido de una transición lenta a la fusión vesicular (Weber y col., 1998), mientras que la adición de sinaptotagmina aceleró el proceso de fusión (Tucker y col., 2004).

3.4.5.- Proteínas Rab y efectores

Las proteínas Rab son una subfamilia dentro de un gran grupo de proteínas pequeñas denominadas G (proteínas de unión a nucleótidos de guanina; GTP/GDP). Estas proteínas se unen a diversos efectores, Rab-efectores, que han sido implicados en la regulación de la actividad de las proteínas SNARE, determinando la calidad de la interacción de dichas proteínas, así como en la movilidad y el atraque de las vesículas (González, Jr. y Scheller, 1999).

De manera conjunta al ciclo de las proteínas SNARE, las proteínas Rab sufren un ciclo de interacción con la membrana plasmática y con diferentes proteínas. Estas proteínas son modificadas post-transcripcionalmente de forma que dicha modificación permite la asociación de la proteína a la membrana cuando se encuentra unida a GTP (Figura 9), es decir, en su forma activa. Cuando el GTP es hidrolizado, la proteína Rab se disocia de la membrana dando lugar a un intermediario citosólico, Rab-GDP, que se une a un inhibidor del intercambio GDP/GTP de manera que la proteína Rab no puede ser activada antes de tiempo. Este inhibidor se denomina GDI (del inglés: "GDP-dissociation inhibitor"). Cuando se forman nuevas vesículas Rab-GDP es reciclado por la actuación de un segundo factor denominado GDF (del inglés: "GDI dissociation factor") el cual desplaza a GDI. Cuando Rab se une a la membrana de la vesícula un intercambiador de nucleótidos de guanina, GEF (del inglés: "guanidine nucleotide exchange factor"), intercambia el GDP por GTP activando de esta manera a la proteína Rab y permitiendo su unión a diferentes Rab-efectores. La interacción de la proteína Rab con diferentes efectores

posiblemente está regulando que la vesícula interactúe con la membrana diana apropiada y que ambas membranas se fusionen correctamente.

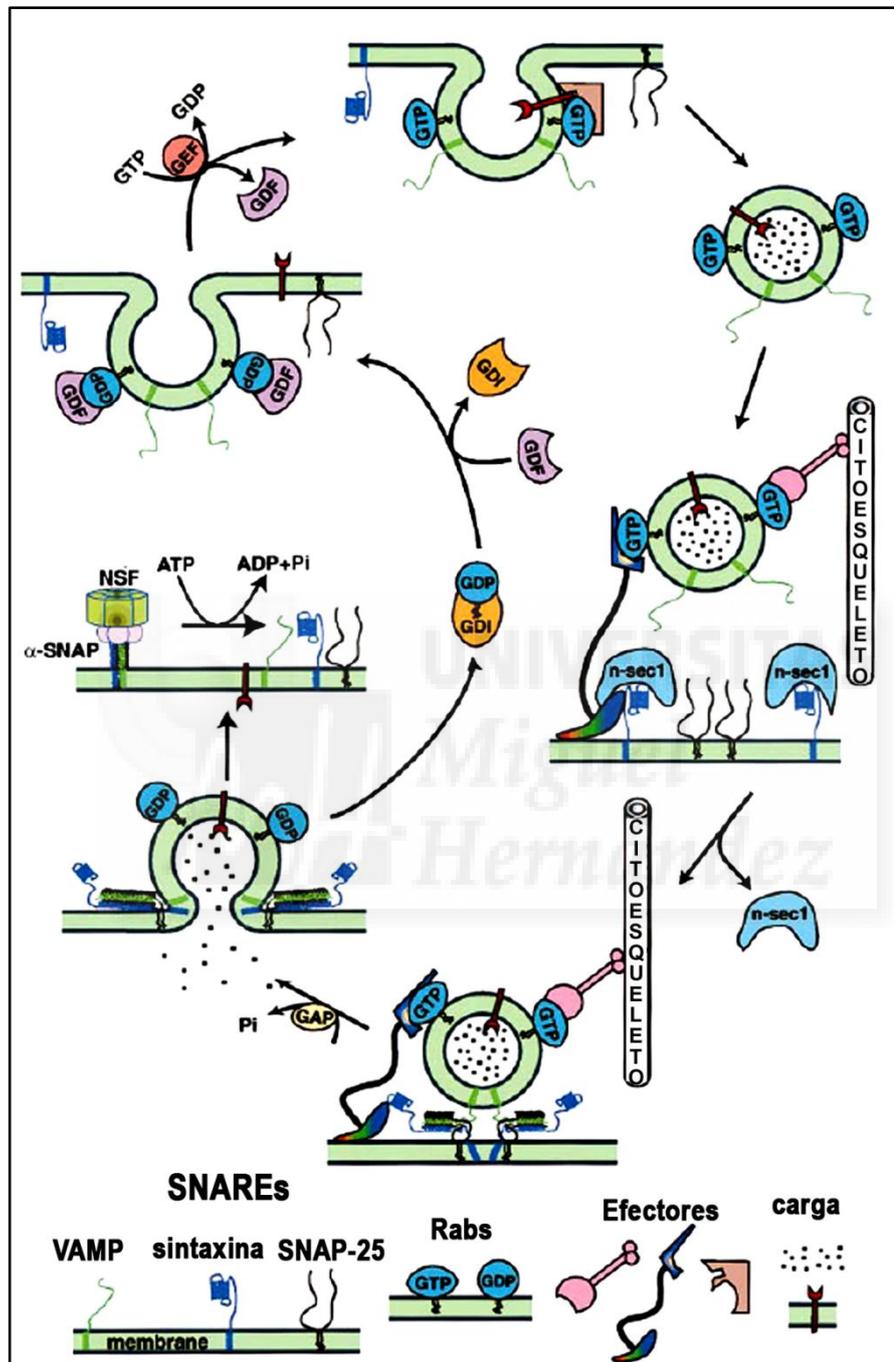


Figura 9. Modelo representativo del acoplamiento entre proteínas Rab y SNARE

La proteína Rab unida a GTP (Rab-GTP) puede interactuar con un conjunto de efectores, Rab-efectores, para llevar a cabo varias de las actividades propias del transporte de las vesículas hacia su membrana diana como la traslocación y el atraque. Una vez que la vesícula se ha atracado en el lugar donde se va a producir la fusión, las proteínas Rab-efectores podrían liberar a las proteínas SNARE de otros reguladores para que se diese la fusión. Después de la fusión, el complejo SNARE reclutará a las proteínas NSF y α-SNAP. Tras la hidrólisis de ATP por NSF, las proteínas SNARE quedarán libres para participar en un nuevo ciclo de fusión de membranas. Imagen adaptada de González y Scheller (González, Jr. y Scheller, 1999).

3.4.6.- Sinaptofisina

La sinaptofisina es una glicoproteína que posee cuatro dominios transmembrana. Al ser una de las proteínas más abundantes de la membrana de las vesículas se convierte en una de las más abundantes del sistema nervioso. Se ha visto que su asociación con VAMP-2 inhibe la capacidad de interacción de esta proteína con las t-SNARE (Khvotchev y Südhof, 2004; Südhof, 2004; Valtorta y col., 2004), pero de momento su papel no está del todo claro, ya que en ratones deficientes para esta proteína no se han encontrado defectos en la transmisión sináptica (McMahon y col., 1996).

También se han visto implicadas en la regulación de la secreción otras proteínas entre las que cabe destacar: calmodulina, que es una proteína que une calcio; GATE16/GABARAP/MAP-LC3/Apg8, que actúan sobre proteínas SNARE a nivel del aparato de Golgi; tomosina, que es una proteína muy abundante en el cerebro y se cree que ayuda a syntaxina 1A a disociarse de Munc18-1 y las proteínas NSF y SNAPs (Gerst, 2003).

Por otro lado, se han identificado un gran número de enzimas envueltos en el metabolismo de los lípidos como reguladores o moduladores de la transmisión sináptica (Rohrbough y Broadie, 2005). Además, estudios recientes también dan un papel importante a ciertos ácidos grasos como omega-3 y omega-6 como reguladores de estas proteínas a través de su interacción con syntaxina (Rickman y Davletov, 2005; Darios y Davletov, 2006).

3.5.- Mecanismo de fusión basado en las proteínas SNARE

La hipótesis SNARE ha dado origen a una gran proliferación de trabajos encaminados a esclarecer las bases moleculares del proceso neurosecretor. La función de cada una de las proteínas involucradas en la cascada del complejo de fusión, así como su regulación, no están del todo claras, sobre todo considerando que continuamente se descubren nuevas proteínas consideradas "esenciales" para la secreción y nuevas funciones para las proteínas descritas hasta ese momento. A la confusión general contribuyen las proteínas con varios nombres, por el hecho de haber sido descubiertas en especies o células diferentes, y las proteínas que se sabe que forman parte de la maquinaria de fusión exocitótica pero que todavía no se conoce su función. Teniendo en cuenta el grado de complejidad existente, se ha elegido uno de los modelos principales para facilitar la comprensión del papel funcional de las principales proteínas del complejo.

El modelo, resumido en la figura 10, postula que sintaxina 1A se encuentra inicialmente en conformación cerrada asociada a la proteína n-sec1, también denominada Munc18-1. Las proteínas reguladoras Rab podrían mediar la unión de la vesícula al citoesqueleto y a la membrana diana y facilitar la disociación de Munc18-1 y sintaxina 1A, permitiendo la unión, de manera secuencial, de las tres proteínas SNARE en un proceso denominado “nucleación”. Las proteínas SNARE se van a asociar cerrando su unión en forma de cremallera, acercando y poniendo en contacto las membranas que se van a fusionar, dando lugar a la formación del complejo SNARE trans. Este proceso, denominado en inglés “zippering”, está inducido por el calcio en los casos de secreción regulada. La energía liberada por la formación del complejo, extremadamente estable, va a permitir la fusión de las membranas y por lo tanto la liberación del contenido vesicular (Lin y Scheller, 1997). Después de la fusión, las proteínas citoplasmáticas α -SNAP y NSF se asociarán al complejo SNARE en conformación cis y tras la hidrólisis de ATP se disociará el complejo. De esta manera, las proteínas SNARE quedarán libres y podrán participar en un nuevo ciclo de fusión de membranas (Chen y Scheller, 2001).

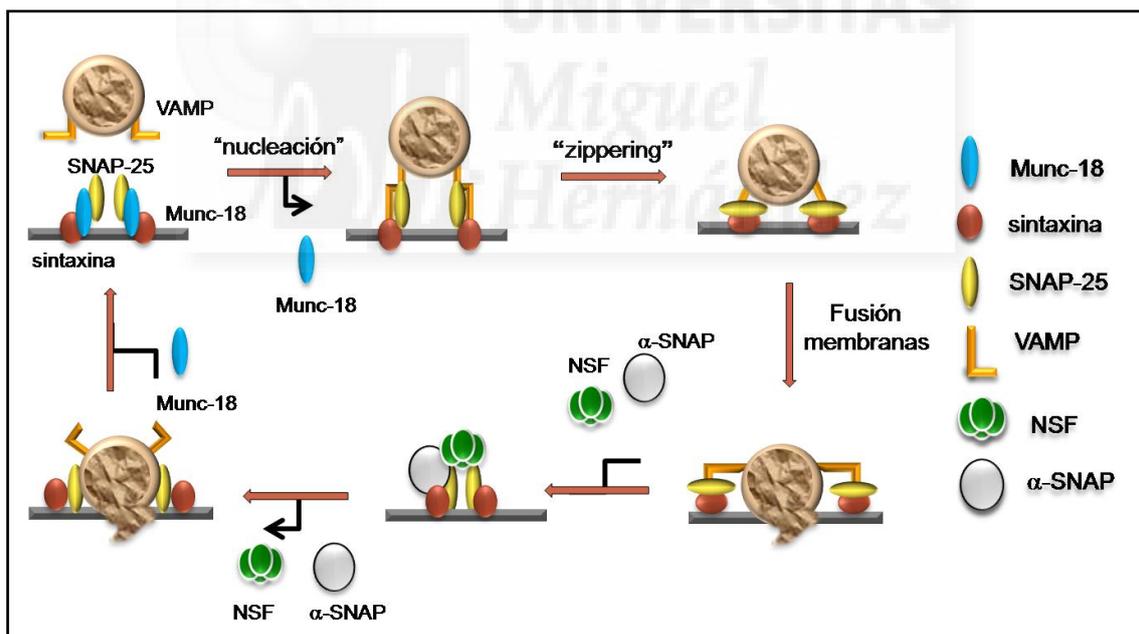


Figura 10. Mecanismo molecular de la exocitosis vesicular

Sintaxina (sintaxina 1A) se une a n-sec1 (Munc18-1) antes de la formación inicial del complejo. Rab facilitará la disociación de n-sec1 y sintaxina permitiendo la unión de las tres proteínas SNARE (nucleación). Para simplificar únicamente se ha representado un dominio “coiled coil” de SNAP-25. Las proteínas SNARE se asociarán cerrando su unión en forma de cremallera, acercando así las membranas que se van a fusionar y poniéndolas en contacto. El calcio es el desencadenante de este proceso. Después de la fusión, el complejo SNARE reclutará a las proteínas solubles NSF y α -SNAP. Tras la hidrólisis de ATP por NSF se disociará el complejo y las proteínas SNARE quedarán libres para participar en un nuevo ciclo de fusión de membranas. Imagen adaptada de Chen y Scheller (Chen y Scheller, 2001).

4.- Determinantes de la ubicación focal de la exocitosis en las células cromafines

Estudios de microscopía electrónica revelaron que las neuronas poseen regiones especializadas en sus membranas presinápticas, denominadas zonas activas, donde las vesículas se acumulan y preparan para el proceso de fusión (Couteaux y Pecot-Dechavassine, 1970). Posteriormente, se vio que estas zonas eran ricas en agrupaciones de canales de calcio (Pumplin y col., 1981) y que se encontraban tanto en dendritas (Guthrie y col., 1991; Muller y Connor, 1991) como en terminales nerviosos (Llinas y col., 1992). Estas observaciones, junto con la idea de que la secreción de las vesículas sinápticas se producía debido a la elevación de la concentración del calcio intracelular (Artalejo y col., 1994; Wheeler y col., 1994; Hirning y col., 1988), llevaron a la hipótesis de que en las neuronas las zonas de entrada de calcio, denominadas puntos calientes (del inglés: "hot spots"), colocalizaban con las zonas donde se producía la secreción o zonas activas.

Mediante la técnica de amperometría, Schroeder y colaboradores establecieron que las células cromafines, al igual que las neuronas, secretaban catecolaminas en zonas restringidas de la membrana plasmática (Schroeder y col., 1994). Posteriormente, se demostró que en estas células las zonas de entrada de calcio también colocalizaban con las zonas de secreción (Robinson y col., 1995 y 1996), lo que suponía que los CCDV y las zonas de secreción, al igual que en las neuronas, no se organizaban al azar. Otros estudios en estas células utilizando el compuesto FM1-43 y anticuerpos específicos contra la enzima dopamina β -hidroxilasa, que como veremos más adelante es un excelente marcador de exocitosis, apoyaban estos datos ya que mostraban colocalización entre agrupaciones de CCDV y zonas de secreción (Cuchillo-Ibañez y col., 1999).

Sin embargo, y a pesar de todos estos resultados, existen diferencias entre la secreción hormonal de las células neuroendocrinas aisladas y la secreción de neurotransmisores por las vesículas sinápticas en las sinapsis neuronales. Por ejemplo, en las células neurosecretoras existe una demora de tiempo significativa entre la despolarización dependiente de calcio y la repuesta secretora que no respalda la idea de una unión tan estrecha entre los CCDV y las zonas de secreción como ocurre en las neuronas. Las constantes de tiempo para la exocitosis varían notablemente entre ambos tipos celulares siendo de entre 0,2-1,2 ms para las neuronas, 20-200 ms para las células PC12 (línea tumoral derivada de células cromafines) y 150-1000 ms para las cromafines (Kasai, 1999). Esta demora, en el caso de las vesículas que se encuentran atrapadas, es atribuida al tiempo que tarda el calcio en difundir desde la zona de entrada en la

célula hasta la zona donde se encuentran las vesículas o zona de secreción (Chow y col., 1992, 1994 y 1996; Klingauf y Neher, 1997), siendo esto indicativo de que dichas vesículas puede que se encuentren atracadas a cierta distancia de los sitios de entrada del calcio. De hecho, varios estudios empleando técnicas amperométricas (Chow y col., 1994), medidas de capacitancia (Zhou y Mislser, 1995) y estimaciones matemáticas (Klingauf y Neher, 1997), llegaron a la conclusión de que en este tipo de células los CCDV y las zonas de secreción se encuentran a una distancia aproximada de unos 300 nm.

Ya que la distribución espacial de los eventos de secreción en áreas discretas de la membrana plasmática sí es una consecuencia directa de la localización de las proteínas que median los procesos de fusión, es decir, de las proteínas SNARE (Söllner y col., 1993 b), se planteó la cuestión no sólo de la proximidad de los CCDV a las zonas de secreción, sino también de si dichos canales mantienen una unión física con las proteínas SNARE estableciendo una regulación entre la entrada de calcio y la modulación de los procesos de secreción.

Las primeras evidencias de la colocalización en neuronas entre los canales de calcio y la maquinaria molecular de la exocitosis fueron obtenidas bioquímicamente a partir de la co-inmunoprecipitación de CCDV de tipo N y P/Q con sinaptotagmina 1 y syntaxina 1A (Saisu y col., 1991; Bennett y col., 1992; Leveque y col., 1992; Yoshida y col., 1992; Leveque y col., 1994; Martin-Moutot y col., 1996; Charvin y col., 1997).

Análisis detallados de la interacción entre ambos tipos de proteínas mediante la utilización de proteínas recombinantes, revelaron que las subunidades α_{1A} y α_{1B} contienen un sitio de interacción con proteínas sinápticas en el lazo citoplasmático que une los segmentos transmembrana II y III (L_{II-III}) denominado "synprint" (del inglés: "synaptic protein interaction site") (Sheng y col., 1994 y 1996; Rettig y col., 1996; Catterall, 1999). Estos ensayos *in vitro* demostraron una unión específica entre el sitio "synprint" de la subunidad α_{1B} de los CCDV de tipo N ($Ca_v2.2$; aminoácidos 718-963) con syntaxina 1A y SNAP-25 (Sheng y col., 1994 y 1996; Rettig y col., 1996; Catterall, 1999). Por otro lado, se han descrito múltiples isoformas de la subunidad α_{1A} de los CCDV de tipo P/Q mediante secuenciación del ADNc y análisis con anticuerpos específicos de secuencia (Mori y col., 1991; Starr y col., 1991; Zhang y col., 1993; Sakurai y col., 1995; Rettig y col., 1996). El análisis de la secuencia de aminoácidos de dos de estas isoformas, BI (Mori y col., 1991) y rbA (Starr y col., 1991), mostró una baja homología entre los L_{II-III} (78 %) comparado con el resto de la proteína (98 %), sugiriendo que el sitio "synprint" de ambas proteínas está sujeto a un procesamiento alternativo del transcrito primario (Rettig y col., 1996). Los ensayos *in vitro* demostraron una unión específica entre el sitio "synprint" ($Ca_v2.1$;

aminoácidos 722-1036) de la isoforma BI con syntaxina 1A y SNAP-25, mientras que el de la isoforma rbA únicamente se unía a SNAP-25 (Catterall, 1999; Rettig y col., 1996).

Si estas interacciones son requeridas para un acoplamiento entre la entrada de calcio y la fusión de las vesículas, esto implicaría que las neuronas podrían estar modulando la eficacia de la transmisión sináptica mediante la regulación de la expresión de las diferentes isoformas de la subunidad α_{1A} (Sheng y col., 1998). Acorde con esta idea se ha visto que las isoformas BI y rbA se distribuyen de manera diferente en el cerebro de rata (Sakurai y col., 1995). Además, se sabe que el sitio "synprint" de la isoforma BI de la subunidad α_{1A} y el de la subunidad α_{1B} se unen a la misma zona de syntaxina 1A y SNAP-25 (Rettig y col., 1996), por lo que parece estar claro que la expresión de una isoforma u otra, o de un subtipo de canal u otro, provee las bases moleculares del acoplamiento entre los CCDV de la neuronas con las vesículas atracadas y la maquinaria de fusión exocitótica, estableciendo una asociación estructural y funcional entre los sitios de entrada de calcio y las zonas donde se va a producir la secreción en este tipo de células.

En cuanto a los CCDV de tipo L y R parece ser que carecen del sitio "synprint" y que el L_{II-III} no se asocia ni con syntaxina 1A ni con SNAP-25 *in vitro* (Sheng y col., 1994; Rettig y col., 1996; Pereverzev y col., 2002), aunque si se ha visto que el L_{II-III} de la subunidad α_{1C} (Ca_v1.2; aminoácidos 753-893) se une a ambas t-SNARE (Wiser y col., 1999).

El mismo tipo de estudios han mostrado una interacción entre sinaptotagmina I con sitios "synprint" de CCDV de tipo N y P/Q (Charvin y col., 1997; Sheng y col., 1997), y que ambos "synprint" compiten por la unión a esta proteína. Además, la unión de sinaptotagmina al sitio "synprint" de la subunidad α_{1B} previene la unión a este sitio de syntaxina 1A, sugiriendo una unión secuencial de estas proteínas a este tipo de canales (Sheng y col., 1997).

El significado fisiológico de la interacción de las proteínas SNARE con los CCDV *in vivo* no se conoce todavía. Algunos autores apuntan a que dicha interacción sirve para que colocalicen los sensores de calcio, las proteínas SNARE y las zonas de entrada de calcio de manera que se incremente la eficacia de la transmisión sináptica (Mochida y col., 1996; Rettig y col., 1997). Otros argumentan que, además de organizar las vesículas que se van a atracar cerca de las zonas de entrada de calcio, dicha interacción modula la actividad de los CCDV (Bezprozvanny y col., 1995; Zhong y col., 1999; Bergsman y Tsien, 2000; Jarvis y col., 2002; Keith y col., 2007). Por otro lado, también se piensa que dicha interacción sirve para dirigir canales recién sintetizados a zonas concretas de la membrana plasmática (Mochida y col., 2003).

En cuanto a las células neurosecretoras, si los CCDV y las zonas de secreción se encuentran a una distancia aproximada de unos 300 nm, parece improbable que exista una unión física entre estos y las proteínas SNARE. Sin embargo, existen trabajos que apuntan una interacción directa entre algunas isoformas de la subunidad α_{1A} y SNAP-25 (Gil y col., 2001; Andrés-Mateos y col., 2005). Una posible explicación a esto, ya que a estas distancias de separación es más que improbable una interacción, podría ser que la proximidad entre los CCDV y las zonas de secreción dependiera del subtipo del canal, y en este sentido algunos trabajos realizados en células cromafines bovinas apoyan un mayor grado de acoplamiento entre las vesículas y los CCDV de tipo P/Q si se compara con otros subtipos de canales de calcio como los de tipo L (Lara y col., 1998; Gil y col., 2001). En células cromafines de ratón también se ha visto un mayor acoplamiento entre los CCDV de tipo P/Q y las vesículas (Álvarez y col., 2007).

En conclusión, parece ser que en las neuronas si existe un acoplamiento molecular entre los CCDV y la maquinaria exocitótica (Rettig y Neher, 2002) que no está tan claro en las células neurosecretoras (Atlas, 2001; Augustine, 2001; Barg y col., 2001). Por otro lado, la mayoría de los resultados obtenidos de la caracterización molecular de las zonas de secreción en células neurosecretoras han sido obtenidos en células en cultivo y sin embargo, en rodajas de tejido cuya organización es, en principio, la más importante a nivel fisiológico no se han realizado estudios relevantes. Teniendo en cuenta que las células al ser puestas en cultivo sufren cambios profundos en su fenotipo, es difícil extrapolar los datos obtenidos al tejido o al animal intacto y de ahí la necesidad de estudiar lo que ocurre en rodajas de médula adrenal.

Tal y como se verá en el apartado de resultados, en nuestros estudios hemos encontrado diferencias significativas en cuanto al tipo de CCDV y su cercanía a las zonas de secreción si se analizan células cromafines en cultivo o rodajas de medula adrenal (López y col., 2007).





Objetivos

OBJETIVOS

Esta tesis doctoral pretende contribuir al conocimiento de la organización molecular de las zonas de secreción en un modelo neuroendocrino. Para este propósito, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1.- Investigar cuantitativamente si son los dominios de proteínas SNARE, o los canales de calcio dependientes de voltaje, o ambos tipos de proteínas, los que definen las zonas de secreción en las células cromafines. Para ello, hemos utilizado dos tipos de preparaciones: células cromafines en cultivo y rodajas de médula adrenal, ambos bovinos. Los objetivos particulares de este apartado son los siguientes:

- Analizar las zonas de secreción en la membrana plasmática de las células cromafines y su relación con las proteínas SNARE sintaxina 1A y SNAP-25.
- Estudiar la formación de microdominios de proteínas SNARE en la membrana plasmática de estas células.
- Estudiar la ubicación de moduladores de las proteínas SNARE como Munc18-1.
- Estudiar la relación entre las proteínas SNARE y los diferentes tipos de canales de calcio regulados por voltaje.

2.- Investigar en células cromafines bovinas en cultivo la influencia que ejercen las proteínas SNARE en cuanto a la movilidad y la fusión de las vesículas cromafines. Los objetivos particulares de este apartado son los siguientes:

- Estudiar las características dinámicas de los microdominios de proteínas SNARE.
- Estudiar cómo afecta la dinámica de los microdominios SNARE a la dinámica de las vesículas cromafines.
- Estudiar como afecta un aumento en la concentración del calcio intracelular a la movilidad de los microdominios SNARE.
- Estudiar cómo afecta la dinámica de los microdominios SNARE a la fusión de las vesículas cromafines.
- Buscar un modelo molecular que trate de integrar las funciones observadas en las proteínas SNARE y su relación con las vesículas cromafines.





Materiales y Métodos

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 Alicante (Girocer S.L., Ctra. Elche S/N, Alicante) de terneras recién sacrificadas. Para su transporte, se sumergieron en un bote esterilizado con medio Locke sin Ca^{2+} y Mg^{2+} frío (154 mM de NaCl, 5.58 mM de KCl, 3.6 mM de NaHCO_3 , 5.6 mM de glucosa, 5 mM de 4-(2-hidroxietil) 1-piperazina-etanosulfónico (HEPES) (Sigma, Madrid, cat#: H-3375), tamponado a 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 (TA) 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 0,25 % de colagenasa tipo A (Roche Diagnostic, Barcelona, ref: 1108879300), 0,01% de ADNasa I (Sigma, Madrid, cat# D4527) en tampón Locke con 0,5 % de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, Madrid, cat# A-4503). Esta solución se inyectó en volúmenes de 5 ml por glándula durante 15 minutos (min.) 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, USA) a 850 r.p.m (100xg) (Beckman Coulter, CA, USA) durante 10 min. para limpiar 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, ref: 17-0891-01) 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 min. 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 de 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) (Beckman Coulter) durante 10 min. 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, cat#: D-7777). Por último, se realizó el recuento y estudio de la viabilidad celular por el método de exclusión con azul de Tripán (Sigma, Madrid, cat#: 93595), 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).

1.1.6.- 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, cat#: DE 14-801F), 10 μM de Citosina β -D-Arabinósido (Sigma, Madrid, cat#: C-1768) y de 5-fluoro-2'-deoxiuridina (Sigma, Madrid, Cat# F-0503) (inhibidores del crecimiento de fibroblastos), penicilina 50 U/ml y estreptomina 25 $\mu\text{g/ml}$ (Sigma, Madrid, cat#: P-4458). A continuación, se sembraron en cristales circulares de 25 mm de diámetro. Los cristales, antes de ser depositados en placas costar (Corning Incorporated) de 35 mm, se

esterilizaron y trataron con poli-L-lisina (Sigma, Madrid, cat#: P-6282) durante 15 min. 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, Cat#: A-7816).

1.2.- Preparación de rodajas de médula adrenal

Se prepararon rodajas de médula adrenal bovina según un método modificado basado en el descrito para preparar rodajas de páncreas (Speier y Rupnik, 2003).

1.2.1.- Obtención y preparación del tejido

Las glándulas adrenales bovinas fueron obtenidas del matadero municipal de Alicante y desprovistas del tejido adiposo tal y como ha sido descrito con anterioridad (apartado 1.1.1). Posteriormente, se disecó la médula de la corteza y se cortó en pequeños cubos que se embebieron en agarosa de bajo punto de fusión al 4 % de concentración (Tipo VII-A, Sigma, Madrid, cat#: A0701).

1.2.2.- Proceso del corte

Cuando se solidificó el agar, se cortó la médula en rodajas finas de 180 µm a una frecuencia de 6 Hz con un Vibrátomo (Leica VT 1000S) siempre entre 4°C y 10°C de temperatura en solución BBS (125 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl; 26 mM de NaHCO₃, 1.25 mM de NaH₂PO₄H₂O, D-Glucosa 10mM) con una concentración de calcio y magnesio baja (MgCl₂ 0.1 mM; CaCl 0.1 mM). Esta solución se burbujeó continuamente con carbógeno (95 % O₂; 5 % CO₂) para su estabilización a pH neutro. Los cortes se realizaron a baja temperatura para minimizar el daño por anoxia y mejorar la textura del tejido para el corte.

1.2.3.- Incubación de las rodajas

Según se fueron obteniendo las rodajas, se transfirieron a una cámara consistente en una malla de nylon colocada en el interior de un vaso que contenía BBS (125 mM de NaCl, 2.5 mM de KCl; 26 mM de NaHCO₃, 1.25 mM de NaH₂PO₄H₂O, D-Glucosa 10 mM) con calcio y magnesio a concentraciones fisiológicas (MgCl₂ 10 mM; CaCl 2 mM) y bajo continuo burbujeo con

carbógeno. Se mantuvieron en esta solución entre 20 y 30 min. para su correcta oxigenación. Pasado este tiempo, se procedió a su fijación, permeabilización e incubación con diferentes anticuerpos, tal y como se describe en los apartados 2.2 y 2.3, y se guardaron en tampón fosfato salino (PBS: 171 mM NaCl, 3.35 mM KCl, 8.7 mM Na₂HPO₄, 1.8 KH₂PO₄, ajustado a pH 7.2) a 4°C hasta el momento de su montaje y visualización mediante microscopía confocal.

1.2.4.- Montaje de las rodajas en la cámara de registro

Las rodajas se montaron en cristales circulares de 25 mm de diámetro para su visualización mediante microscopía confocal.

Para mejorar la adherencia de las rodajas al cristal, se trataron los cristales durante unos minutos con una solución de alumbre de cromo al 0.1 % y gelatina al 1 % en agua destilada y posteriormente se secaron a TA. Una vez secos, se depositó la rodaja encima del cristal y se dejó el tiempo suficiente para que se adhiriese a él pero previniendo su deshidratación. Para la visualización de las rodajas mediante microscopía confocal se colocaron los cristales en una cámara Attofluor® Cell Chamber.

2.- Microscopía confocal en células cromafines en cultivo y rodajas de médula adrenal

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 ($\lambda = 458 \text{ nm}; 488 \text{ nm}; 515 \text{ nm}/10 \text{ mW}$) y otro de Helio/Neón ($\lambda = 543 \text{ nm}; 633 \text{ nm}/10 \text{ mW}$). Cada láser está equipado con filtros de densidad neutra para controlar su intensidad y están guiados por una única fibra óptica. La unidad de escaneo, basado en la tecnología de espejos galvanométricos en ambos ejes, desarrolla velocidades de escaneo de un segundo (s) para regiones de 256 x 256 píxeles y de 10.835 s para regiones de 2048 x 2048 píxeles en el modo normal. En el modo de escaneo rápido, bidireccional, el escaneo puede llegar a ser de 0.25 s 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 escaneo 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.

2.1.- Inmunocitoquímica en células fijadas

El método utilizado para fijar, permeabilizar, e incubar las células cromafines bovinas en cultivo con diferentes anticuerpos fue básicamente el descrito por Lazarides en 1976 con pequeñas modificaciones (Lazarides, 1976).

Primero, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 % en solución PBS durante 20 min. en agitación constante. A continuación, se retiró el paraformaldehído y se añadió una solución de Triton X-100 (Sigma, Madrid, cat#: X-100) al 0,2 % y formaldehído al 3,6 % en PBS durante 10 min. Posteriormente, se realizó un lavado con PBS durante 10 min., seguido de dos incubaciones de 10 min. con una solución compuesta por BSA al 1% en PBS. Por último, se realizó un único lavado con PBS y se incubaron las células con los anticuerpos primarios pertinentes durante toda la noche a 4°C en agitación constante. Al día siguiente, se realizaron 4 lavados de PBS de 10 min. y se incubaron las células con los anticuerpos secundarios pertinentes durante dos horas a TA. En el caso de los experimentos de doble marcaje, los anticuerpos primarios se incubaron juntos pero los secundarios se añadieron de manera secuencial, es decir, primero se añadió un anticuerpo secundario durante 2h seguido de 4 lavados de 10 min. con PBS y luego se añadió el otro durante otras 2h seguido de otros 4 lavados. Las células se guardaron en PBS a 4°C hasta el momento de su visualización mediante microscopía confocal.

2.2.- Inmunohistoquímica en rodajas de tejido

El protocolo utilizado para fijar, permeabilizar, e incubar las rodajas de tejido con diferentes anticuerpos fue el mismo que el utilizado en células en cultivo (apartado 2.1) salvo pequeñas modificaciones; las rodajas se incubaron con paraformaldehído al 4 % en solución PBS durante 25 min. y con Triton X-100 al 0,2 % y formaldehído al 3,6 % en PBS durante 15 min.

Una vez incubadas con los anticuerpos pertinentes, se guardaron en PBS a 4°C hasta el momento de su montaje (apartado 1.2.4) y visualización mediante microscopía confocal.

2.3.-Inmunocitoquímica e Inmunohistoquímica en células vivas

El protocolo utilizado para marcar la proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa (DBH) fue el mismo para ambos tipos de preparaciones, células en cultivo y rodajas de médula adrenal.

Primero, se realizó un lavado con Krebs/Hepes (K/H) basal durante 5 min (NaCl 134 mM; KCl 4.7 mM; KH_2PO_4 1.2 mM; MgCl_2 1.2 mM; CaCl_2 2.5 mM; glucosa 11 mM; HEPES 15 mM, tamponado a pH 7.4). Posteriormente, se estimuló la exocitosis mediante despolarización celular. Para ello, se incubaron ambos tipos de preparaciones con un medio K/H alto potasio durante 5 min (KCl 59 mM, equilibrado isosmóticamente con NaCl). Trascurrido ese tiempo, se incubaron con un medio K/H basal sin calcio durante 3 min. en frío para evitar la endocitosis. A continuación, se incubaron con un anticuerpo contra la DBH en K/H basal durante 2 h. Por último, se realizó un lavado con PBS de 10 min. y se procedió a fijar, permeabilizar e incubar con un segundo anticuerpo primario y los secundarios pertinentes tal y como ha sido descrito con anterioridad (apartados 2.1 y 2.2).

2.4.- Anticuerpos utilizados

Los anticuerpos primarios se utilizaron a una dilución 1:200 con excepción del anticuerpo contra la DBH que se utilizó a 1:500 y contra la proteína Na^+/K^+ ATPasa a 1:100. Los anticuerpos secundarios se utilizaron a una dilución 1:200.

2.4.1.- Anticuerpos primarios:

- Anti-SNAP25. Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo que reconoce las isoformas a y b de SNAP-25. Este anticuerpo nos fue cedido por el laboratorio del Dr. Bazbek Davletov (Rickman y col., 2004 b).
- Anti-SNAP-25 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz. CA, USA, sc-7538). Anticuerpo policlonal desarrollado en cabra que reconoce las isoformas a y b de SNAP-25.
- Anti-syntaxina 1A. Anticuerpo desarrollado en pollo que reconoce específicamente la isoforma 1A de syntaxina. Este anticuerpo nos fue cedido por el laboratorio del Dr. Bazbek Davletov (Rickman y col., 2004 b).
- Anti- Na^+/K^+ ATPasa (Biomol International, PA USA, SA-247). Anticuerpo monoclonal desarrollado en ratón que reconoce ~110 kDa de la subunidad α -3 de la proteína Na^+/K^+ ATPasa.

- Anti-Munc18-1 (Sigma, Madrid cat#: M 2694). Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo que reconoce específicamente la isoforma Munc18-1.
- Anticuerpo contra CCDV de tipo P/Q (anti-Ca_v2.1). (Alomone labs, Jerusalén, Israel, cat#: ACC-001). Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo que reconoce los residuos 865-881 de la subunidad α_{1A} de CCDV de cerebro de rata (Starr y col., 1991).
- Anticuerpo contra CCDV de tipo L (anti-Ca_v1.3) (Alomone labs, Jerusalén, Israel (cat#: ACC-005). Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo que reconoce los residuos 809-825 de la subunidad α_{1D} de CCDV de cerebro de rata (Hui y col., 1991).
- Anticuerpo contra CCDV de tipo N (anti-Ca_v2.2) (Alomone labs, Jerusalén, Israel, cat#: ACC-002). Anticuerpo policlonal desarrollado en conejo que reconoce los residuos 851-867 de la subunidad α_{1B} de CCDV de cerebro de rata (Westenbroek y col., 1992).
- Anti-Dopamina β -hidroxilasa (Oncogene, Cambridge, UK. cat#: PC236L). Anticuerpo policlonal generado por repetidas inmunizaciones de conejos con la proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa purificada de médula adrenal bovina.

2.4.2.- Anticuerpos secundarios:

- Anti-IgG de cabra desarrollada en conejo conjugada con el fluoróforo Rodamina (5 (6)-carboxi-rodamina 101-N-hidroxisuccinimida ester) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA, sc-3945) (Abs 570 / Em 590).
- Anti-IgG de conejo desarrollada en cabra conjugada con el fluoróforo Cy2 (cianina) (Amersham LIFE SCIENCE, PA 42004) (Abs 489 / Em 506).
- Anti-IgG de conejo desarrollada en cabra conjugada con el fluoróforo TRITC (isocianato de tetrametilrodamina) (Sigma, Madrid cat#: T 5268) (Abs 544 / Em 572).
- Anti-IgG de ratón desarrollada en cabra conjugada con el fluoróforo FITC (isocianato de fluoresceína) (Sigma, Madrid cat#: F2012) (Abs 494 / Em 518).
- Anti-IgG de pollo desarrollada en conejo conjugada con el fluoróforo FITC (Sigma, Madrid cat#: T 8888).
- Anti-IgG de pollo desarrollada en conejo conjugada con el fluoróforo Rodamina (Chemicon, USA cat#: AP162R).

2.5.- 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 colocación, 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, pEGFP-C3-SNAP-25 Δ 9, pDsRed-C3-SNAP-25, pDsRed-C3-SNAP-25 Δ 9 y pEGFP-N1-VAMP-2

Para la generación de los constructos pEGFP-C3-SNAP-25, pEGFP-C3-SNAP-25 Δ 9, pDsRed-C3-SNAP-25 y pDsRed-C3-SNAP-25 Δ 9 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). La delección de los últimos 9 aminoácidos de SNAP-25 para generar los constructos pEGFP-C3-SNAP-25 Δ 9 y pDsRed-C3-SNAP-25 Δ 9 se realizó mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de un fragmento correspondiente a la región C-term de SNAP-25. Para ello, se utilizaron como molde los constructos pEGFP-C3-SNAP-25 y pDsRed-C3-SNAP-25 y como iniciador una secuencia que correspondía a los aminoácidos 80-86 de SNAP-25 (5'-AGATTTAGGGAAATGCTGTGG-3'). El DNA amplificado contenía un codón de parada y un sitio para BamHI hacia el final del extremo 3' además de un sitio interno para HindIII en el extremo 5'. Se utilizaron estas dos enzimas para sustituir la secuencia original de SNAP-25 por

la secuencia delecionada de SNAP-25 $\Delta 9$ y poder generar las construcciones pEGFP-C3-SNAP-25 $\Delta 9$ (Criado y col., 1999) y pDsRed-C3-SNAP-25 $\Delta 9$.

Para la generación del constructo pEGFP-N1-VAMP-2 se empleó el vector de expresión pEGFP-N1. Se amplificó la región codificante de VAMP-2 mediante PCR utilizando los cebadores: 5'-GCCGAATTCGCCCATGTCCGGCTACC-3' (sentido) y 5'-GCCGGATCCGAGC-TGAAGTA-AACGATGATG-3' (anti sentido). 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.- Generación de los constructos pHSVpuc-GFP-SNAP-25, pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 $\Delta 9$ y pHSVpuc-VAMP-2-GFP

Para la generación de los constructos pHSVpuc-EGFP-SNAP-25, pHSVpuc-EGFP-SNAP-25 $\Delta 9$, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 $\Delta 9$ y pHSVpuc-VAMP-2-EGFP, se digirieron las construcciones pEGFP-C3-SNAP-25, pEGFP-C3-SNAP-25 $\Delta 9$, pDsRed-C3-SNAP-25, pDsRed-C3-SNAP-25 $\Delta 9$ y pEGFP-N1-VAMP-2, previamente descritas en el apartado 3.1, con las enzimas NheI y BamHI e introdujeron en el vector plasmídico vírico pHSVpuc (Geller y col., 1993) cortado con las enzimas XbaI y BamHI (Gil y col., 2002). Este vector procede del virus Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1).

El vector resultante está promovido por el promotor IE 4/5 y su empaquetamiento y posterior amplificación se llevó a cabo por el método descrito en el apartado 4.2 (Lim y col., 1996).

3.3.- Preparación y análisis del ADN

3.3.1.- 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, cat#: 07-079), 170 mM de NaCl, 16 gr/L de Agar (Scharlau, Barcelona, cat#: 07-004)). 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 pre-inóculo, aislando una de las

colonias obtenidas. La preparación del pre-inóculo se realizó en un matraz con 50 ml de medio LB (10 gr/L de triptona, 5gr/L de extracto de levadura y 171 mM de NaCl tamponado a 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 pre-inóculo 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 min. en una centrifuga Beckman GS6 provista de un rotor JA-10. Se decantó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 50 ml de medio 0.1 M $CaCl_2$ estéril. Tras un nuevo lavado en las condiciones descritas, se recuperaron todos los precipitados obtenidos en un mismo volumen de $CaCl_2$ y se incubaron en hielo durante 30 min.

Finalmente, se recuperó el precipitado y se resuspendió en 15 ml de medio 0.1 M de $CaCl_2$ y 15 % de glicerol. Se realizaron alícuotas de 100 μ l y se congelaron a -80°C.

3.3.2.- Transformación de células competentes

Una vez descongeladas las células competentes en hielo, se mezcló 45 μ l de buffer de transformación (40 mM de $MgCl_2$ y 20 mM de $CaCl_2$), 5 μ l de ADN purificado y 25 μ l de bacterias competentes, se agitó la mezcla y se incubó durante 20 min. en hielo. Transcurrido este tiempo, se incubó otros 10 min. a TA. 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 min. con agitaciones periódicas.

Durante el transcurso de ese tiempo, se atemperó en la estufa dos placas Petri de 10 cm. de diámetro con agar y ampicilina (Sigma, Madrid, cat#: A-9518) a una concentración de 100 μ g/ml. Los vectores de trabajo, que en este caso se corresponden a los descritos en el apartado 3.2, son resistentes a ampicilina debido a que el plásmido pHSVpuc contiene el gen que les confiere resistencia a ese antibiótico. Pasados los 60 min., se centrifugaron las bacterias a 5.000 r.p.m. (2.300xg) durante 2 min. en una microcentrífuga de mesa, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 150 μ l de medio LB.

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

3.3.3.- 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 100 μ g/ml de ampicilina. 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 ml restante se guardó en la nevera para utilizarlo si el chequeo resultaba positivo, apartado 3.3.8.

3.3.4.- Purificación del ADN a pequeña escala

Se centrifugaron los 2 ml recuperados durante 30 s a 8.000 r.p.m. (5.900xg) en una microcentrífuga de mesa para precipitar las bacterias. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 150 μ l de medio TE 1x (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA tamponado a pH 7.7). Posteriormente, se añadió 150 μ l de solución de lisis (0,2 M NaOH, 1 % SDS (Sigma, Madrid, cat#: L-4509)) y se agitó suavemente un par de veces. A continuación, se añadió 150 μ l de solución de neutralización fría (3 M acetato potásico / 5 M ácido acético). Después, se añadió 75 μ l de una mezcla fenol/cloroformo (25:24) y se agitó vigorosamente con la ayuda del vortex. A continuación, se centrifugó durante 4 min. a 13.200 r.p.m (16.000xg) y transcurrido ese tiempo, se recogieron 400 μ L de sobrenadante que se añadieron a 200 μ l de isopropanol previamente preparados en un tubo Eppendorf estéril. Se volvió a centrifugar durante 4 min. a 13.200 r.p.m., se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con 400 μ l de etanol al 96 % (v/v). Finalmente, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 30 μ l de medio TE/ARNasa (10 mg/ml de ARNasa en medio TE 1x).

3.3.5.- Cuantificación del ADN

La cuantificación del ADN se realizó mediante un espectrofotómetro (Beckman DU 7500). 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 A_{260}/A_{280} 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.

3.3.6.- Digestión del ADN con endonucleasas de restricción

El ADN se digirió 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 μ l y la cantidad de ADN del orden de 1 μ g en todos los casos.

3.3.7.- Electroforesis del ADN

Se utilizaron geles de agarosa en tampón TAE 1x a concentraciones del 1 % (p/v) y se añadió una concentración final de bromuro de etidio de 0.5 μ g/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 Alphamager 2200™ (Alpha Innotech Corporation, San Francisco, CA).

3.3.8.- Amplificación y purificación del ADN a mayor escala

Una vez chequeado el ADN obtenido se dispuso a amplificarlo y a purificarlo. Para ello, se utilizó un kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen Inc., MD, USA).

Se utilizó el ml guardado (apartado 3.3.3) de la colonia positiva y se inoculó en 5 ml de medio LB con ampicilina a una concentración de 100 μ g/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 ampicilina (100 μ g/ml) y se incubó a 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, se centrifugó (Beckman, coulter) 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 min. a 4°C. A continuación, se descartó el sobrenadante y se dejó secar el precipitado a TA. Una vez seco, se resuspendió en 10 ml de tampón P1 (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml de ARNasa A tamponado a pH 8) a razón de 5 ml por bote y la solución resultante se traspasó a 2 tubos Nalgene de 50 ml estériles.

Se añadió 10 ml de tampón P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS (p/v) a cada tubo Nalgene, se resuspendió la mezcla y se dejó incubar durante 5 min. a TA. Pasado este tiempo, se añadieron otros 10 ml de tampón P3 (3.0 M de acetato potásico tamponado a pH 5.5) a cada tubo, se homogeneizó y se incubó en hielo durante 15 min. Transcurridos los 15 min., 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 min.

Se recuperó el sobrenadante y se añadió a la columna del kit previamente equilibrada con 10 ml de tampón QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 % de isopropanol (v/v), 0.15 % Triton X-100 (v/v) tamponado a pH 7). Seguido a la elución del sobrenadante, se lavó la columna añadiendo 30 ml de tampón QC (1.0 M NaCl, 50 mM MOPS, 15 % de isopropanol (v/v) tamponado a 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 (1.25 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, 15 % de isopropanol (v/v) tamponado a pH 8.5). Una vez recuperado, se añadió 10.5 ml de isopropanol a TA y se centrifugó a 11.200 r.p.m (17.500xg) a 4°C durante 30 min. Al finalizar la centrifugación, se localizó el precipitado en el tubo, se descartó el sobrenadante y se añadió 5 ml de etanol al 70 %. Se volvió a centrifugar a 11.200 r.p.m a 4°C durante 10 min., se descartó el sobrenadante y se dejó secar TA durante unos 10 min. para eliminar todo el etanol. Por último, se añadió 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 3.3.5.

4.- La línea celular c 2.2

La línea celular c 2.2 es un subclon derivado de una línea celular de hígado de mono (*Cercopithecus aethiops*) llamada Vero establecida a partir de hígado de mono adulto normal (Yasamura y Kawakita, 1962). Las células c 2.2 son transfectados estables de dicha línea que expresan el gen ICP27. Esta línea, proporciona un modelo excelente para ser utilizada como huésped para la transfección de diferentes tipos de virus entre los que se encuentra el Virus del Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1). Las células con las que se trabajó fueron cedidas por la Dra. María Teresa Alonso de la Universidad de Valladolid.

4.1.- Técnicas generales de mantenimiento de la línea celular c 2.2

4.1.1.- Descongelación

Se descongeló una alícuota de células c 2.2, previamente congelada en nitrógeno líquido, en un baño de agua a 37°C y se resuspendió en 10 ml de PBS. A continuación, se centrifugó el resuspendido a 850 r.p.m (100xg) (Beckman Coulter) durante 3 min., se descartó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 5 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con un 10 % FBS y se sembró en frascos con rosca de 5 ml (Nalge Nunc International, NY, USA).

4.1.2.- Mantenimiento del stock

El stock se mantuvo siempre en DMEM 10 % de FBS en los frascos de 5 ml por debajo del 80 % de confluencia, haciendo subdivisiones dos o tres veces por semana. Las alícuotas descongeladas procedían de uno, dos o tres pases (o subdivisiones) a partir del original. No se realizaron más de ocho subdivisiones.

4.1.3.- Subdivisión (tripsinización)

Se eliminó el medio de las placas y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente, se añadió 0.5 ml de tripsina-EDTA (Sigma, Madrid, Cat#: T-3924) a los frascos de 5 ml y se incubó las células durante 2 min. en el incubador. Transcurrido ese tiempo, se añadió 3.5 ml de medio DMEM 10 % FBS para parar la actividad de la tripsina-EDTA.

4.1.4.- Recuento

Una vez tripsinizadas, se recogieron las células en tubos cónicos de 15 ml (Corning Incorporated) y se centrifugaron a 850 r.p.m (100xg) durante 3 min. Después, se diluyeron en 1 ml de DMEM 10 % FBS y se tomó una alícuota para realizar el recuento celular de la misma forma que se hizo con las células cromafines (apartado 1.1.5).

4.1.5.- Siembra

Las células se sembraron a varias densidades necesarias para la producción de virus (apartado 4.2):

- 250.000 células en 5 ml de DMEM 10 % FBS por frasco con rosca de 5 ml.
- 500.000 células en 3 ml de DMEM 10 % FBS por placa de 6 cm. de diámetro.
- 900.000 células en 4 ml de DMEM 10 % FBS por placa de 10 cm. de diámetro.

4.1.6.- Congelación.

Para reponer la alícuota descongelada, se resuspendieron células c 2.2 en un medio de congelación compuesto por FBS al 80 % y DMSO (Sigma, Madrid, cat#: D-8779) al 20 % a una concentración de 10^6 células/ml. El volumen total se repartió en alícuotas de 1 ml por criotubo de 1.5 ml (Bibby Sterilin, Stone, UK) y se congelaron durante 24 h a -70°C dentro de un bote de congelación gradual (disminución de 1°C por hora). A las 24 horas, se congelaron en nitrógeno líquido.

4.2.- Producción de virus

Para la producción de virus con los plásmidos de interés se siguió un método de transfección con lipofectamina (Invitrogen, Barcelona, Cat #: 18324-111) en células c 2.2 (Lim y al., 1996).

Para cada uno de los plásmidos de interés (apartado 3.2), se descongeló una alícuota de células c 2.2 que se sembraron en un frasco de 5 ml e incubaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5 % durante 2-3 días cambiando el medio de cultivo cada 24 horas.

Pasado este tiempo, y dependiendo del crecimiento celular, se tripsinizaron y sembraron en 2 frascos de 5 ml rotulados como A y B. Estas células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas a 37°C . A partir de este punto cada uno de los frascos se trató de manera diferencial.

El frasco A se utilizó para reponer la alícuota descongelada (congelación, apartado 4.1.6) y el B se utilizó para sembrar 1 placa de 6 cm. de diámetro y un frasco de 5 ml, rotulado como C, que sirvió para mantener células en cultivo necesarias en pasos posteriores.

A las 24 horas de la siembra de la placa de 6 cm., se procedió a transfectar las células mediante lipofectamina. El procedimiento detallado fue el siguiente:

- Se preparó un primer Eppendorf, "a", con 4 µg del plásmido vírico de interés diluido en 100 µl de DMEM.
- Se preparó un segundo Eppendorf, "b", con 12 µl de lipofectamina diluida en otros 100 µl de DMEM.
- Se añadió gota a gota el contenido del Eppendorf "a" en el Eppendorf "b", se agitó y se dejó incubar la mezcla durante 15 min. a TA. Finalmente, se añadió 800 µl de DMEM al Eppendorf "b" y se agitó hasta su homogeneización.
- Por último, la mezcla del Eppendorf "b" se añadió a la placa de 6 cm. procedente del frasco B y se incubaron las células durante 6 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se cambió el medio de cultivo a las células y se mantuvieron durante 24 horas a 37°C.

A las 24 h, se añadió 75 µl de virus HELPER a la placa y se incubaron las células con el virus durante 40 h. Al mismo tiempo, se cultivó otra placa de 6 cm. y 2 de 10 cm. de diámetro con las células procedentes del frasco C que habían sido mantenidas en cultivo.

Transcurridas las 40 horas, se procedió a la recogida del virus de la siguiente forma:

- Se rascó la placa con un rascador para recuperar las células infectadas y se transfirió el contenido de dicha placa a un tubo cónico de 15 ml.
- Después, se sometió a las células a tres procesos de congelación-descongelación. Cada uno de estos procesos consistía en introducir el tubo de 15 ml en un termo con hielo seco y etanol durante 5 min. y posteriormente en un baño de agua a 37°C durante otros 5 min.
- A continuación, las células se sometieron a un proceso de sonicación con la ayuda de un sonicador de baño de agua (Selecta Ultrason) durante 2 min. para obtener un lisado celular más eficiente. Para evitar el calentamiento de las muestras, se introducían los tubos en hielo durante 5 s cada 30 s de sonicación.
- Finalizada la sonicación, el lisado celular se centrifugó a 3.000 r.p.m (2000xg) (Beckman Coulter) durante 6 min. a 5°C en el rotor JS5.3 y se recuperó el sobrenadante que se mantuvo en hielo.

En este primer paso de recogida de virus, el sobrenadante fue añadido a la placa de 6 cm. previamente cultivadas procedente del frasco C y se incubaron las células con el virus durante 24 h.

Trascurridas las 24 h, se procedió a una segunda recogida de virus de la misma forma descrita pero, en esta ocasión, el sobrenadante se repartió en las dos placas de 10 cm. previamente cultivadas procedentes del frasco C. Las células de estas placas se incubaron con el virus durante 2 h y a continuación se suplementaron con 2,5 ml de medio OPTIMEN + Glutamax (Invitrogen, Barcelona, Cat#: 51985-026) 1 % BSA esterilizado y preparado en ese mismo momento. Se incubaron en este medio entre 40-48 h dependiendo del crecimiento celular.

Una vez transcurrido ese tiempo, los virus fueron recuperados, del mismo modo que en los procesos descritos con anterioridad, alicuotados y conservados a -70°C.

Este proceso se realizó para los plásmidos pHSVpuc-GFP-SNAP-25, pHSVpuc-GFP-SNAP-25 Δ 9, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25, pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 Δ 9 y pHSVpuc-VAMP-2-GFP previamente descritos en el apartado 3.2.

4.3.- Infección de las células cromafines

Se infectaron cultivos primarios de células cromafines bovinas con amplicones del HVS-1 (apartado 4.2) que contenían las construcciones descritas en el apartado 3.2.

La eficiencia de la infección se determinó mediante microscopía de fluorescencia usando diluciones sucesivas del virus purificado. Para ello, se plantaron 750.000 células cromafines en placas Costar de 35 mm de diámetro con 2 ml de medio de cultivo y se infectaron con volúmenes sucesivos de virus purificado (1 μ l, 5 μ l, 10 μ l, 15 μ l, hasta 50 μ l). A las 48 horas de la adición del virus, se visualizaron las células con un microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX71 con la ayuda de un objetivo 40x (N.A = 0.85). La excitación se realizó con una lámpara de mercurio y se utilizó el juego de filtros de emisión para la fluoresceína cuando se utilizaron las construcciones que contenían el gen reportero GFP y para la rodamina cuando se utilizaron las construcciones que contenían el gen reportero DsRed. Visualizando un campo amplio, se realizó el recuento del número de células que presentaban fluorescencia verde (GFP) o roja (DsRed) frente al número total de células que indicó la eficiencia de la infección. La dilución elegida para realizar los experimentos, que produjo una eficiencia de infección próxima al 35 %, fue de 35 μ l de virus purificado por 750.000 células. La fluorescencia de las proteínas GFP y DsRed se observó a partir del primer día de infección y persistió, por lo menos, hasta el tercer día. Todos

los experimentos se llevaron a cabo a las 48 h de la infección y se procuró que la eficiencia de la infección fuese entre el 20 y el 35 %. Para las dobles infecciones se utilizó el mismo protocolo con la salvedad de que se añadió a las células 35 μ l de cada uno de los virus utilizados.

5.- 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 11).

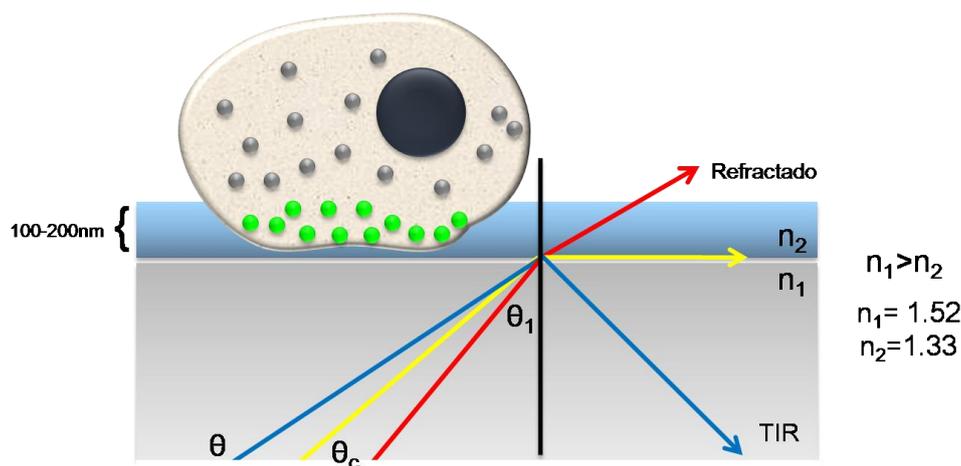


Figura 11. La técnica de TIRFM.

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.

$$1) \theta_c = \text{sen}^{-1} (n_2/n_1)$$

$$2) I = I_{(0)} e^{-z/d}$$

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

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).
- Visualización y espectroscopia de moléculas fluorescentes cerca de la membrana plasmática (Sako y col., 2000).
- Seguimiento de la trayectoria de vesículas individuales en células intactas antes y durante los procesos de secreción (Oheim y col., 1998 y 1999; Steyer y Almers, 1999; Oheim y Stuhmer, 2000 a; Schmoranzler y col., 2000; Johns y col., 2001; Lang y col., 2001; Steyer y Almers, 2001; Toomre y Manstein, 2001).
- Medidas de la cinética de unión de proteínas intra y extracelulares a los receptores de la superficie de la membrana. Muchos de estos estudios combinan la técnica de TIRFM con la técnica de FRAP (del inglés: "Fluorescence recovery after photobleaching") o recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado (Burghardt y Axelrod, 1981; Thompson y col., 1981).
- Seguimiento del desarrollo celular a lo largo del tiempo (Wang y Axelrod, 1994).

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 dual que permitió la observación de epifluorescencia convencional mediante la iluminación con una lámpara de mercurio, y la iluminación de luz evanescente mediante la introducción de un sistema láser Multi-Argón ($\lambda = 458 \text{ nm}$; 488 nm ; $515 \text{ nm}/10 \text{ mW}$) y/o Helio/Neón ($\lambda = 543 \text{ nm}$; $633 \text{ nm}/10 \text{ mW}$). Este sistema está dotado de un objetivo 60X de inmersión en aceite de alta apertura numérica ($A.N = 1.45$). El ángulo de incidencia de la luz sobre la muestra es seleccionado mediante un sistema (IX2-RFAEVA) que permite modificar el ángulo de incidencia del láser sobre la muestra. Es posible dividir la emisión de la fluorescencia con un sistema, Optosplit II (Cairn Research Ltd, Faversham, UK), equipado con un juego de filtros para GFP y para rodamina. Este sistema permite, mediante la utilización de una sola cámara, registrar al mismo tiempo imágenes que emiten a dos longitudes de onda diferentes. 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 ($d = 120 \pm 20 \text{ nm}$).

5.1.- Estudio de la movilidad de los microdominios formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ 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 SNAP-25 y SNAP-25 $\Delta 9$. 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 infectaron células cromafines en cultivo con los amplicones del virus Herpes Simplex tipo 1 (HVS-1) que contenían las construcciones pHSVpuc-GFP-SNAP-25 y pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ (Abs 488 / Em 508) (apartado 3.2). Las células se mantuvieron en cultivo durante 48 horas a 37°C para la correcta expresión de las construcciones (apartado 4.3).

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 5.3), el desplazamiento cuadrático medio o MSD (apartado 5.3), y el movimiento en el eje Z (apartado 5.4) de dichos parches.

5.2.- Estudio de la movilidad de las vesículas cromafines en células que sobre-expresan SNAP-25 y SNAP-25 $\Delta 9$

Para el marcaje de las vesículas cromafines se utilizó la sonda fluorescente lysotracker (Invitrogen, Barcelona, Lysotracker rojo: cat#: L7528; lysotracker verde: cat#: L7526). Esta sonda se utiliza para el marcaje y seguimiento de orgánulos ácidos entre los que se encuentran las vesículas cromafines. Básicamente, se trata de un fluoroforo ligado a una base débil, parcialmente protonada a pH neutro, que penetra de manera libre en el interior de orgánulos ácidos. Su mecanismo de retención no ha sido establecido pero es posible que envuelva su protonación y consecuente retención (Anderson y Orci, 1988).

Para estudiar el movimiento de las vesículas cromafines en las células que expresaban ambas construcciones SNARE, se infectaron células cromafines en cultivo (apartado 4.3) con amplicones del HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-GFP-SNAP-25 y pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ (apartado 3.2). A las 48 h de la infección, se incubaron las células con el marcador de vesículas ácidas lysotracker rojo (Abs 577 nm / Em 590 nm) a la concentración de 1 μ M durante 30 min. a TA en un medio K/H basal (Becherer y col., 2003) y se visualizaron mediante la técnica de TIRFM. Primero se utilizó un láser (Argón $\lambda = 488$) para visualizar la posición de las proteínas SNARE y se tomó una imagen. A continuación, se cambió el láser (Helio/Neón $\lambda = 543$) y el ángulo crítico para visualizar la posición de las vesículas y se tomó otra imagen. Por último, se adquirió una secuencia temporal de las vesículas de 60 s de duración (1 imag. /s). Se realizaron estudios de colocalización con las imágenes adquiridas y se analizó el movimiento en el eje X-Y (apartado 5.3), Z (apartado 5.4), y el MSD (apartado 5.3) únicamente de aquellas vesículas que colocalizaban con las proteínas SNARE.

Para estudiar si existía colocalización en el tiempo entre las proteínas SNARE y las vesículas cromafines, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 $\Delta 9$ (Abs 558 / Em 583) (apartado 3.2). A las 48 h de la infección, se incubaron las células con el marcador de vesículas ácidas lysotracker verde (Abs 504 / Em 583) a la concentración de 1 μ M durante 30 min. a TA en un medio K/H basal y se visualizaron mediante la técnica de TIRFM. Se tomaron

secuencias temporales (60 s, 1 imag. /s) simultáneas de las proteínas SNARE y las vesículas mediante la utilización de un solo láser (Argón $\lambda = 488$) y el separador de luz emitida Optosplit II.

5.3.- 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 s. 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):

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

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:

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

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.

5.4.- 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 s 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 5; 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:

$$1) I = I_{(0)} e^{-z/d}$$

Y despejando Z, tenemos:

$$2) Z = -d \ln(I/I_{(0)})$$

Donde: $d = 120$ nm (120 ± 20 nm para nuestro equipo, apartado 5 de la metodología), I es la fluorescencia máxima de la partícula e $I_{(0)}$ 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.

Para comprobar si las fluctuaciones observadas en el eje Z de los parches de expresión de la proteína SNARE alterada eran debidos a fluctuaciones de la membrana plasmática en lugar de al propio movimiento de la proteína, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían la construcción pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ (Abs 488 / Em 508). A las 48 h de la infección, se incubaron las células el compuesto FM 4-64 (Invitrogen, Barcelona, cat#: T13320) (Abs 558 / Em 734) a la concentración de 1 μM y se procedió rápidamente a su visualización mediante la técnica de TIRFM. Se tomaron secuencias temporales (60 s, 1 imag. /s) simultáneas de la proteína alterada y la membrana plasmática mediante la utilización de un solo láser (Argón $\lambda = 488$) y el separador de luz emitida Optosplit II. Se analizó la variación de intensidad en el máximo de fluorescencia con respecto al tiempo de los parches de expresión de la proteína alterada y la membrana plasmática asociada o en contacto directo con dichos parches.

El FM 4-64 es un compuesto lipófilo, no fluorescente en medio acuoso, que emite fluorescencia cuando se une a los lípidos de la cara externa de la membrana plasmática. Debido a que es un compuesto que se endocita rápidamente, los experimentos se realizaron dentro de los 10 min. posteriores a su adición para tener total seguridad de que se estaba viendo la membrana plasmática.

5.5.- Análisis del movimiento axial y lateral de los parches de expresión de la proteína alterada después de un aumento en la concentración de calcio intracelular

Para los experimentos en los que se aumentó la concentración del calcio intracelular, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían la construcción pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$. A las 48 h de la infección, se incubaron las células con un K/H basal y se adquirió, mediante la técnica de TIRFM, una secuencia temporal de 60 s de duración (1 imag. /s). A continuación, se cambió el K/H basal (CaCl_2 2 mM) por un K/H alto calcio (CaCl_2 10 mM) al que se le añadió el ionóforo ionomicina (Sigma, Madrid, cat#: I-3909) a la concentración de 5 μM . Las células se incubaron en este medio durante 5 min. y pasado ese tiempo se adquirió otra secuencia temporal de 60 s de duración (1 imag /s).

Se analizó el movimiento en el eje X-Y (apartado 5.3), Z (apartado 5.4), y el MSD (apartado 5.3) de los parches de expresión de la proteína alterada de ambas secuencias temporales.

Los ionóforos son compuestos químicos producidos por varias especies de *Streptomyces* que ayudan a determinados iones a atravesar la membrana celular. Se trata de pequeñas moléculas hidrofóbicas que se disuelven en la membrana plasmática lipídica y aumentan de esta forma la permeabilidad a determinados iones. Concretamente, la ionomicina (Liu y Hermann, 1978; Perlman y col., 1980) es un ionóforo carboxílico poliéter divalente de calcio ampliamente utilizado para aumentar la concentración de calcio intracelular.

6.- 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, Cat#: A1301). 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 que expresaban las proteínas SNARE, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 Δ 9 (Abs 558 / Em 583)

(apartado 3.2). A las 48 h de la infección, se incubaron las células con naranja de acridina $2 \mu\text{M}$ durante 15 min. a 37°C en un medio K/H basal. A continuación, se estimuló la exocitosis de estas células mediante despolarización celular con un medio K/H alto potasio (KCl 59 mM) aplicado directamente sobre la célula durante 60 s mediante un sistema de perfusión. Se tomaron secuencias temporales de esos 60 s de estimulación a la frecuencia de 1 imag. /20 ms. Para la adquisición simultánea de ambas imágenes, es decir, SNAREs / 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. Al mismo tiempo, en aquellas células en las que se expresaba la proteína alterada se calculó el porcentaje de vesículas altamente móviles que se fusionaban frente al porcentaje de vesículas fusionadas con una movilidad más moderada.

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 12), 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.

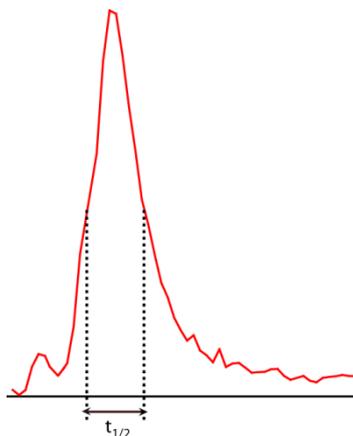


Figura 12. Ejemplo de una espiga generada por la fusión de una vesícula.

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 $t_{1/2}$.

7.- 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 SEM 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

RESULTADOS

1.- La proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa colocaliza con parches de syntaxina 1A y SNAP-25 después de la exocitosis en células cromafines bovinas en cultivo

Para estudiar la coincidencia espacial de la exocitosis con las proteínas SNARE, syntaxina 1A y SNAP-25, se realizaron experimentos de doble marcaje en células cromafines bovinas en cultivo (Figuras 13 y 14). El análisis de la posición de las fusiones vesiculares se realizó mediante el seguimiento de la proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa (DBH). Esta enzima se encuentra presente en la membrana de las vesículas cromafines y se incorpora a la membrana plasmática de la célula durante la exocitosis (Stewart y Klinman, 1988). Una manera exacta de localizar los puntos de secreción fue estimular la secreción de las células mediante despolarización con una solución de KCl 59 mM (K/H alto potasio) durante 5 min. y a continuación incubarlas con un anticuerpo contra la DBH durante 120 min. (Phillips y col., 1983; Patzak y col., 1984). Por último, se fijaron, permeabilizaron e incubaron con un segundo anticuerpo, bien contra syntaxina 1A (Figura 13) o contra SNAP-25 (Figura 14). El procedimiento detallado ha sido descrito en el apartado de materiales y métodos (apartado 2.3).

En la figura 13 puede observarse una célula aislada, desde un plano polar a otro más ecuatorial, estimulada con KCl 59 mM durante 5 min. Los anticuerpos primarios utilizados en este tipo de experimentos fueron contra syntaxina 1A (anti-syntaxina 1A desarrollada en pollo), que puede verse en verde en A, ya que se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con FITC (anti-IgG de pollo desarrollada en conejo), y contra la proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa (anti-DBH desarrollada en conejo), que puede verse en rojo en B, debido a que en este caso se utilizó un secundario conjugado con TRIC (anti IgG de conejo desarrollada en cabra). En C puede observarse la colocalización de ambas proteínas en la membrana plasmática de la célula gracias a la intensidad de la coloración amarilla, que es una consecuencia directa del buen emparejamiento de los píxeles de ambos canales, y en D la máscara de colocalización, píxeles con intensidades por encima del 50 % sobre el máximo de fluorescencia en ambos canales, que es otra manera más precisa de probar la coincidencia de ambas proteínas en la membrana plasmática de estas células cuando son estimuladas.

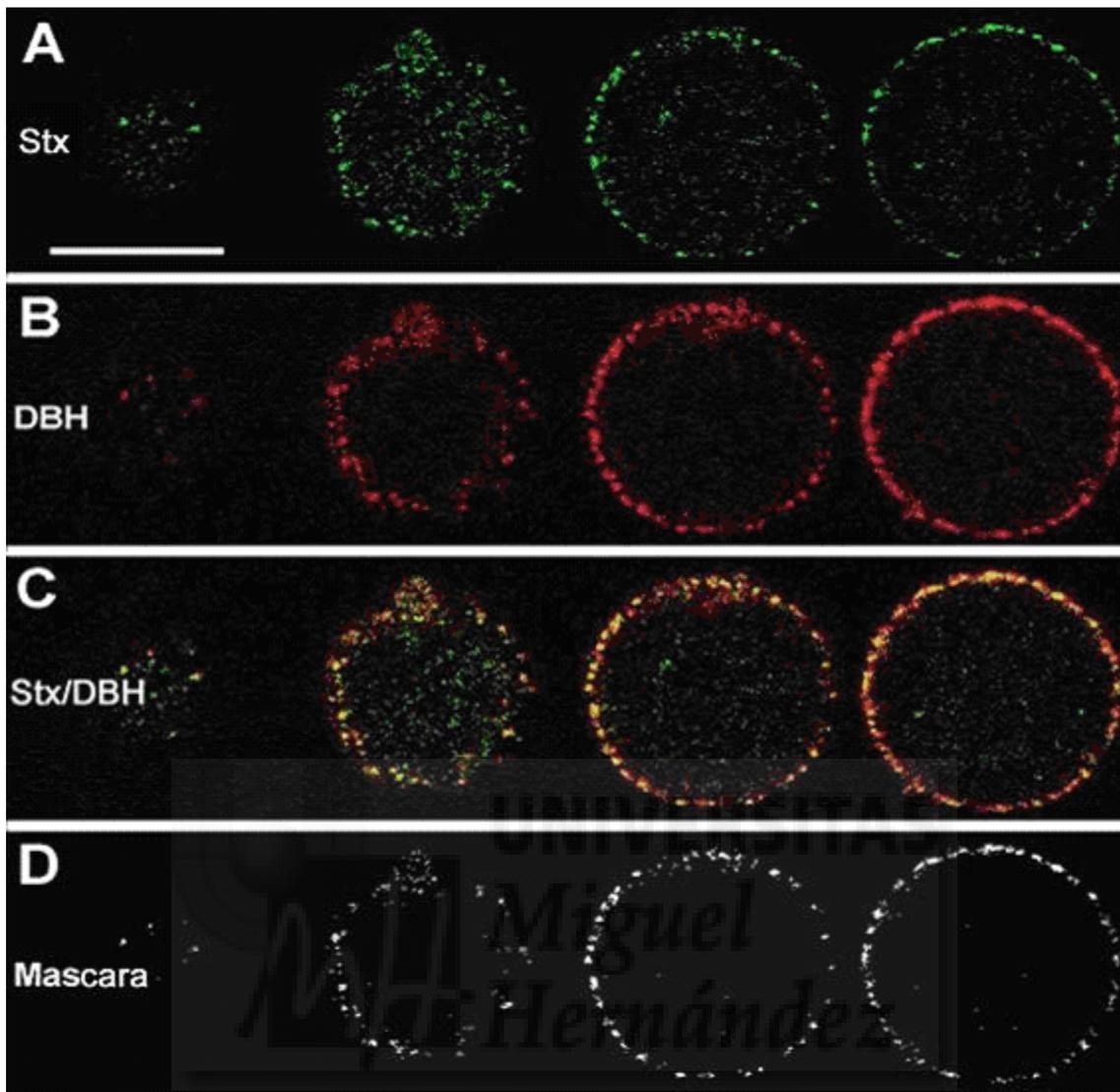


Figura 13. La proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa expuesta durante la secreción colocaliza con sintaxina 1A en la membrana plasmática de células cromafines en cultivo

Células cromafines bovinas fueron estimuladas con una solución que contenía KCl 59 mM durante 5 min. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos contra la proteína vesicular DBH y sintaxina 1A tal y como ha sido descrito en la metodología. La figura muestra una célula cromafín bovina desde un plano polar a otro más ecuatorial. En ella se observa el marcaje de sintaxina 1A en verde (A) y el de la DBH en rojo (B). La colocalización entre ambas proteínas es reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C) y confirmada por la máscara de colocalización (D). La barra representada en A se corresponde con 10 μ m.

La figura 14 muestra diferentes planos confocales de una célula cromafín bovina estimulada con KCl 59 mM durante 5 min. Los anticuerpos primarios utilizados fueron contra SNAP-25 (anti-SNAP-25 desarrollada en cabra), que puede verse en rojo en A y E, ya que se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (anti-IgG de cabra desarrollada en conejo), y contra la DBH (anti-DBH de conejo), que puede verse en verde en B y F, debido a que en este caso se utilizó un secundario conjugado con Cy2 (anti-IgG de conejo desarrollada en cabra). En C y G puede observarse la colocalización de ambas proteínas en la membrana plasmática de la célula señalada por la intensidad de la coloración amarilla. D y H se corresponden con las respectivas máscaras de colocalización.

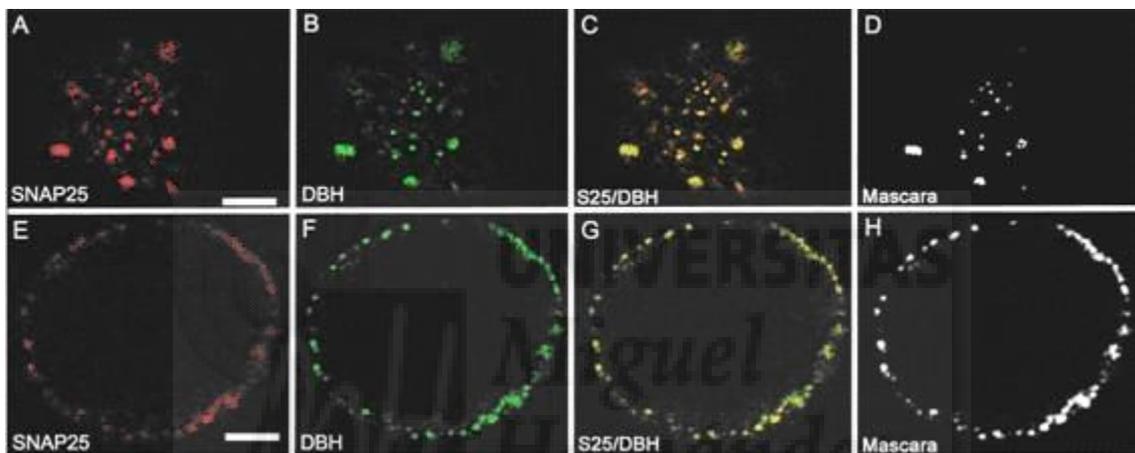


Figura 14. La proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa expuesta durante la secreción colocaliza con SNAP-25 en la membrana plasmática de células cromafines en cultivo

Células cromafines bovinas fueron estimuladas con una solución que contenía KCl 59 mM durante 5 min. Posteriormente, se incubaron con anticuerpos contra la proteína vesicular DBH y SNAP-25 tal y como ha sido descrito en la metodología. La figura muestra un plano polar (A-D) y un plano ecuatorial (E-H) de una célula cromafín bovina en cultivo. En ella puede observarse el marcaje de SNAP-25 (A y E) y el de la proteína vesicular DBH (B y F). La colocalización entre ambas proteínas es reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C y G) y confirmada por la máscara de colocalización (D y H). Las barras representadas en A y E se corresponden con 5 μ m (López y col., 2007).

El análisis de colocalización de los píxeles de ambos canales, con intensidades por encima del 50 % sobre el máximo de fluorescencia, mostró un buen emparejamiento de la DBH con ambas proteínas. Concretamente, el 51% de los píxeles positivos para DBH colocalizaban con SNAP-25 (51 ± 8 %) y el 48 % con sintaxina 1A (48 ± 7 %). Estos datos son representativos del alto nivel de colocalización existente entre los eventos de secreción y ambas proteínas SNARE.

2.- Análisis de las zonas de secreción en secciones polares de células cromafines en cultivo

El análisis de secciones polares de células cromafines en cultivo a gran magnificación, 100x10x (objetivo 100x con magnificación digital de 10x), reveló que las zonas de secreción en estas células se distribuían en la cara externa de la membrana plasmática separadas entre ellas una distancia comprendida entre 0.5 y 2 μm .

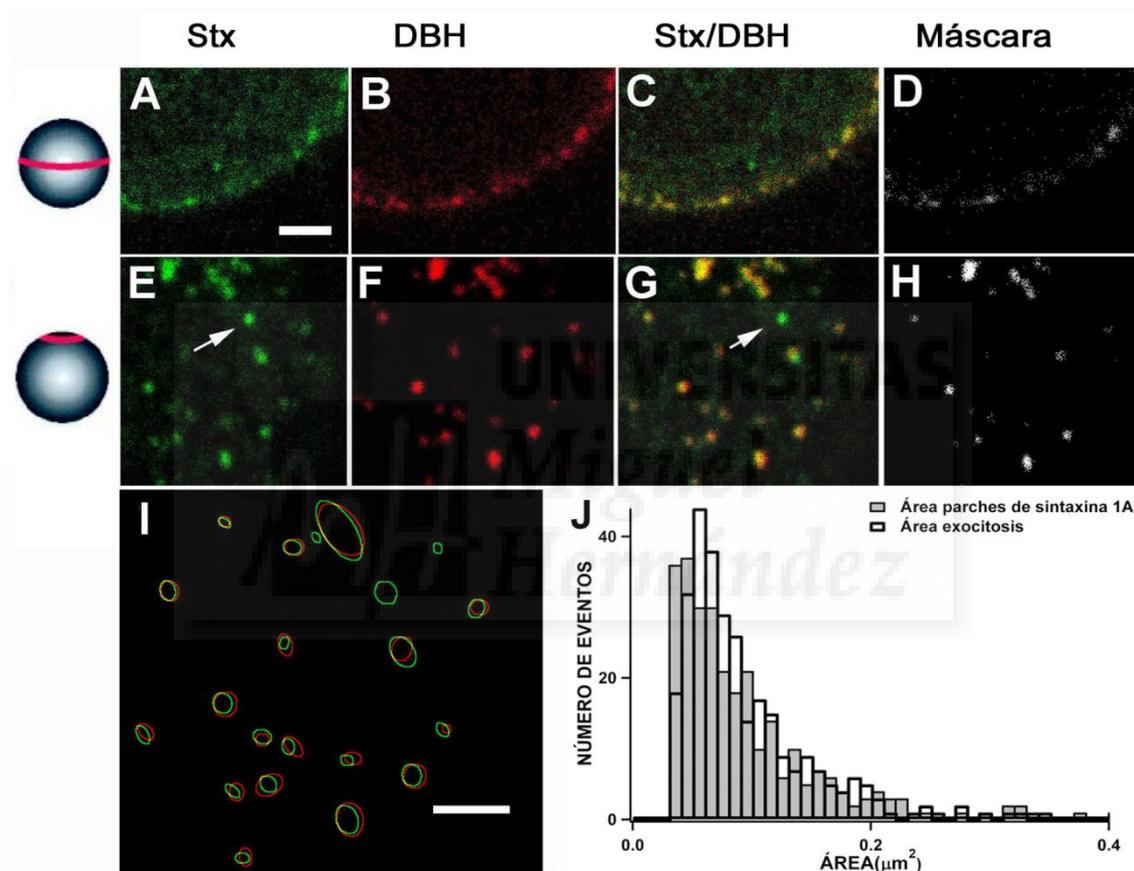


Figura 15. Análisis de la distribución de syntaxina 1A y dopamina β -hidroxilasa en imágenes obtenidas a grandes aumentos de la membrana plasmática de células cromafines bovinas en cultivo

Células cromafines bovinas fueron estimuladas y marcadas mediante el mismo protocolo descrito en la figura 13 y en la metodología. Tanto las secciones ecuatoriales (A, B, C y D) como las polares (E, F, G y H) fueron tomadas a gran magnificación (100x10x). En la figura aparece el marcaje de syntaxina 1A en verde (A y E) y el de la DBH en rojo (B y F). La colocalización entre ambas proteínas es reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C y G) y confirmada por la máscara de colocalización (D y H). La figura I se corresponde con el mapa de elipses correspondiente a los parches de syntaxina 1A y DBH. En esta figura queda reflejada la coincidencia precisa en cuanto a la forma y el tamaño de los parches de ambas proteínas. La gráfica representada en J se corresponde con el análisis de la distribución obtenido del área de 282 parches de syntaxina 1A y 301 parches de DBH. Las flechas representadas en E y G marcan syntaxina 1A que no ha sido ocupada para la secreción. Las barras de escala representadas en A e I se corresponden con 1 μm (López y col., 2007).

La figura 15 muestra diferentes planos confocales de una célula cromafín bovina estimulada con KCl 59 mM durante 5 min. Los eventos de secreción (DBH) y los parches de syntaxina 1A fueron identificados mediante un doble marcaje tal y como ha sido descrito previamente en la figura 13 y en la metodología (apartado 2.3). Tanto las secciones ecuatoriales (A, B, C y D) como las polares (E, F, G y H) fueron tomadas a gran magnificación (100x10x).

Al analizar las secciones polares, se observó una coincidencia precisa en cuanto a la forma y tamaño de la DBH expuesta a la membrana plasmática y los parches de syntaxina 1A (Figura 15 I). La similitud de ambos marcajes fue corroborado por el análisis de la distribución del área de 282 parches de syntaxina 1A y 301 de DBH (Figura 15 J). Ambas proteínas presentaron una distribución similar en cuanto al área de sus parches, siendo el valor de área más frecuente para syntaxina 1A de $0.04 \mu\text{m}^2$ y de $0.06 \mu\text{m}^2$ para los eventos de secreción (DBH). El valor promedio de área para ambas proteínas fue de $0.11 \mu\text{m}^2$, valor que se corresponde con el diámetro de un parche circular de unos 380 nm.

Durante el análisis de estas imágenes, se observó que no todos los parches de proteína SNARE disponibles en la célula eran utilizados para la secreción en un momento dado. En la figura 15 G puede observarse, marcada con una flecha, syntaxina 1A que no ha sido ocupada para la secreción. Debido a esto, se planteó la cuestión de que posiblemente ambas t-SNARE se encontraban definiendo las zonas donde se iba a producir la secreción, pero que la probabilidad de que dichas proteínas fuesen ocupadas para tal evento podría depender del tipo de estímulo aplicado y de la duración del mismo.

3.- La intensidad y duración del estímulo condiciona el número de parches de proteínas t-SNARE empleados para la secreción

Para comprobar si efectivamente los sitios de secreción eran ocupados dependiendo de la duración e intensidad del estímulo se utilizó, para estimular la secreción de las células cromafines, 3 secretagogos o inductores de la exocitosis. Estos secretagogos se aplicaron durante dos periodos de tiempo diferentes, uno corto, de 30 s de duración, y otro más largo, de 5 min de duración. Los secretagogos utilizados fueron:

- El agonista fisiológico de las células cromafines bovinas, acetilcolina, a una concentración de 10 μM (ACh 10 μM).
- Despolarización directa de las células mediante una solución con alto potasio a una concentración de 59 mM (KCl 59 mM).
- Iones de bario que pueden entrar en el citosol sin despolarizar la célula a una concentración de 10 mM (BaCl_2 10 mM).

Después de aplicar los secretagogos durante los dos periodos de tiempo, los eventos de secreción (DBH) y los parches de sintaxina 1A fueron identificados mediante un doble marcaje tal y como ha sido descrito previamente en la figura 13 y en la metodología (apartado 2.3).

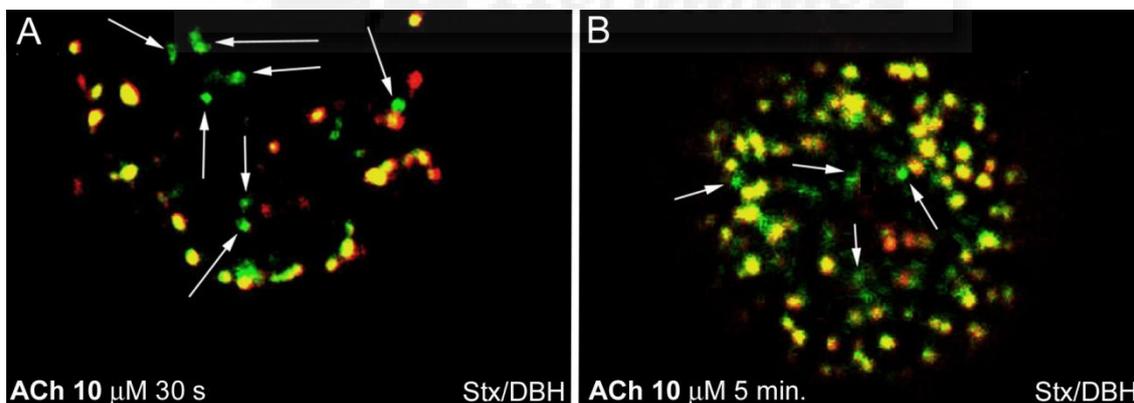


Figura 16. El porcentaje de sintaxina 1A libre durante la secreción depende del tipo de estímulo aplicado y de la duración del mismo

Se estimularon células cromafines en cultivo durante un periodo corto (30 s) y otro largo de tiempo (5 min) con ACh 10 μM , KCl 59 mM y BaCl_2 10 mM. Después de la estimulación, se marcaron las células mediante el protocolo descrito en la figura 13 y en la metodología. En la figura puede observarse una plano polar de una célula estimulada con ACh 10 μM durante 30 s (A) y de otra célula estimulada con ACh 10 μM durante 5 min. (B). Las flechas indican sintaxina 1A (verde) que no ha sido ocupada para la secreción (ausencia de coloración amarilla). De la comparación de ambas imágenes puede observarse como hay más sintaxina libre cuando se estimula la célula durante un periodo de tiempo corto.

En la figura 16 puede observarse un plano confocal polar de una célula estimulada con ACh 10 μ M durante 30 s (A) y de otra célula estimulada con ACh 10 μ M durante 5 min. (B). Las flechas indican parches de sintaxina 1A que no han sido ocupados para la secreción y como puede observarse, hay más parches libres cuando las células se estimulan durante un periodo de tiempo corto (A) que si por el contrario se estimulan durante un periodo de tiempo más largo (B). En la tabla 3, se han reflejado los datos obtenidos del cálculo de los porcentajes de sintaxina 1A libre y en la figura 17 se han representado dichos porcentajes.

	<u>30 segundos</u>	<u>5 minutos</u>
ACh 10 μM	32 \pm 4 % (n = 8 células)	18 \pm 4 % (n = 15 células)
KCl 59 mM	24 \pm 4 % (n = 15 células)	15 \pm 4 % (n = 15 células)
BaCl₂ 10 mM	26 \pm 5 % (n = 15 células)	13 \pm 3 % (n = 15 células)

Tabla 3: Porcentajes obtenidos de sintaxina 1A libre

Porcentajes obtenidos de sintaxina 1A libre para cada una de las diferentes condiciones experimentales.

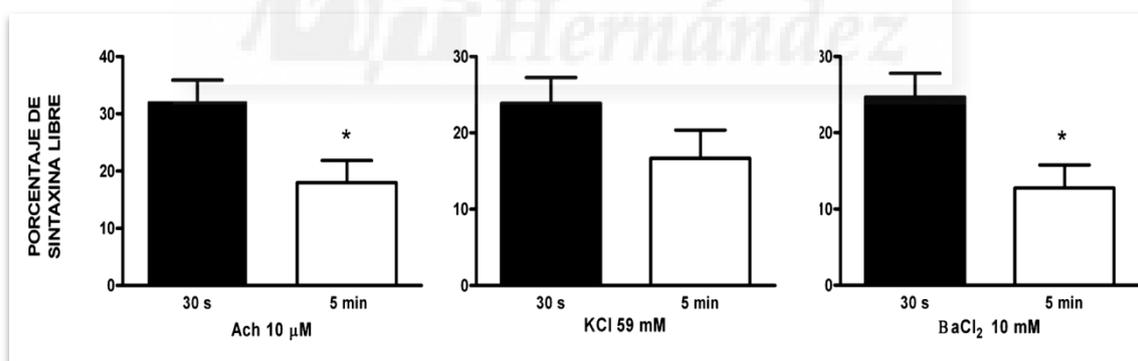


Figura 17. Representación de los porcentajes obtenidos de sintaxina 1A libre

Representación de los porcentajes de sintaxina 1A libre reflejados en la tabla 3. El asterisco indica diferencias significativas ($p < 0.05$) determinadas mediante el test t-Student.

De este tipo de experimentos se pudo concluir que efectivamente la intensidad y duración del estímulo estaba condicionando el número parches de proteína SNARE empleados para la secreción.

4.- Sintaxina 1A y SNAP-25 también colocalizan con la proteína vesicular dopamina β -hidroxilasa después de la exocitosis en rodajas de médula adrenal

Se decidió comprobar si la colocalización observada entre las proteínas SNARE y las zonas de secreción en células en cultivo, también ocurría en un sistema más fisiológico como son las rodajas de tejido. Para ello, se prepararon rodajas de tejido a partir de médula adrenal bovina tal y como ha sido descrito en la metodología (apartado 1.2). Una vez obtenidas, se incubaron con K/H alto potasio durante 5 min. a TA. Su marcaje con anticuerpos contra la proteína vesicular DBH (Figura 18 B y F), fijación, permeabilización e incubación con un segundo anticuerpo, bien contra sintaxina 1A (Figura 18 A) o contra SNAP-25 (Figura 18 E), se realizó de la misma manera que en células en cultivo salvo pequeñas modificaciones descritas en la metodología (apartados 2.1, 2.2 y 2.3).

El análisis de colocalización de los píxeles de ambos canales mostró un buen emparejamiento de la DBH con ambas proteínas SNARE (18 C, G, D y H). El 78 % de los píxeles positivos para DBH colocalizaban con SNAP-25 (78 ± 7 %) y el 63 % con sintaxina 1A (63 ± 11 %). Estos datos son representativos del alto nivel de colocalización existente entre los eventos de secreción y ambas proteínas t-SNARE y se encuentran en concordancia con los datos de colocalización obtenidos en células en cultivo (Figuras 13 y 14).

Se calculó el área de 515 parches de sintaxina 1A y DBH para realizar un análisis de distribuciones (Figura 18 J). El valor de área más frecuente para sintaxina 1A fue de $0.06 \mu\text{m}^2$ y de $0.07 \mu\text{m}^2$ para los eventos de secreción, valores ligeramente más elevados que los encontrados en células en cultivo ($0.04 \mu\text{m}^2$ y $0.06 \mu\text{m}^2$ respectivamente, Figura 15 J). El valor de área promedio para ambas proteínas fue de $0.18 \mu\text{m}^2$, valor que se corresponde con el diámetro de un parche circular de unos 480 nm.

Al igual que ocurría con las células dispuestas en cultivo, no todos los dominios de proteínas SNARE disponibles en la célula eran utilizados para la secreción. En la figura 18 I puede observarse, marcada con una flecha, sintaxina 1A que no ha sido ocupada para la secreción.

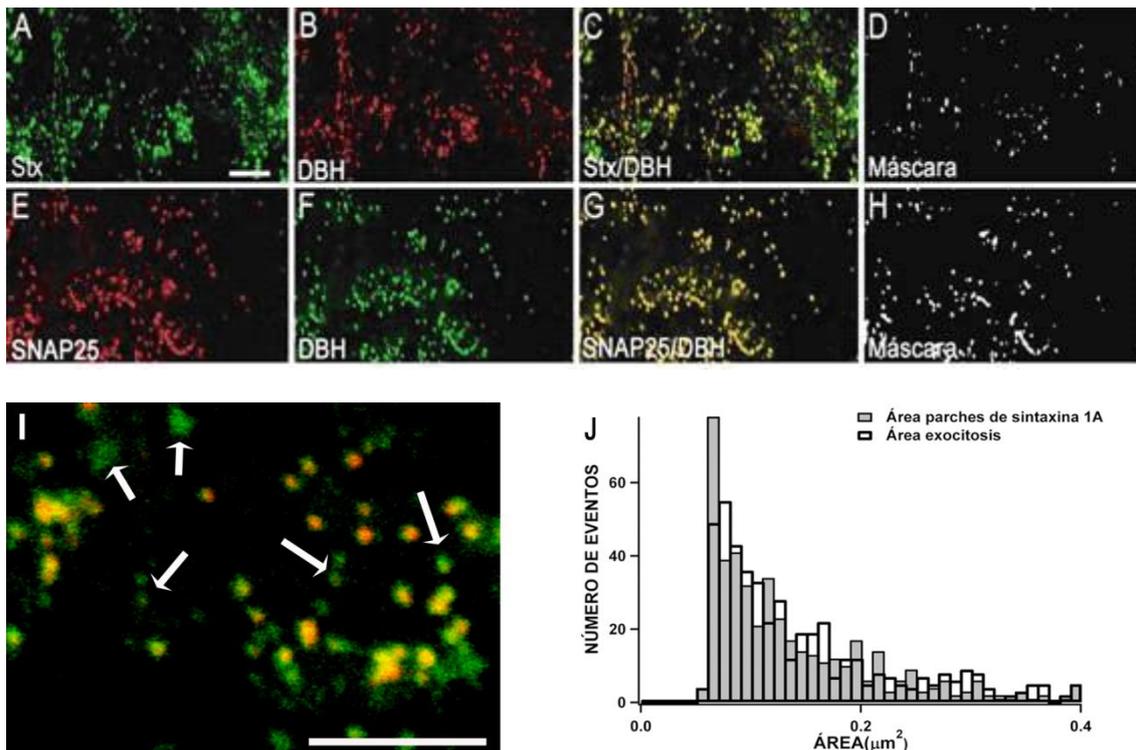


Figura 18. Análisis de la distribución de las proteínas SNARE y los eventos de secreción en rodajas de médula adrenal bovina

Las rodajas de médula adrenal fueron preparadas, estimuladas con KCl 59 mM durante 5 min. e incubadas con los anticuerpos primarios pertinentes tal y como ha sido descrito en la metodología. En las imágenes puede observarse el marcaje de syntaxina 1A (A), el de SNAP-25 (E) y el de la proteína vesicular DBH (B y F). La colocalización tanto de syntaxina 1A como de SNAP-25 con los eventos de secreción es reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C y G) y confirmada por las respectivas máscaras de colocalización (D y H). La figura I representa un detalle a gran aumento de los parches de syntaxina 1A y DBH (C). Las flechas marcan syntaxina 1A (verde) que no ha sido ocupada para la secreción (ausencia de amarillo). La gráfica representada en J se corresponde con el análisis de la distribución del área de 515 parches tanto de syntaxina 1A como de la proteína DBH. La barras representadas en A e I se corresponde con 5 μm (López y col., 2007).

La figura 19, muestra experimentos control en los que se realizó un doble marcaje de células en cultivo (Figura 19 A, B, C y D) y rodajas de medula adrenal (Figura 19 E, F, G y H) con anticuerpos específicos contra SNAP-25 y la proteína de membrana Na^+/K^+ ATPasa. En A y E se puede observar en verde el marcaje de la proteína Na^+/K^+ ATPasa, ya que se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con FITC (Anti-IgG de ratón desarrollada en cabra), y en B y F en rojo el de SNAP-25, ya que en este caso se utilizó un secundario conjugado con TRIC (anti IgG de conejo desarrollada en cabra). La falta de coloración amarilla en C y G muestra la ausencia de colocalización entre ambas proteínas. Esto también queda patente si se observan las respectivas máscaras de colocalización (D y H). Concretamente, el 6 % (6 ± 1 %) de los píxeles positivos para SNAP-25 colocalizaban con la proteína Na^+/K^+ ATPasa en las células en cultivo, y el 8% (8 ± 2 %) en las rodajas de tejido.

Estos experimentos son un control adecuado para demostrar que los datos de colocalización presentados hasta el momento no son debidos a una colocalización al azar entre las distintas proteínas ni a un marcaje inespecífico de los anticuerpos utilizados.

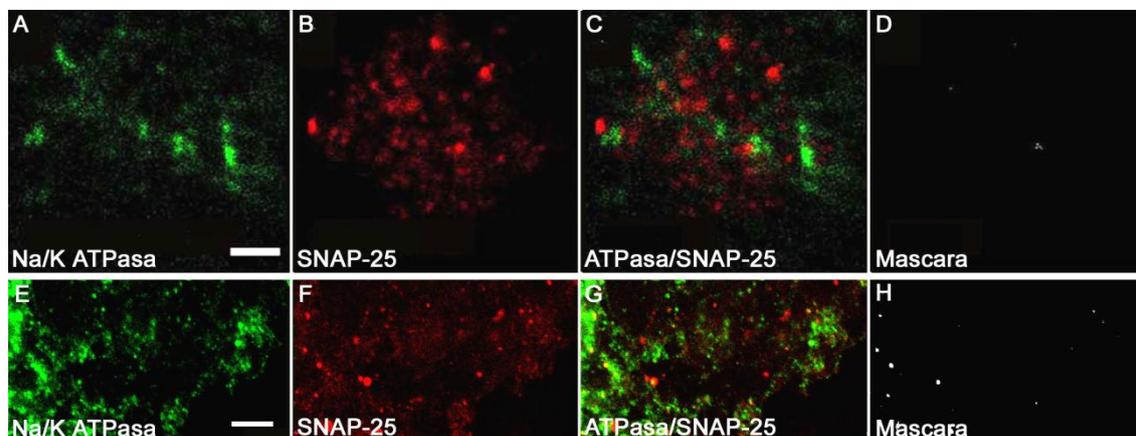


Figura 19. La proteína de membrana Na⁺/K⁺ATPasa no colocaliza con SNAP-25 en la membrana plasmática de células cromafines bovinas

La figura muestra imágenes confocales de una sección polar de una célula cromafín bovina en cultivo (A, B, C y D). En A puede observarse el marcaje en verde de la proteína de membrana Na⁺/K⁺ ATPasa y en B, en rojo, el de SNAP-25. C y D muestran el bajo porcentaje de colocalización existente entre ambas proteínas. El mismo marcaje en rodajas de médula adrenal (E, F, G y H) también dio como resultado un bajo porcentaje de colocalización (G y H) entre ambas proteínas. Las barras se corresponden con 5 μm en A y 10 μm en E (López y col., 2007).

5.- Microdominios de sintaxina 1A y SNAP-25 están presentes en forma de parches en la membrana plasmática de células cromafines bovinas tanto en cultivo como en rodajas de médula adrenal

El hecho de que la proteína vesicular dopamina β-hidroxilasa coincidiera con ambas proteínas SNARE, sugirió que probablemente estas proteínas se encontraban juntas en la membrana plasmática de las células cromafines formando microdominios.

Para comprobar esto, se realizaron experimentos de doble marcaje en ambos tipos de preparaciones tal y como ha sido descrito en la metodología (apartados 2.1 y 2.2).

La Figura 20 muestra imágenes de microscopía confocal de células cromafines en cultivo (Figura 20 A, B, C y D) y de rodajas de médula adrenal (Figura 20 E, F, G y H). Los anticuerpos primarios utilizados en este tipo de experimentos fueron contra sintaxina 1A (anti-sintaxina 1A desarrollada en pollo), que puede verse en verde en A y E, ya que se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con FITC (anti-IgG de pollo desarrollada en conejo), y contra SNAP-25

(anti-SNAP-25 desarrollada en conejo), que puede verse en rojo en B y F, debido a que en este caso se utilizó un secundario conjugado con TRIC (anti IgG de conejo desarrollada en cabra). El intenso color amarillo reflejado en C y G muestra la colocalización de ambas proteínas. Esto también queda patente si se observan las respectivas máscaras de colocalización (D y H).

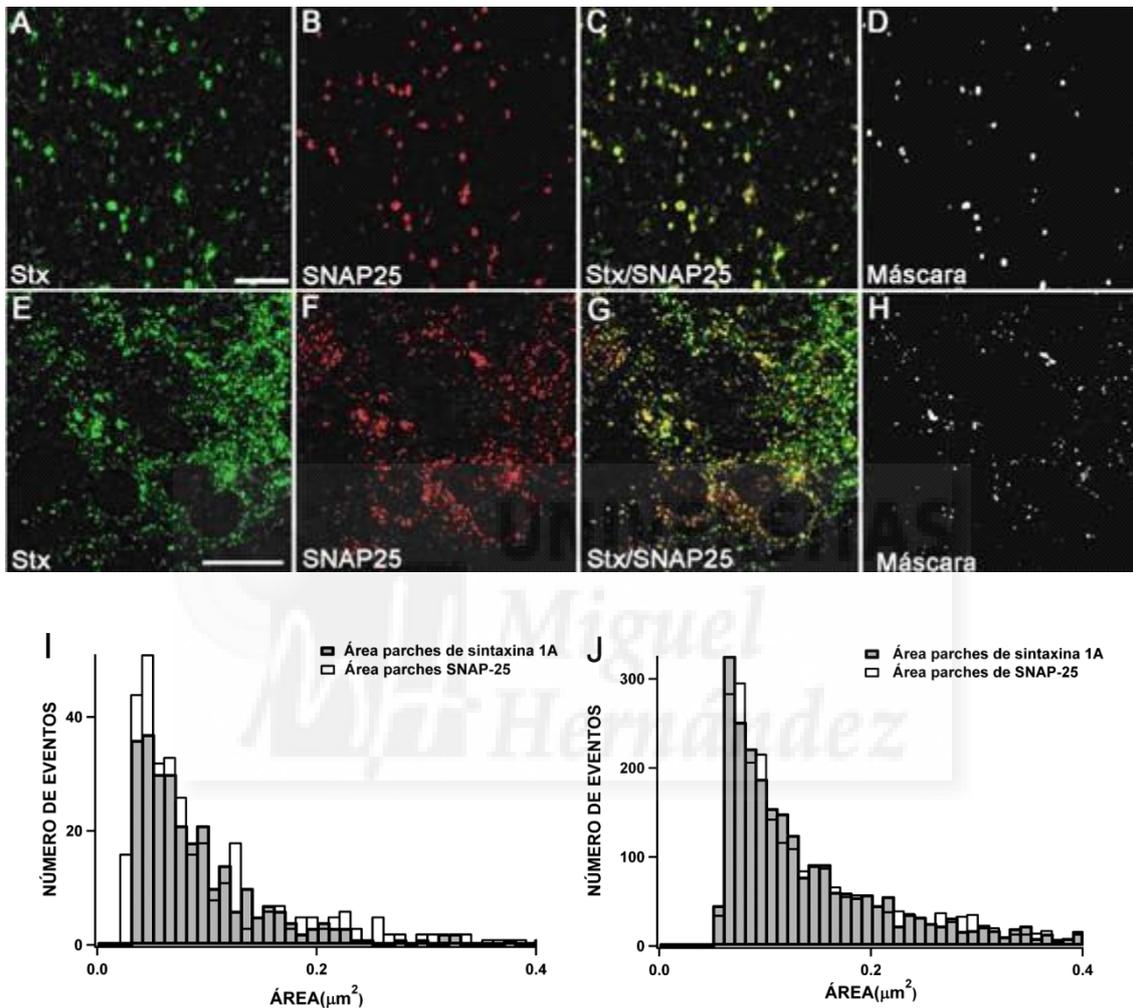


Figura 20. Microdominios de sintaxina 1A y SNAP-25 están presentes en forma de parches en la membrana plasmática de células cromafines bovinas tanto en cultivo como en rodajas de médula adrenal

La figura muestra imágenes confocales de una sección polar de una célula cromafín bovina en cultivo (A, B, C y D). En A se puede observar el marcaje de sintaxina 1A y en B el de SNAP-25. Las imágenes C y D muestran la colocalización entre ambas proteínas. El mismo marcaje en rodajas de médula adrenal (E, F, G y H) también dio como resultado una fuerte colocalización entre ambas proteínas (G y H). La gráfica representada en I se corresponde con el análisis de la distribución del área de 282 parches de sintaxina 1A y 349 de SNAP-25 en células cromafines en cultivo, y la representada en J con el análisis de la distribución de 515 parches tanto de sintaxina 1A como de SNAP-25 en rodajas de médula adrenal. Las barras se corresponden con 5 μm en A y 10 μm en E (López y col., 2007).

Se realizó un análisis de la distribución del área de 282 parches de sintaxina 1A y 349 de SNAP-25 en células en cultivo, y de 515 parches de ambas proteínas en rodajas de médula adrenal. Las dos proteínas presentaron una distribución semejante en cuanto al área de los parches, siendo el valor promedio para ambas de $0.11 \mu\text{m}^2$ en células en cultivo (Figura 20 I) y de $0.18 \mu\text{m}^2$ en rodajas de tejido (Figura 20 J).

Para apoyar estos resultados y poder asegurar la localización preferencial de sintaxina 1A y SNAP-25 en la membrana plasmática de estas células, se realizó una reconstrucción tridimensional de una célula en cultivo marcada con anticuerpos específicos contra ambas proteínas tal y como ha sido descrito en la figura 20. En el video 1 del material complementario puede verse el marcaje preferencial de ambas proteínas en la membrana plasmática de la célula. Por otro lado, también se pudo confirmar la interacción molecular entre ambas proteínas mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (imagen no mostrada (López y col., 2007)).

De estos resultados se podía concluir que sintaxina 1A y SNAP-25 se encontraban formando microdominios en la membrana plasmática de las células cromafines, probablemente definiendo las zonas donde se iba a producir la secreción, pero no se podía saber si los microdominios pre-existían en la membrana plasmática de la célula o se formaban en el momento de la secreción.

Para estudiar estas dos posibilidades, se analizó el área y la densidad de los parches de sintaxina 1A (Figura 21 A, B, E y F) y SNAP-25 (Figura 21 C, D, G y H) en células en cultivo (Figura 21 A, B, C y D) y en rodajas de médula adrenal (Figura 21 E, F, G y H). Estos análisis se realizaron en dos condiciones, antes de la secreción (Figura 21 A, C, E y G), y después de estimular las células y las rodajas de tejido con KCl 59 mM durante 5 min (Figura 21 B, D, F y G).

Para el análisis estadístico de los cálculos de área y densidad de los parches en células individuales se utilizaron 64 células en reposo y 54 estimuladas tanto para sintaxina 1A como para SNAP-25. En estas células se midió el área de todos los parches y se calculó su densidad. En el caso de las rodajas no estimuladas se analizó el área de 1229 parches de sintaxina 1A y 901 de SNAP-25. En el caso de las rodajas estimuladas se analizó el área de 3725 parches de sintaxina 1A y 2735 de SNAP-25. Para los cálculos de densidad se analizaron 4 rodajas a las que no se les aplicó ningún estímulo para ambos tipos de proteínas, 6 rodajas estimuladas para sintaxina 1A y 13 para SNAP-25. Se estimó que estadísticamente no había cambios significativos ni en el área (Figura 21 I) ni en la densidad (Figura 21 J) de los parches de sintaxina 1A y SNAP-25, antes y después del estímulo, y en ambos tipos de preparaciones.

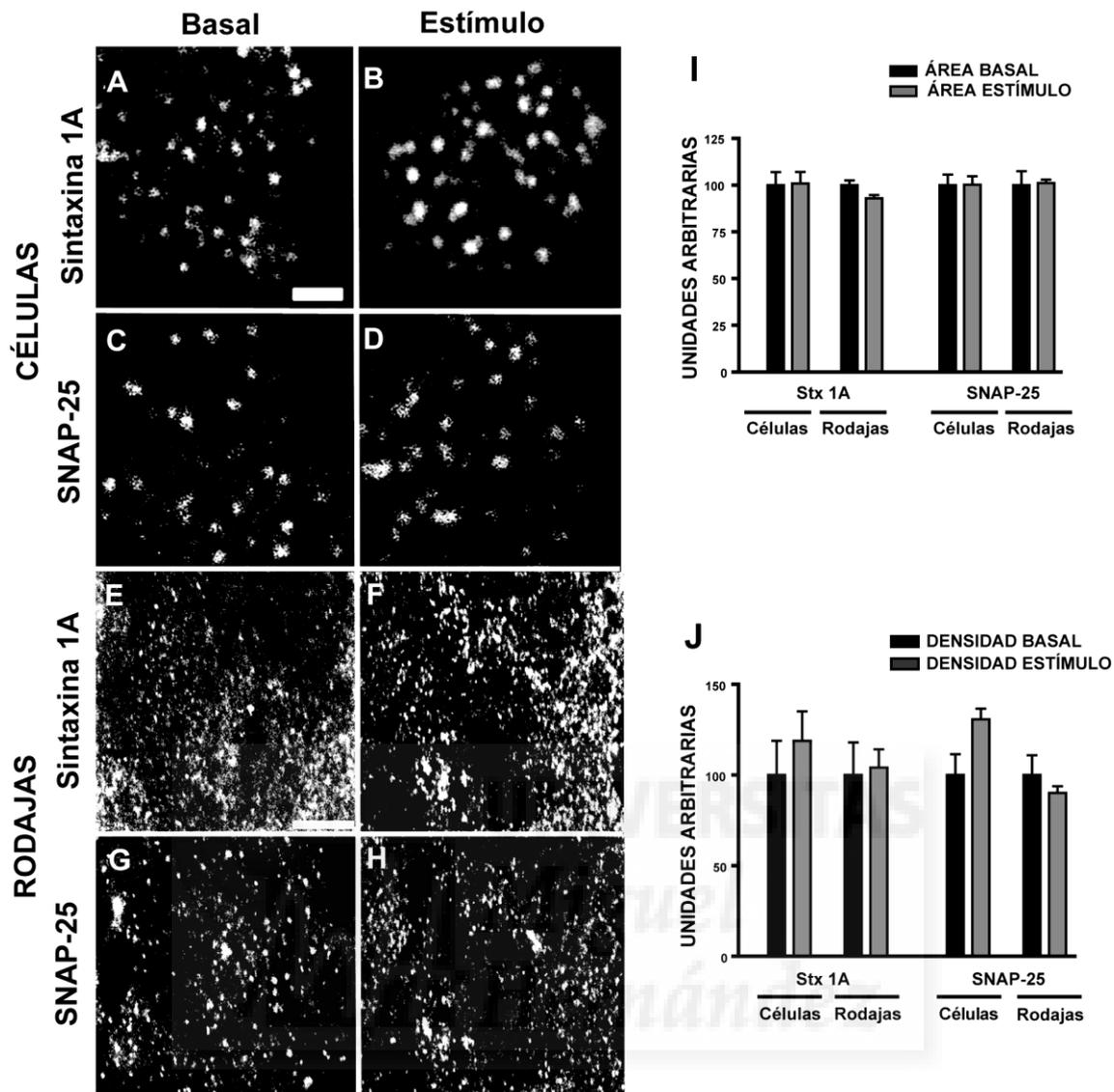


Figura 21. Microdominios pre-existent de sintaxina 1A y SNAP-25 definen las zonas de secreción en células cromafines bovinas tanto en cultivo como en rodajas de médula adrenal

La figura muestra imágenes de secciones polares de células cromafines en cultivo en estado basal (A y C) y estimuladas (B y D), así como de rodajas de tejido en estado basal (E y G) y estimuladas (F y H), marcadas con anticuerpos específicos contra sintaxina 1A (A, B, E y F) y SNAP-25 (C, D, G y H). I y J representan el análisis estadístico de los datos normalizados obtenidos de la medición del área y el cálculo de la densidad de los parches de ambas proteínas, en ambos tipos de preparaciones, antes y después de la secreción. No se observaron cambios significativos en ninguna de las condiciones analizadas. Las barras se corresponden con 1 μ m en A y 5 μ m en E (López y col., 2007).

Por tanto, la coincidencia espacial de los parches de sintaxina 1A y SNAP-25 con la proteína vesicular DBH en la membrana plasmática de las células cromafines, era debida a que ambas proteínas SNARE pre-existían en la membrana plasmática de estas células formando microdominios que serían utilizados para la secreción, es decir, ambas proteínas se encontraban definiendo las zonas de secreción en la membrana plasmática de este modelo celular.

6.- Munc18-1 se encuentra presente en los microdominios de proteínas SNARE tanto en células cromafines en cultivo como en rodajas de médula adrenal

Con el fin de caracterizar los microdominios formados por syntaxina 1A y SNAP-25 y ver si una de las principales proteínas reguladoras del complejo SNARE, Munc18-1, se encontraba presente en dichos microdominios, se realizaron experimentos de doble marcaje en ambos tipos de preparaciones utilizando anticuerpos específicos contra SNAP-25 (anti-SNAP-25 desarrollada en cabra) y Munc18-1 (anti-Munc18-1 desarrollada en conejo). El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartados 2.1 y 2.2).

La Figura 22 muestra imágenes confocales de una sección polar (A, B y C) y una ecuatorial (D, E y F) de una célula cromafín en cultivo; además de una sección de una rodaja de tejido en la que se observan varias células (G, H e I) y la colocación de ambas proteínas en el contorno de dichas células. El marcaje de Munc18-1 puede verse en verde en A, D y G ya que se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con Cy2 (anti-IgG de conejo desarrollada en cabra), y el de SNAP-25 en rojo en B, E y H ya que se utilizó un secundario conjugado con rodamina (anti-IgG de cabra desarrollada en conejo). En C, F e I se refleja la colocación de ambas proteínas por la intensidad de la coloración amarilla.

El análisis de colocación dio como resultado que el 68 % de los píxeles positivos para Munc18-1 colocaban con SNAP-25 en las células en cultivo (68 ± 8 %), y el 65 % en las células que formaban parte del tejido (65 ± 8 %). Estos elevados porcentajes de colocación sugieren que, incluso después de que syntaxina 1A se asocie con SNAP-25, Munc18-1 permanece en el entorno de ambas proteínas.

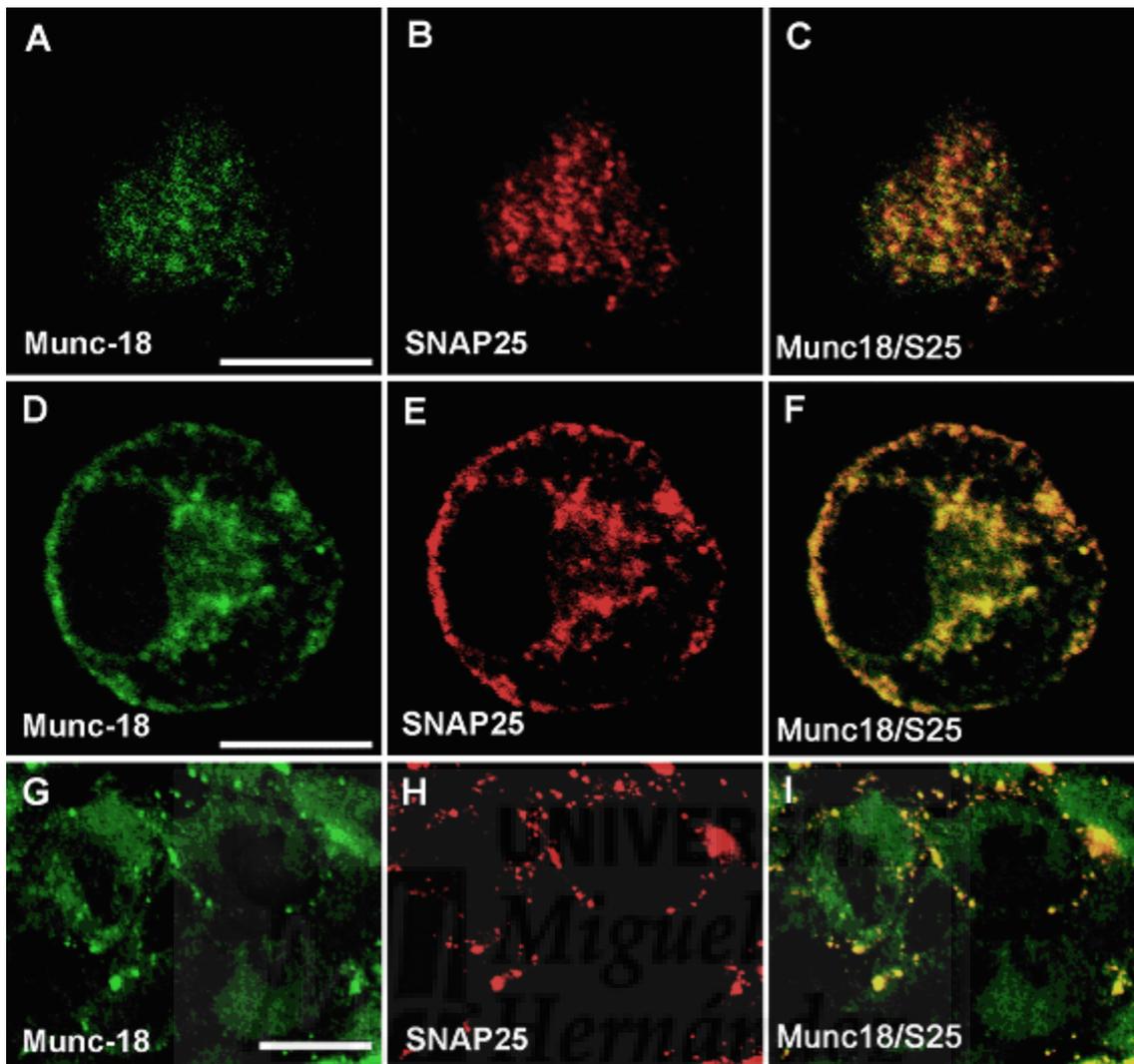


Figura 22. Munc18-1 se encuentra presente en los microdominios de proteínas SNARE tanto en células en cultivo como en rodajas de médula adrenal

La figura muestra imágenes confocales de una sección polar (A B y C) y una ecuatorial (D, E y F) de una célula cromafín en cultivo, y una sección de una rodaja de tejido (G, H e I). En A, D y G aparece el marcaje de Munc18-1, y en B, E y H el de SNAP-25. La colocalización de ambas proteínas queda reflejada por la intensidad de la coloración amarilla en C, F e I. Las barras representadas en A, D y G se corresponden con 10 μm .

7.- El grado de colocación de los diferentes tipos de canales de calcio dependientes de voltaje con las proteínas SNARE depende del tipo de preparación

Debido a que se encuentran mejor caracterizadas las zonas de secreción en las células nerviosas que en endocrinas o neuroendocrinas, pareció pertinente estudiar en un modelo neuroendocrino, como las células cromafines, la relación espacial entre los microdominios SNARE, que como se ha visto en anteriores apartados marcan las zonas de secreción en este modelo celular, y los distintos tipos de CCDV.

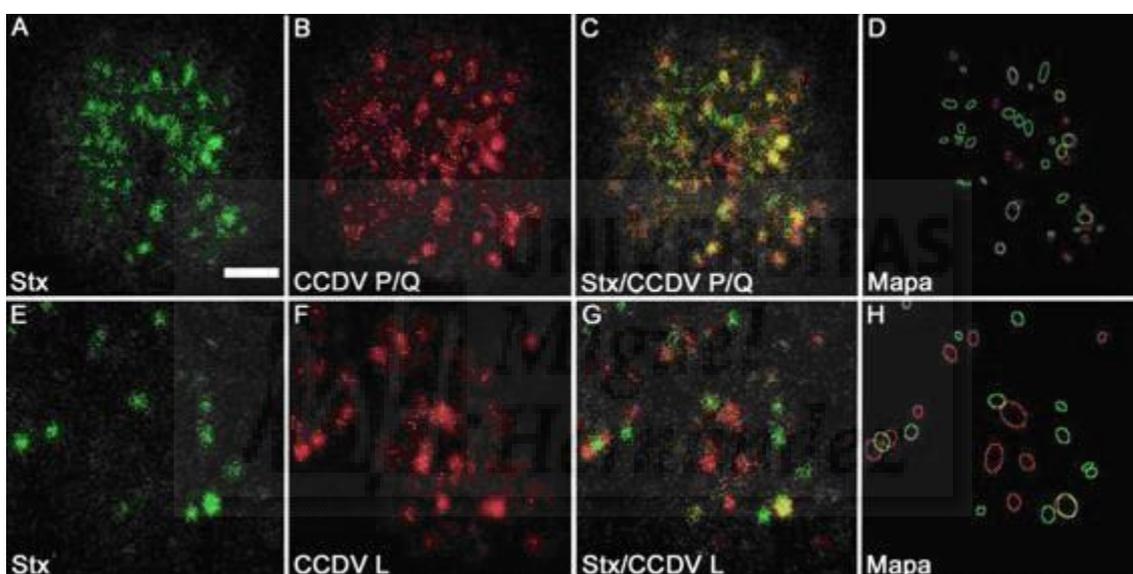


Figura 23. Diferentes tipos de canales de calcio dependientes de voltaje colocan sólo parcialmente con sintaxina 1A en células cromafines bovinas en cultivo

La figura muestra imágenes confocales de secciones polares de células cromafines bovinas marcadas con anticuerpos específicos contra sintaxina 1A (A y E) y CCDV de tipo P/Q (anti Cav2.1) (B) y L (anti Cav1.3) (F). D y G muestran la colocación existente entre sintaxina 1A y ambos tipos de proteínas, mientras que en D y H se han representado los mapas de colocación. Estos mapas corresponden al contorno de los parches de sintaxina 1A y de los CCDV de tipo P/Q (D) y de tipo L (H). Como se puede observar en ambas imágenes por la superposición de las elipses, la colocación de sintaxina 1A con ambos tipos de CCDV es limitada. La barra representada en A se corresponde con 1 μm (López y col., 2007).

El marcaje de células cromafines bovinas en cultivo con anticuerpos específicos contra sintaxina 1A (Figura 23 A y E) y contra CCDV de tipo P/Q (anti Cav2.1) (Figura 23 B) o L (anti Cav1.3) (Figura 23 F), reveló una colocación parcial entre ambos tipos de proteínas (Figura 23 C, G, D y H). Únicamente un 21 % ($21,3 \pm 1,6$ %) del total de los píxeles positivos para los CCDV de tipo P/Q colocaban con sintaxina 1A y un 22 % ($22,2 \pm 1,7$ %) cuando se trataba de los CCDV de tipo L. A pesar del bajo porcentaje de colocación, ambos marcajes

aparecen muy próximos, concretamente entre los 200 y los 400 nm. Mediante esta técnica no pudo detectarse marcaje específico contra CCDV de tipo N (anti- Cav2.2).

Se realizó el mismo marcaje en rodajas de médula adrenal y se vieron importantes diferencias con respecto a los resultados obtenidos en células. Como puede observarse en la figura 24, el marcaje de sintaxina 1A (en verde), y el de los CCDV de tipo L y N (en rojo), muestra una clara colocalización en la membrana plasmática de estas células. Esto se detecta por la densidad de los parches amarillos que se encuentran delimitando las múltiples células poligonales que forman parte del tejido. Se obtuvieron resultados semejantes cuando se realizó el marcaje de CCDV de tipo P/Q y sintaxina 1A (imágenes no mostradas).

El análisis de colocalización dio como resultado que un 65 % (65 ± 4 %) del total de píxeles positivos para CCDV de tipo P/Q colocalizaban con sintaxina 1A, un 63 % (63 ± 3 %) en el caso de CCDV de tipo L y un 68 % (68 ± 6 %) cuando se trataba de CCDV de tipo N.

Estos datos, comparados con los porcentajes de colocalización obtenidos en células, muestran que la colocalización entre los diferentes tipos de CCDV y las zonas de secreción es tres veces mayor en células que se encuentran formando parte del tejido que en células individuales aisladas mediante un cultivo celular (Figura 25).

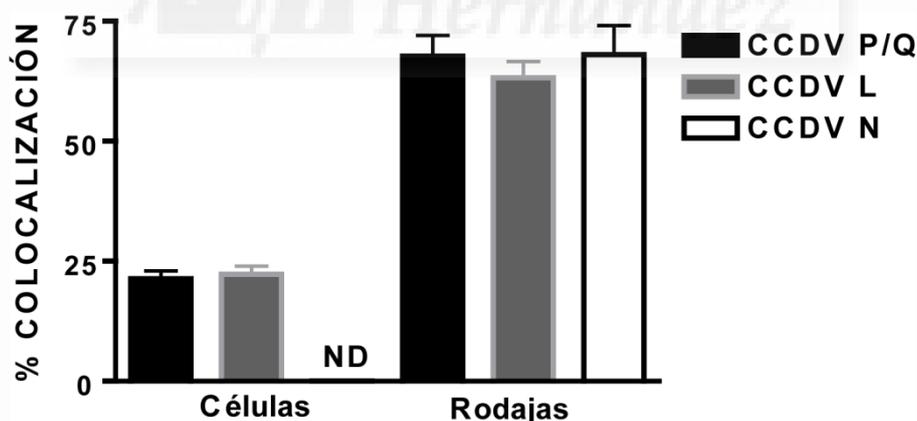


Figura 25. Porcentajes de colocalización obtenidos entre sintaxina 1A y los diferentes tipos de CCDV

La gráfica muestra los porcentajes de colocalización obtenidos entre los distintos tipos de CCDV y Sintaxina 1A en ambos tipos de preparaciones, células en cultivo y rodajas de tejido. ND = No detectado.

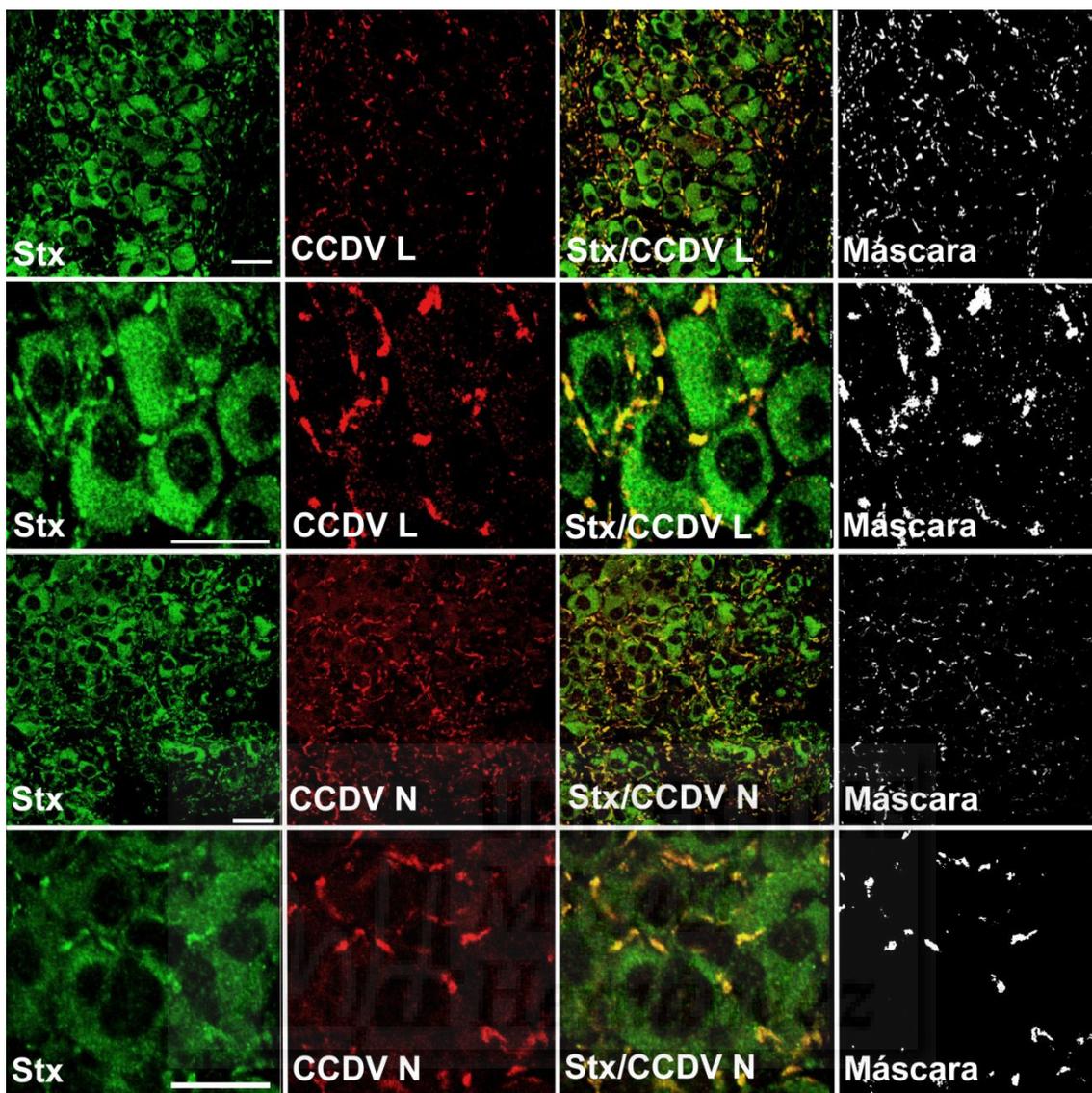


Figura 24. Diferentes tipos de CCDV presentan un alto porcentaje de colocalización con sintaxina 1A en la membrana plasmática de células cromafines bovinas de rodajas de médula adrenal

La figura muestra imágenes confocales de células cromafines bovinas de rodajas de médula adrenal marcadas con anticuerpos contra sintaxina 1A (verde) y CCDV de tipo L y N (rojo). Además, muestra detalles a grandes aumentos de secciones de estas rodajas que muestran la alta densidad de los parches de ambos tipos de proteínas en la periferia de las células. La colocalización de ambas proteínas queda patente por el intenso color amarillo de las imágenes en las que se muestran los dos marcajes o bien mediante las máscaras de colocalización. Se obtuvieron imágenes similares cuando se utilizaron anticuerpos contra CCDV de tipo P/Q. Las barras se corresponden con 10 μm (López y col., 2007).

Por tanto, estos resultados indican que en las células que se encuentran formando parte del tejido los diferentes tipos de CCDV se encuentran asociados a los microdominios de proteínas SNARE, de manera que pueda asegurarse un acoplamiento estrecho entre la entrada de calcio y la secreción de catecolaminas, mientras que en células cromafines aisladas mediante cultivo celular los CCDV se encuentran distribuidos cerca de las zonas de secreción pero sin un acoplamiento tan estrecho con la maquinaria de secreción.

8.- La sobre-expresión de la proteína GFP fusionada a SNAP-25 y a SNAP-25 Δ 9 forma parches en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas

Nuestro siguiente objetivo fue estudiar la presencia y el comportamiento de los microdominios SNARE en células vivas. Nuestra estrategia se basó en sobre-expresar en células cromafines en cultivo SNAP-25 y SNAP-25 Δ 9, es decir, SNAP-25 sin los últimos 9 aminoácidos de la región C-term, de manera que compitiesen y sustituyesen la expresión endógena de SNAP-25. Es importante resaltar que SNAP-25 Δ 9 es el producto resultante de un tratamiento de las células con la NTBo/A (apartado 3.1.2 de la introducción).

Para ello, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HSV-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-GFP-SNAP-25 y pHSVpuc-GFP-SNAP-25 Δ 9. A las 48 h, entre el 20 y el 30 % de estas células visualizadas mediante la técnica de TIRFM, mostraban parches de fluorescencia verde intensa indicando la expresión de GFP-SNAP-25 (Figura 26 A) y GFP-SNAP-25 Δ 9 (Figura 26 B). El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 5.1).

Se realizó un análisis de la distribución del área de los parches de expresión de ambas proteínas y se vio que presentaban distribuciones semejantes (Figura 26 C; n = 64 parches para ambas proteínas), siendo el valor de área más frecuente para la proteína nativa de $0.18 \mu\text{m}^2$ y de $0.2 \mu\text{m}^2$ para la alterada. El valor de área promedio fue de $0.25 \mu\text{m}^2$ y $0.26 \mu\text{m}^2$ respectivamente. Estos valores se corresponden con el diámetro de un parche circular que varía entre los 560 y 575 nm. También se realizó un análisis de la densidad de los parches de expresión de ambas proteínas en la membrana plasmática de estas células. Los valores obtenidos fueron de 0.12 parches/ μm^2 para la proteína nativa y 0.14 parches/ μm^2 para la alterada, presentando por lo tanto densidades semejantes.

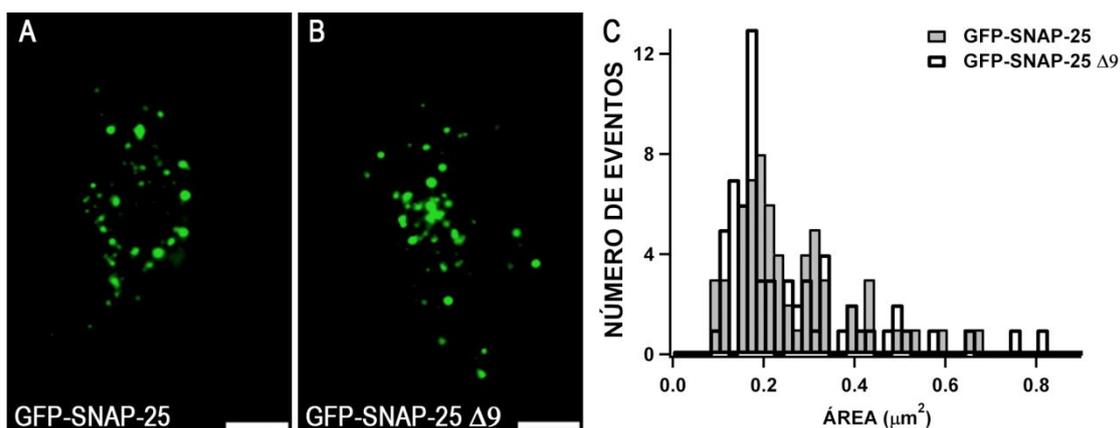


Figura 26. La sobre-expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ9 forma parches en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas que pueden ser visualizados mediante la técnica de TIRFM

Células cromafines en cultivo fueron infectadas con amplicones del virus HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-GFP-SNAP-25 y pHSVpuc-GFP-SNAP-25 Δ9. A las 48 h, se visualizaron las células mediante la técnica de TIRFM tal y como ha sido descrito en la metodología. Las figuras A y B muestran dos imágenes representativas de la formación de parches en la membrana plasmática de estas células debido a la sobre-expresión de SNAP-25 (A) y SNAP-25 Δ9 (B). La gráfica representada en C se corresponde con el análisis de la distribución del área de 64 parches para cada una de las proteínas. El valor de área promedio fue de 0.25 μm² para la proteína nativa y de 0.26 μm² para la alterada. La barra representada en A se corresponde con 5 μm.

A continuación, se comprobó si en los parches de expresión de SNAP-25 se encontraba presente sintaxina 1A. Para este propósito, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HSV-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-GFP-SNAP-25 y pHSVpuc-GFP-SNAP-25 Δ9. A las 48 h, se fijaron, permeabilizaron e incubaron las células con anticuerpos específicos contra sintaxina 1A (anti-sintaxina 1A desarrollada en pollo) tal y como ha sido descrito en la metodología (apartado 2.1).

La figura 27 muestra una célula cromafín en cultivo visualizada mediante la técnica de TIRFM. En A aparece el marcaje de SNAP-25 en verde debido a la sobre-expresión de la GFP, y en B el de sintaxina 1A en rojo debido a la utilización de un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (anti-IgG de pollo desarrollada en conejo). La colocalización entre ambas proteínas es reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C) y confirmada por la máscara de colocalización (D). Se obtuvieron resultados de colocalización semejantes entre SNAP-25 Δ9 y sintaxina 1A (imágenes no mostradas).

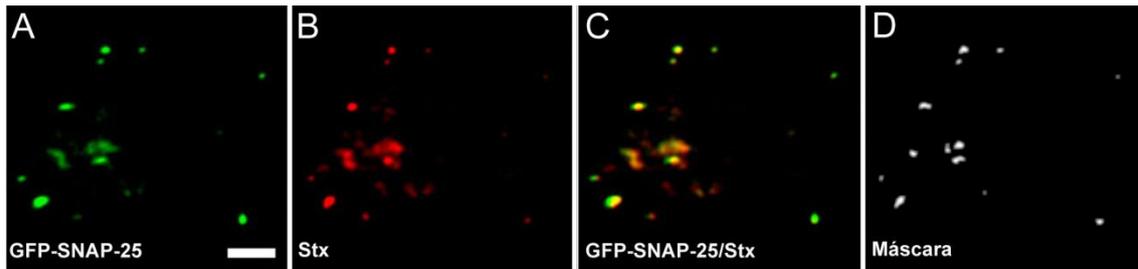


Figura 27. Microdominios de syntaxina 1A y SNAP-25 están presentes en forma de parches en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas visualizadas mediante la técnica de TIRFM

Células cromafines en cultivo fueron infectadas con amplicones del HVS-1 que contenía la construcción pHSVpuc-GFP-SNAP-25. A las 48 h, las células fueron fijadas, permeabilizadas, incubadas con anticuerpos contra syntaxina 1A y visualizadas mediante la técnica de TIRFM. El marcaje de SNAP-25 puede verse en verde debido a la sobre-expresión de la GFP (A), y el de syntaxina 1A (B) en rojo debido a la utilización de un anticuerpo secundario conjugado con rodamina (anti-IgG de pollo desarrollada en conejo). La colocalización entre ambas proteínas es reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C) y confirmada por la máscara de colocalización (D). La barra representada en A se corresponde con 2 μ m.

Se comprobó si, además de syntaxina 1A, también se encontraba presente en los parches de expresión la proteína vesicular sinaptobrevina-2 (VAMP-2). Para ello, se realizó una doble infección de células cromafines en cultivo con amplicones del HSV-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-VAMP-2-GFP (apartados 3.2 y 4.3 de la metodología). A las 48 h de la doble infección, se visualizaron las células mediante la técnica de TIRFM.

Algunos de los resultados obtenidos se han representado en la figura 28. En A se muestra el marcaje de VAMP-2 en verde debido a la sobre-expresión de la GFP, y en B el de SNAP-25 en rojo debido a la sobre-expresión de la DsRed. La colocalización entre ambas proteínas es reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C) y confirmada por la máscara de colocalización (D). Se obtuvieron resultados de colocalización semejantes entre SNAP-25 Δ 9 y VAMP-2 (imágenes no mostradas).

Estos experimentos demuestran que la sobre-expresión de los constructos de SNAP-25, GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ 9, da como resultado la formación de parches de expresión de estas proteínas en la membrana plasmática de las células cromafines que además contienen syntaxina 1A y sinaptobrevina. De este modo, mediante la técnica de TIRFM se pueden visualizar los microdominios de proteínas SNARE y estudiar su comportamiento justo en la membrana plasmática de células vivas, y como veremos en posteriores apartados, se puede estudiar la influencia que ejercen estos microdominios en el atraque y la fusión de las vesículas cromafines.

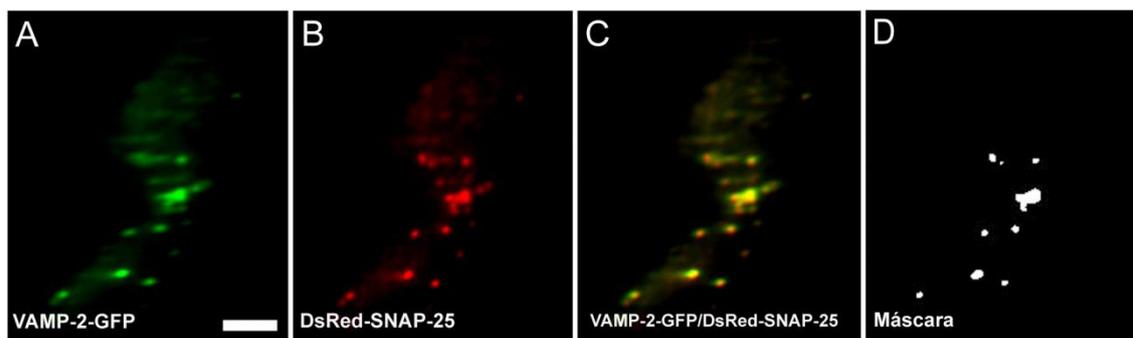


Figura 28. Microdominios de SNAP-25 y sinaptobrevina-2 están presentes en forma de parches en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas visualizadas mediante la técnica de TIRFM

Se realizó una doble infección de células cromafines bovinas en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-VAMP-2-GFP tal y como ha sido descrito en la metodología. La figura muestra una célula cromafín bovina visualizada mediante la técnica de TIRFM. A se corresponde con el marcaje de VAMP-2 en verde debido a la sobre-expresión de la GFP, y B con el de SNAP-25 en rojo debido a la sobre-expresión de la DsRed (B). La colocalización entre ambas proteínas queda reflejada por la intensidad de la coloración amarilla (C) y es confirmada por la máscara de colocalización (D). La barra representada en A se corresponde con 2 μ m.

9.- Los microdominios SNARE formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ 9 presentan diferencias en cuanto a su movilidad

A pesar de que ambas construcciones, GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ 9, presentaron parámetros de área y densidad semejantes, pudo observarse, mediante la visualización de secuencias temporales adquiridas mediante la técnica de TIRFM (60 s; 1 imag. /s), que los parches de expresión de ambas proteínas presentaban diferencias en cuanto a su movilidad.

En la figura 29 A y B aparecen 8 imágenes, tomadas cada 7 s, que ejemplarizan la movilidad de los parches de expresión de la proteína nativa (A) y la alterada (B). Cuando las células se infectaron con la proteína nativa los parches de expresión formados permanecieron prácticamente inmóviles (A), mientras que cuando se infectaron con la proteína alterada presentaron una movilidad elevada (B). Una forma sencilla de observar esto es mediante el marcaje de los parches con una cruz y observar su desplazamiento en el tiempo respecto al punto central de la cruz (A y B). Los parches de expresión de la proteína nativa presentaron un movimiento limitado caracterizado por una pequeña oscilación en el plano X-Y (Figura 29 C), y una variación de intensidad estable durante el periodo de observación (60 s), indicativo de un movimiento restringido también en el plano Z (Figura 29 D). Los parches de expresión de la proteína alterada presentaron un amplio movimiento tanto lateral como axial (Figura 29 C y D).

En los videos 2 (GFP-SNAP-25) y 3 (GFP-SNAP-25 $\Delta 9$) del material complementario pueden verse dos secuencias temporales de los parches de expresión de estas proteínas. La duración de ambos videos es de 30 s y la frecuencia de adquisición de 1 imag. /s; además, se han acelerados 6 veces (6x) para poder evidenciar los desplazamientos con mayor claridad. De la comparación de ambos videos se ve claramente como los parches de expresión de la proteína alterada presentan una oscilación mayor en su movimiento.

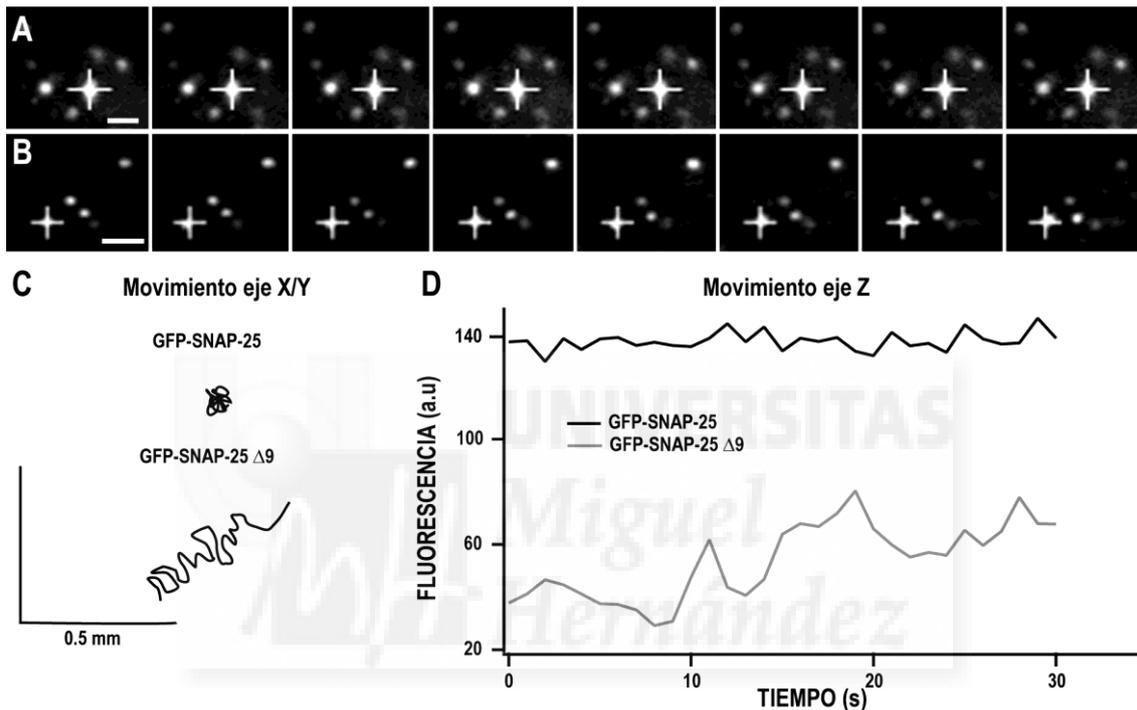


Figura 29. Los microdominios SNARE formados por la sobre-expresión de los constructos GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ presentan diferencias de movilidad

Se estudió la dinámica de los microdominios formados por la sobre-expresión de ambas proteínas SNARE mediante la visualización de secuencias temporales de 60 s de duración (1 imag. /s) adquiridas mediante la técnica de TIRFM. Tanto en A como en B puede verse una secuencia temporal de 8 imágenes, separadas entre ellas 7 s, de los parches de expresión de la proteína nativa (A) y la alterada (B). En A aparece marcado con una cruz un parche de expresión de la proteína nativa y puede verse como no varía de posición con respecto al punto central de la cruz. En B puede verse como el parche de expresión marcado de la proteína alterada varía de posición con el tiempo. En C y D se ha representado el movimiento que presentaron los parches marcados en A y B tanto en el eje X-Y (C) como en el Z (D). Las barras representadas en A y B se corresponden con 2 μm .

Para cuantificar la movilidad lateral de los parches de expresión se analizaron dos parámetros: la velocidad promedio que alcanzaron en el eje X-Y y el desplazamiento cuadrático medio o MSD que sirvió para hallar su coeficiente de difusión. El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 5.3).

Los parches de expresión de la proteína nativa presentaron una movilidad restringida que se ajustaba bien con un modelo Gausiano centrado en el valor de velocidad de 20 nm/s, siendo el valor promedio de 22 ± 1 nm/s. Los de la proteína alterada presentaron una movilidad menos restringida con un valor de velocidad más frecuente de 32 nm/s y una velocidad promedio de 36 ± 1 nm/s. Estos análisis también indicaron que entre el 25 y el 30 % de los parches de expresión de la proteína alterada presentaban una velocidad mayor que cualquiera de los parches analizados de la proteína nativa. En la figura 30 A se ha representado la distribución de velocidades obtenida del análisis de 80 parches de expresión para cada una de las construcciones.

El cálculo del MSD permitió deducir el tipo de desplazamiento que gobierna a estos parches (figura 30 B). Asumiendo que los parches se movían mediante difusión simple, ya que su MSD se ajustó mejor a una recta, se pudo calcular sus coeficientes de difusión (D) (pendiente = 4D) que fueron de $4.6 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para la proteína nativa (n = 74 parches de 29 células) y de $12 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para la alterada (n = 99 parches de 33 células).

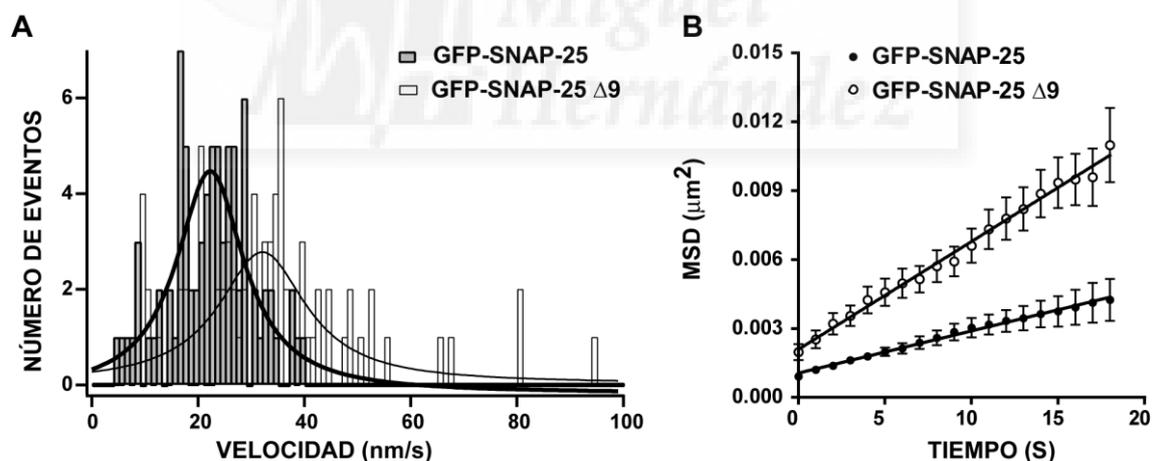


Figura 30. Caracterización del movimiento de los parches formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ9

Para el cálculo del desplazamiento lateral se obtuvieron las coordenadas X-Y del centroide de los parches formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 Δ9. Esto permitió calcular el desplazamiento lateral total (A) y el MSD (B) tal y como ha sido descrito en la metodología. Los parches de expresión de la proteína nativa presentaron una movilidad restringida que cuadraba bien con un modelo Gausiano centrado en el valor de velocidad de 20 nm/s, siendo el valor promedio de 22 ± 1 nm/s, mientras que los de la proteína alterada presentaron una movilidad menos restringida con un valor de velocidad más frecuente de 32 nm/s y una velocidad promedio de 36 ± 1 nm/s (A). Asumiendo que los parches se movían mediante difusión simple, ya que su MSD se ajustó mejor a una recta, se pudieron calcular sus coeficientes de difusión que fueron de $4.6 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para la proteína nativa y de $12 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ para la alterada (B).

Por tanto, la proteína alterada, además de desplazarse a una velocidad mayor en el eje X-Y, presentaba un coeficiente de difusión aparente tres veces mayor que la nativa.

A continuación, se comprobó si los parches de expresión de ambas proteínas también presentaban diferencias de movilidad en el eje Z. Para ello, se estudió la variación de intensidad en el tiempo del máximo de fluorescencia respecto al origen del campo evanescente de 72 parches de expresión de GFP-SNAP-25 y 74 de GFP-SNAP-25 $\Delta 9$. Las imágenes estudiadas fueron adquiridas a la frecuencia de 1 imag. /s durante 60 s. Los datos de fluorescencia obtenidos fueron transformados a datos de distancia (nm) tal y como ha sido descrito en la metodología (apartado 5.4).

La figura 31 A muestra la oscilación en el eje Z de tres parches representativos de cada una de las construcciones, y como los parches de expresión de la proteína nativa tiende a moverse en un rango de distancias que se extienden entre los 50 y los 100 nm hacia el interior celular, mientras que los de la proteína alterada se mueven en un rango mayor, entre los 100 y los 150 nm.

Se calculó la fracción de tiempo que pasaron los parches de expresión analizados en diferentes distancias desde el origen del campo evanescente y se analizó su distribución (Figura 31 B). Los parches de expresión de la proteína nativa presentaron un movimiento oscilante con una probabilidad máxima de ser localizados cerca de los 40 nm desde el origen del campo evanescente y un valor de Z promedio de 92 nm (92 ± 6 nm; n = 74 parches), mientras que los de la proteína alterada presentaron una probabilidad máxima de ser localizados alrededor de los 100 nm y un valor de Z promedio de 130 nm (130 ± 8 nm; n = 72 parches), es decir, los parches de expresión de la proteína alterada pasaron más tiempo alejados del origen del campo evanescente.

Como se ha mencionado en la metodología, dos partículas con una intensidad de fluorescencia semejante puede que no se encuentren a la misma distancia de la membrana plasmática si no presentan la misma intensidad de fluorescencia del fondo celular, pero también podría ser debido a que no todas las zonas de la membrana plasmática se encuentran planas o adheridas al cristal donde se apoya la célula. Por estos motivos, es más adecuado referirse a la distancia de los parches con respecto al origen del campo evanescente que a la membrana plasmática. Debido a estos matices también resulta más útil, a la hora de comparar el movimiento en el eje Z de dos partículas, calcular la ΔZ en un intervalo de tiempo en lugar de la distancia promedio de las partículas al origen del campo evanescente. La ΔZ proporciona una idea de la amplitud del movimiento y la fluctuación de las partículas en dicho eje.

Se calculó la ΔZ registrada durante un periodo de tiempo de 60 s y se realizó un análisis de distribuciones (Figura 31 C). Como se ve en las gráficas representadas en la figura 31 C y D la magnitud de los cambios en el eje Z es claramente mayor para la construcción alterada. La ΔZ promedio fue de 65 nm para la proteína nativa (65 ± 4 nm) y de 91 nm para la alterada (91 ± 6 nm) (Figura 31 D).

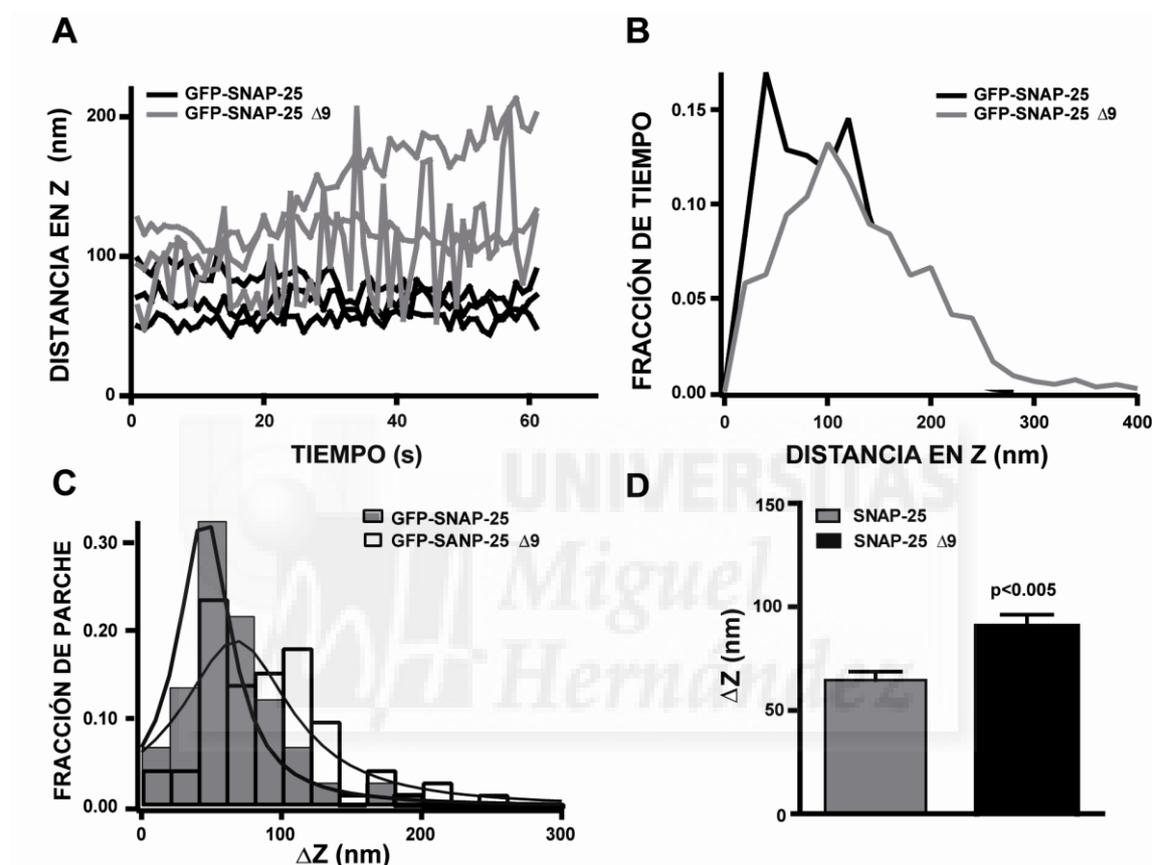


Figura 31: Caracterización del movimiento de los parches de expresión de GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ en el eje Z

Se estudió la variación de intensidad en el tiempo del máximo de fluorescencia respecto al origen del campo evanescente de 72 parches de expresión de GFP-SNAP-25 y 74 de GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ tal y como ha sido descrito en la metodología. En A se ha representado la oscilación en el eje Z de tres parches representativos de cada una de las construcciones y se ve como los parches de expresión de la proteína nativa se mueven más cercanos al origen del campo evanescente. En B se ha representado la fracción de tiempo que pasan los parches de manera individual en diferentes distancias desde el origen del campo evanescente. Los parches de expresión de la proteína nativa presentaron una probabilidad máxima de ser localizados a 40 nm del origen del campo evanescente y los de la alterada a 100 nm. Se calculó la ΔZ registrada durante un periodo de tiempo de 60 s y se realizó un análisis de distribuciones (C). La ΔZ promedio (D) fue de 65 nm para la proteína nativa (65 ± 4 nm) y de 91 nm para la alterada (91 ± 6 nm).

Para determinar si las fluctuaciones en el eje Z de los parches de expresión de la proteína alterada eran debidas a fluctuaciones de la membrana plasmática en lugar de al propio movimiento de los constructos, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del

HVS-1 que contenían la construcción pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$. A las 48 h, se incubaron las células con el compuesto FM 4-64 para marcar la membrana plasmática y se procedió rápidamente a su visualización mediante la técnica de TIRFM. Se tomaron secuencias temporales (60 s, 1 imag. /s) simultáneas de los parches de expresión de SNAP-25 $\Delta 9$ y la membrana plasmática cercana a dichos parches mediante la utilización de un solo láser y el separador de luz emitida Optosplit II. A continuación, se analizó la variación de intensidad en el tiempo del máximo de fluorescencia con respecto al origen del campo evanescente de los parches de expresión y de la membrana plasmática asociada a dichos parches. El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 5.4).

En la figura 32 se muestra un ejemplo de una de las células analizadas. En A aparece el marcaje de SNAP-25 $\Delta 9$ en verde debido a la sobre-expresión de la GFP, y en B el de la membrana plasmática en rojo debido al compuesto FM 4-64. Se ha marcado con una flecha el parche de expresión (A) y la sección de la membrana plasmática (B) que han sido analizados. En la gráfica representada en C se refleja como el parche aumenta la intensidad de su fluorescencia con el tiempo, es decir, se acerca al origen del campo evanescente, mientras que la membrana asociada o cercana a dicho parche no presenta cambios de intensidad en el mismo periodo de tiempo.

Por tanto, de los resultados obtenidos hasta el momento se puede concluir que la proteína alterada, además de presentar un movimiento menos restringido en el eje X-Y, también presenta una oscilación y una amplitud de movimiento mayor en el eje Z que no puede ser atribuida a la dinámica de la membrana plasmática de las células sino al comportamiento de los parches de expresión.

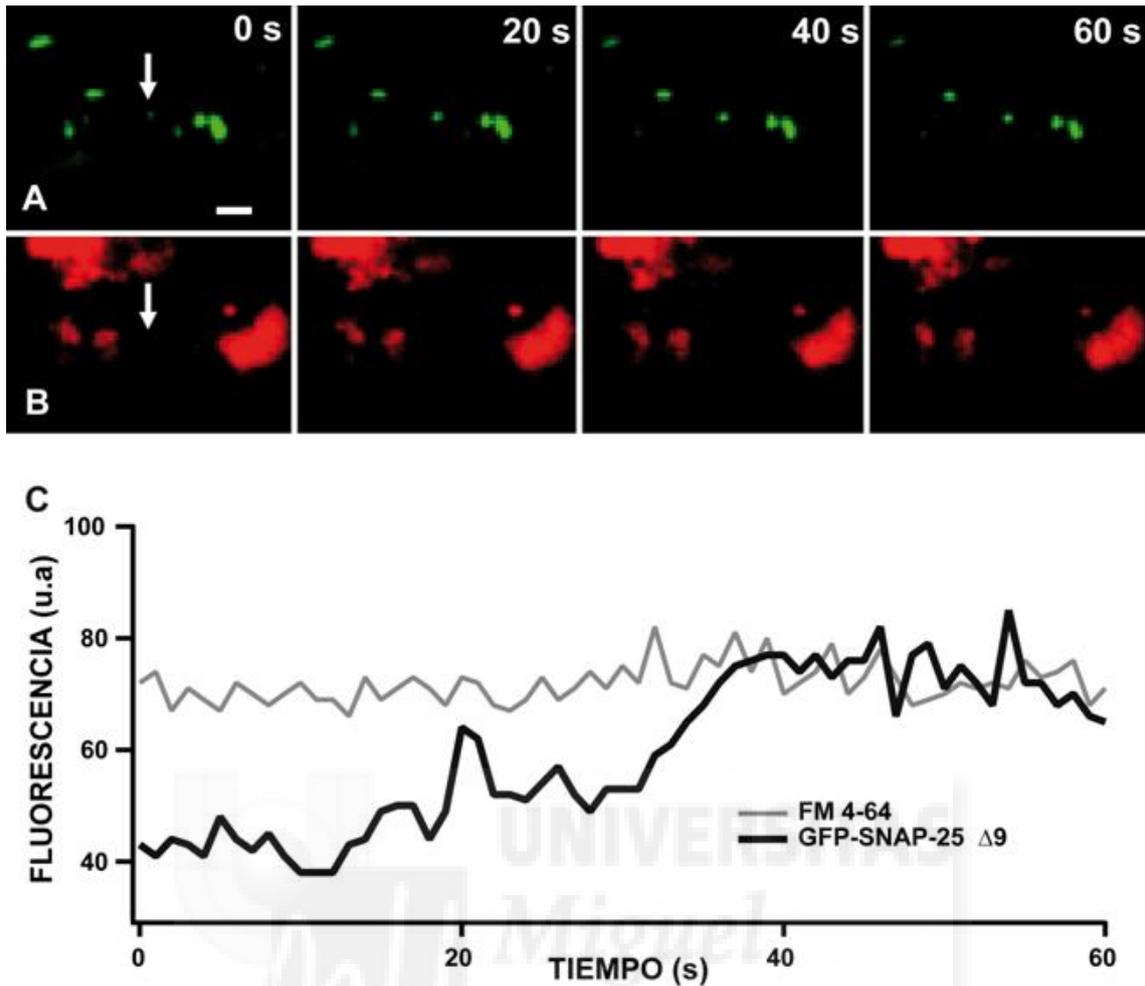


Figura 32: La membrana plasmática no presenta una mayor dinámica en las células que sobre-expresan la proteína alterada

Células cromafines en cultivo fueron infectadas con amplicones del virus HVS-1 que contenían la construcción pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$. A las 48 h, las células fueron incubadas con el compuesto FM 4-64 y visualizadas mediante la técnica de TIRFM tal y como ha sido descrito en la metodología. Las imágenes, separadas entre ellas 20 s, muestran el marcaje de los parches de expresión (A) y de la membrana plasmática cercana a dichos parches (B). En la grafica representada en C se refleja como el parche de expresión, marcado con una flecha en A, aumenta la intensidad de su fluorescencia con respecto al tiempo, mientras que la membrana asociada o cercana a dicho parche, marcada con una flecha en B, no presenta cambios de intensidad en el mismo periodo de tiempo. La barra representada en A se corresponde con 1 μm .

10.- El movimiento de las vesículas cromafines se correlaciona con el movimiento de los parches de expresión de las proteínas SNARE a los que se asocian

¿De qué manera podría estar influenciando el comportamiento de los microdominios SNARE al comportamiento de las vesículas cromafines? ¿Afecta la dinámica de los parches de expresión de estas proteínas a la dinámica de las vesículas cromafines en la cercanía de la membrana plasmática?

Para contestar a estas preguntas, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HSV-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-GFP-SNAP-25 y pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$. A las 48 h, se incubaron las células con el marcador de vesículas lysotracker rojo (Becherer y col., 2003) y se visualizaron mediante la técnica de TIRFM. Primero se utilizó un láser para visualizar la posición de los parches de expresión de las proteínas SNARE (Figura 33 A y E) y se tomó una imagen. A continuación, se cambió el láser y el ángulo crítico para visualizar las vesículas y se adquirió otra imagen (Figura 33 B y F). Por último, se adquirió una secuencia temporal de las vesículas (60 s; 1 imag. /s). Se realizaron estudios de colocalización con las imágenes adquiridas y se analizó el movimiento en el eje X-Y, Z y el MSD únicamente de las vesículas que colocalizaban con las proteínas SNARE (Figura 33 C, G, D y H). El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 5.2).

El histograma de la distribución de las velocidades (Figura 33 I) y el análisis del MSD (Figura 33 J) revelaron una estricta relación entre el movimiento de los parches de expresión de las proteínas SNARE y las vesículas asociadas a dichos parches. Las vesículas asociadas a la proteína nativa (Figura 33 A, B, C y D) se movían a una velocidad promedio de 23 nm/s (23 ± 1 nm/s) y su coeficiente de difusión fue de $3,7 \pm 0,2 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 64$ vesículas analizadas de 10 células; Figura 33 I y J), valores semejantes a los obtenidos para los parches de expresión de la proteína nativa (Figura 30 A y B). Más interesante fue ver que cuando las vesículas se asociaban a los parches donde se encontraba presente SNAP-25 $\Delta 9$ (Figura 33 E, F, G y H), su movimiento lateral cambiaba de manera acorde al movimiento de dichos parches, presentando un valor de velocidad promedio de 30 ± 1 nm/s y un coeficiente de difusión de $15 \pm 0,1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($n = 57$ vesículas analizadas de 10 células; Figura 33 I y J), valores semejantes a los obtenidos para los parches de expresión de la proteína alterada (Figura 30 A y B). En la tabla 4 se han representado los datos de movilidad obtenidos en el eje X-Y y los coeficientes de difusión de ambas proteínas SNARE y de las vesículas asociadas a dichas proteínas.

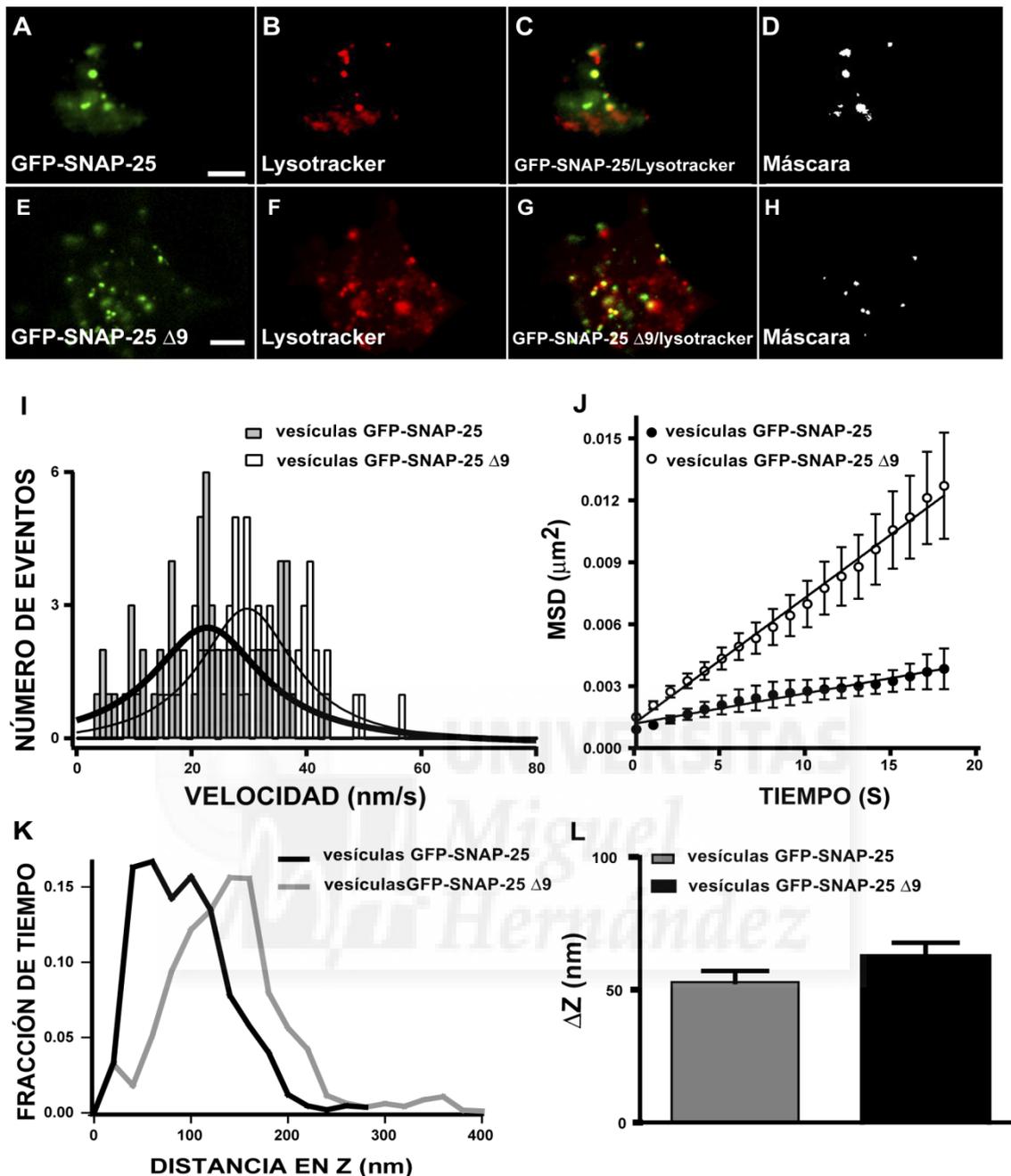


Figura 33: El movimiento de las vesículas cromafines se correlaciona con el movimiento de los parches de expresión de las proteínas SNARE a los que se asocian

Se infectaron células cromafines con amplicones del virus HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-GFP-SNAP-25 y pHSVpuc-GFP-SNAP-25 $\Delta 9$. A las 48 h, las células fueron incubadas con el marcador de vesículas lysotracker rojo y visualizadas mediante la técnica de TIRFM tal y como ha sido descrito en la metodología. En la imagen puede observarse el marcaje en verde de SNAP-25 (A) y SNAP-25 $\Delta 9$ (E) debido a la sobre-expresión de la GFP, y el de las vesículas en rojo debido al lysotracker (B y F). La colocalización entre ambas proteínas SNARE y las vesículas se aprecia por la coincidencia de los píxeles de ambos canales (C y G) y las respectivas máscaras de colocalización (D y H). La gráfica representada en I muestra el análisis de la distribución de la velocidad de 64 vesículas asociadas a GFP-SNAP-25 (23 ± 1 nm/s) y 57 a GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ (30 ± 1 nm/s). En J se ha representado el MSD obtenido frente al tiempo. Las vesículas asociadas a la proteína nativa presentaron una probabilidad máxima de ser localizadas a 60 nm del origen del campo evanescente frente a los 140 nm que presentaron las asociadas a la proteína alterada (K). L. Representación de la ΔZ registrada durante 60 s ($\Delta Z = 53 \pm 4$ nm para las vesículas asociadas a GFP-SNAP-25; $\Delta Z = 63 \pm 5$ para las vesículas asociadas a GFP-SNAP-25 $\Delta 9$). Las barras representadas en A y E se corresponden con $2 \mu\text{m}$.

	GFP-SNAP-25	Vesículas (GFP-SNAP-25)	GFP-SNAP-25 Δ9	Vesículas (GFP-SNAP-25 Δ9)
Velocidad X-Y	22 ± 1 nm/s n = 74 parches	23 ± 1 nm/s n = 64 vesículas	36 ± 1 nm/s n = 99 parches	30 ± 1 nm/s n = 57 vesículas
Coefficiente de difusión	D = 4,6 ± 0,1 x 10 ⁻⁵ μm ² /s n = 74 parches de 29 células	D = 3,7 ± 0,2 x 10 ⁻⁵ μm ² /s n = 64 vesículas de 10 células	D = 12,0 ± 0,1 x 10 ⁻⁵ μm ² /s n = 99 parches de 33 células	D = 15,0 ± 0,1 x 10 ⁻⁵ μm ² /s n = 57 vesículas de 10 células
Fracción de tiempo	40 nm n = 74 parches	60 nm n = 57 vesículas	100 nm n = 72 parches	140 nm n = 57 vesículas
Z promedio	92 ± 6 nm n = 74 parches	94 ± 6 nm n = 57 vesículas	130 ± 8 nm n = 72 parches	140 ± 8 nm n = 57 vesículas
ΔZ	65 ± 4 nm n = 74 parches	53 ± 4 nm n = 57 vesículas	91 ± 6 nm n = 72 parches	63 ± 5 nm n = 57 vesículas

Tabla 4.- Recopilación de los valores obtenidos de la movilidad de los parches de expresión de SNAP-25, SNAP-25 Δ9 y las vesículas asociadas a estas proteínas

En la tabla se han representado los valores de movilidad obtenidos en el eje X-Y y Z para cada una de las condiciones estudiadas.

El análisis del movimiento en el eje Z dio como resultado que las vesículas asociadas a los parches de expresión de la proteína alterada se localizaban a una distancia mayor del origen del campo evanescente en comparación con las asociadas a los parches de expresión de la proteína nativa (Figura 33 K), de manera similar a lo observado con los parches de expresión de SNAP-25 y SNAP-25 Δ9 (Figura 31 B). Las vesículas asociadas a los parches de expresión de la proteína nativa presentaron un movimiento oscilante con una probabilidad máxima de ser localizadas cerca de los 60 nm desde el origen del campo evanescente y un valor de Z promedio de 94 nm (94 ± 6 nm; n = 57 vesículas), mientras que las vesículas asociadas a los parches de expresión de la proteína alterada presentaron una probabilidad máxima de ser localizadas alrededor de los 140 nm y en valor de Z promedio de 140 nm (140 ± 8 nm; n = 72 vesículas) (Figura 33 K). Además, las vesículas asociadas a SNAP-25 Δ9 también presentaron una amplitud de movimiento mayor (ΔZ = 53 ± 4 nm para las vesículas asociadas a GFP-SNAP-25;

$\Delta Z = 63 \pm 5$ para las vesículas asociadas a GFP-SNAP-25 $\Delta 9$). En la tabla 4 se han representado los datos obtenidos en el eje Z de ambas proteínas SNARE y las vesículas asociadas a dichas proteínas.

Los datos analizados en este tipo de experimentos fueron obtenidos de medidas independientes de la dinámica de los parches de proteínas SNARE y las vesículas para evitar cualquier interferencia en la fluorescencia, es decir, se utilizó una longitud de onda de excitación para visualizar las proteínas y otra para visualizar las vesículas. Para estudiar si existía colocalización en el tiempo entre las proteínas SNARE y las vesículas, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 $\Delta 9$. A las 48 h, se incubaron las células con el marcador de vesículas ácidas lysotracker verde. A continuación, se tomaron secuencias temporales (60 s, 1 imag. /s) simultáneas de las proteínas SNARE y las vesículas mediante la utilización de un solo láser y el separador de luz emitida Optosplit II. El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 5.2).

Los resultados obtenidos pueden verse en la figura 34. Tanto A (DsRed-SNAP-25 / lysotracker verde) como B (DsRed-SNAP-25 $\Delta 9$ / lysotracker verde) reflejan la colocalización en el tiempo entre las proteínas SNARE, que pueden verse en rojo debido a la sobre-expresión de la proteína DsRed, y las vesículas asociadas a dichas proteínas, que pueden verse en verde debido al marcaje con lysotracker verde. Al mismo tiempo, de la comparación de ambas imágenes se puede apreciar como los parches de expresión de la proteína nativa y las vesículas asociadas a dichos parches apenas cambian su posición con el tiempo (A), mientras que los parches de expresión de la proteína alterada junto con las vesículas asociadas presentan una amplitud de movimiento mayor (B).

De los resultados obtenidos hasta el momento, se puede apoyar firmemente que la movilidad de las vesículas en la proximidad de la membrana plasmática está relacionada con las características dinámicas de los microdominios SNARE a los que se asocian. Además, el hecho de que la proteína SNARE alterada pase la mayor parte del tiempo alejada de la membrana plasmática, y que las vesículas se comporten de la misma manera, refuerza la idea de un papel importante de los microdominios SNARE, y con toda certeza de SNAP-25, en el atraque de las vesículas en las zonas de secreción de la membrana plasmática.

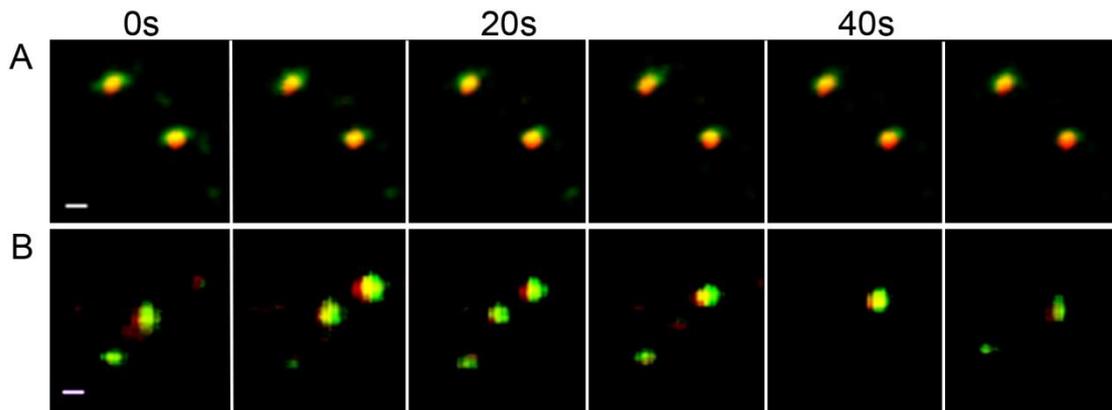


Figura 34. Colocalización en el tiempo de los parches de expresión de las proteínas SNARE y las vesículas cromafines

Se estudió la dinámica en el tiempo de los microdominios SNARE y las vesículas cromafines mediante la visualización de secuencias temporales (60 s; 1 imag. /s) adquiridas de manera simultánea mediante la técnica de TIRFM. En A y B se han representado dos secuencias temporales de 6 imágenes, separadas entre ellas 10 s, en las que se refleja la colocalización existente entre los parches rojos de expresión de DsRed-SNAP-25 (A) y DsRed-SNAP-25 Δ 9 (B) con las vesículas marcadas con lysotracker verde. Las barras representadas en A y B se corresponden con 1 μ m.

11.- El aumento en la concentración del calcio intracelular disminuye el movimiento de los parches de expresión de la proteína alterada

Teniendo en cuenta que la interacción entre sinaptotagmina 1 y SNAP-25 ocurre en la región C-term de SNAP-25, y que las células que han sido tratadas con NTBo/A recuperan una secreción normal si se produce un aumento en la concentración del calcio intracelular (Gerona y col., 2000), se decidió comprobar si un aumento en la concentración del calcio intracelular podría revertir la alta movilidad observada en los parches de expresión de SNAP-25 Δ 9 a movilidades semejantes a la de los parches de expresión de la proteína nativa.

Para ello, se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían la construcción pHSVpuc-GFP-SNAP-25 Δ 9. A las 48 h, se incubaron las células en un medio K/H basal y se adquirió una secuencia temporal de 60 s de duración (1 imag. /s) mediante la técnica de TIRFM (Figura 35 A). A continuación, se cambió el K/H basal (CaCl_2 2 mM) por un K/H alto calcio (CaCl_2 10 mM) con ionomicina 5 μ M y se dejaron las células incubando en este medio durante 5 min. Transcurrido ese tiempo, se adquirió otra secuencia temporal de 60 s de duración (1 imag. /s) (Figura 35 B). Se analizó el movimiento en el eje X-Y, Z, y el MSD de los parches de expresión de la proteína alterada de ambas secuencias temporales. El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 5.5) y en el protocolo de la figura 35.

En la figura 35 se ha representado una secuencia temporal de 6 imágenes, separadas entre ellas por intervalos de tiempo de 10 s, que ejemplarizan la movilidad de los parches de expresión de SNAP-25 $\Delta 9$ en condiciones normales (A), y otra secuencia temporal de la misma célula después de aumentar la concentración del calcio intracelular (B). De la comparación de ambas imágenes puede verse como el parche de expresión de SNAP-25 $\Delta 9$ marcado con una cruz en A cambia continuamente su posición respecto al punto central de la cruz, y como el mismo parche disminuye su movimiento en B al aumentar la concentración del calcio intracelular. En estas imágenes también se observa como al aumentar la concentración del calcio intracelular se produce un aumento global de la fluorescencia de la célula, indicativo de un acercamiento de los parches de expresión al origen del campo evanescente. De la comparación de los videos 4 y 5 de material complementario se ve con mayor claridad como disminuye el movimiento de los parches de expresión de SNAP-25 $\Delta 9$ al aumentar la concentración del calcio intracelular y como se acercan dichos parches a la membrana plasmática u origen del campo evanescente, ya que se ve un aumento claro en la intensidad de su fluorescencia. El video 4 se corresponde con la secuencia temporal de una célula (60 s; 1 imag. /s; 6x) que sobre-expresa GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ incubada en un medio K/H basal. El video 5 se corresponde con la misma célula después de ser incubada con un K/H alto calcio e ionomicina 5 μM durante 5 min (60 s; 1 imag. /s; 6x).

En la figura 35 también se ha representado la distribución de velocidades (C) y el MSD (D) obtenido para la proteína nativa, la alterada y esta última incubada en un medio K/H alto calcio (10 mM) e ionomicina (GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ / ionomicina). En la tabla 5 se han representado todos los datos de movilidad obtenidos.

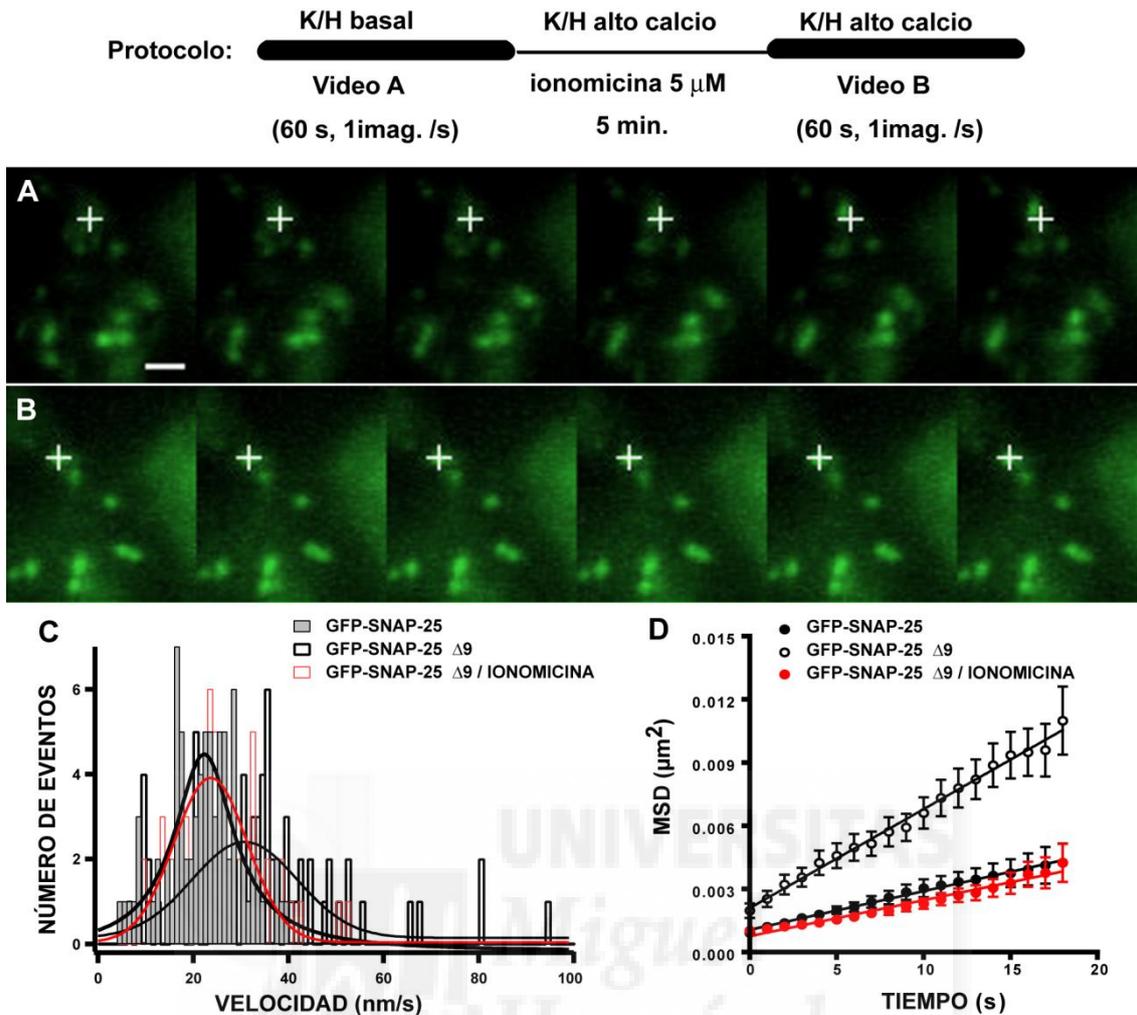


Figura 35. Caracterización del movimiento de los parches formados por la sobre-expresión de GFP-SNAP-25, GFP-SNAP-25 Δ 9 y GFP-SNAP-25 Δ 9 en células incubadas en un medio K/H alto calcio e ionomicina

Se estudió la dinámica de los microdominios formados por la sobre-expresión de SNAP-25 Δ 9 en células incubadas en un medio K/H basal (2 mM CaCl_2) (A) y de los mismos microdominios cuando se cambiaba a un medio K/H alto calcio (10 mM CaCl_2) e ionomicina 5 μ M (B) tal y como ha sido descrito en la metodología y en el protocolo de la figura. Las secuencias temporales representadas en A y B se encuentran separadas en el tiempo 10 s. En A aparece marcado con una cruz un parche de expresión de la proteína alterada y puede observarse como dicho parche varía su posición con el tiempo respecto al punto central de la cruz. En B puede observarse como el mismo parche ha disminuido su movimiento como consecuencia del aumento de la concentración del calcio intracelular. Para el cálculo del desplazamiento lateral se obtuvieron las coordenadas X-Y del centroide de los parches estudiados. Esto permitió calcular el desplazamiento lateral total (C) y el MSD (D). Los parches de expresión de la proteína nativa presentaron una movilidad restringida, siendo el valor de velocidad promedio de 22 ± 1 nm/s, mientras que los de la proteína alterada presentaron una velocidad menos restringida con un valor promedio de 36 ± 1 nm/s. Estos parches disminuyeron su velocidad a 25 ± 1 nm/s cuando se aumentó la concentración del calcio intracelular (GFP-SNAP-25 Δ 9 / ionomicina). Asumiendo que las partículas se movían mediante difusión simple, ya que su MSD se ajustó mejor a una recta, se calcularon los coeficientes de difusión que fueron de $4,6 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ para la proteína nativa ($n = 74$ parches de 29 células), $12 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ para la alterada ($n = 99$ parches de 33 células) y $4,3 \pm 0,1 \times 10^{-5}$ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ para la alterada incubada con alto calcio e ionomicina ($n = 79$ parches de 30 células) (D).

	GFP-SNAP-25	GFP-SNAP-25 $\Delta 9$	GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ / ionomicina
Velocidad X-Y	22 \pm 1 nm/s n = 74 parches	36 \pm 1 nm/s n = 99 parches	25 \pm 1 nm/s n = 79 parches
Coeficiente de difusión	D = 4,6 \pm 0,1 x 10 ⁻⁵ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ n = 74 parches de 29 células	D = 12,0 \pm 0,1 x 10 ⁻⁵ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ n = 99 parches de 33 células	D = 4,3 \pm 0,1 x 10 ⁻⁵ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ n = 79 parches de 30 células
Fracción de tiempo	40 nm n = 74 parches	100 nm n = 72 parches	80 nm n = 73 parches
Z promedio	92 \pm 6 nm n = 74 parches	130 \pm 8 nm n = 72 parches	107 \pm 6 nm n = 73 parches
ΔZ	65 \pm 4 nm n = 74 parches	91 \pm 6 nm n = 72 parches	50 \pm 3,1 nm n = 73 parches

Tabla 5.- Recopilación de los datos obtenidos de la movilidad de los parches de expresión de SNAP-25, SNAP-25 $\Delta 9$ y SNAP-25 $\Delta 9$ en células incubadas con un medio K/H alto calcio e ionomicina (GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ / ionomicina)

En la tabla se han representado los valores de movilidad obtenidos en el eje X-Y y Z para cada una de las condiciones estudiadas.

De la comparación de los resultados de la tabla 5, así como de los videos 4 y 5, se puede concluir que un aumento en la concentración del calcio intracelular revierte la alta movilidad de los parches de expresión de SNAP-25 $\Delta 9$ hasta movilidades propias de la proteína nativa.

12.- Las vesículas altamente móviles de células infectadas con SNAP-25 Δ 9 presentaron una baja probabilidad de fusión

Las células que expresaban la forma alterada de SNAP-25 presentaron claramente un aumento en la movilidad de los parches de expresión que se correlacionaba con un aumento en la movilidad de las vesículas cromafines asociadas a dichos parches, pero, ¿está afectando ese aumento en la movilidad de las vesículas a su capacidad de fusión?

Para contestar estas cuestiones se utilizó la sonda fluorescente naranja de acridina (NA). El NA es un colorante que cuando se encuentra en solución, unido a polianiones o en forma de monómeros emite fluorescencia verde, mientras que cuando se producen agregados del mismo emite fluorescencia roja. De este modo, cuando las células se incuban con este colorante, este se acumula y agrega en la matriz de las vesículas ácidas emitiendo fluorescencia roja que puede ser utilizada para 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, de manera que se pueden visualizar las fusiones vesiculares a modo de destellos de fluorescencia verde. Las propiedades del NA han sido descritas de manera detallada en la metodología (apartado 6).

Se infectaron células cromafines en cultivo con amplicones del HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 Δ 9. A las 48 h, se incubaron las células que emitían fluorescencia roja con NA 2 μ M. A continuación, se estimularon con un medio K/H alto potasio (KCl 59 mM) durante 60 s y se adquirieron secuencias temporales de esos 60 s mediante la técnica de TIRFM (1 imag. /20 ms; 2859 imágenes). La proteína DsRed y el NA se excitan con la misma longitud de onda. Esto permite que mediante la iluminación de la célula con una única longitud de onda y un separador de la luz emitida, el optosplit II, se pueda determinar simultáneamente la presencia de vesículas / SNAREs (canal de emisión en rojo; fluorescencia roja de las imágenes 36 A y B) y la fusión exocitótica (canal de emisión en verde; fluorescencia verde de las imágenes 36 A y B). El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 6).

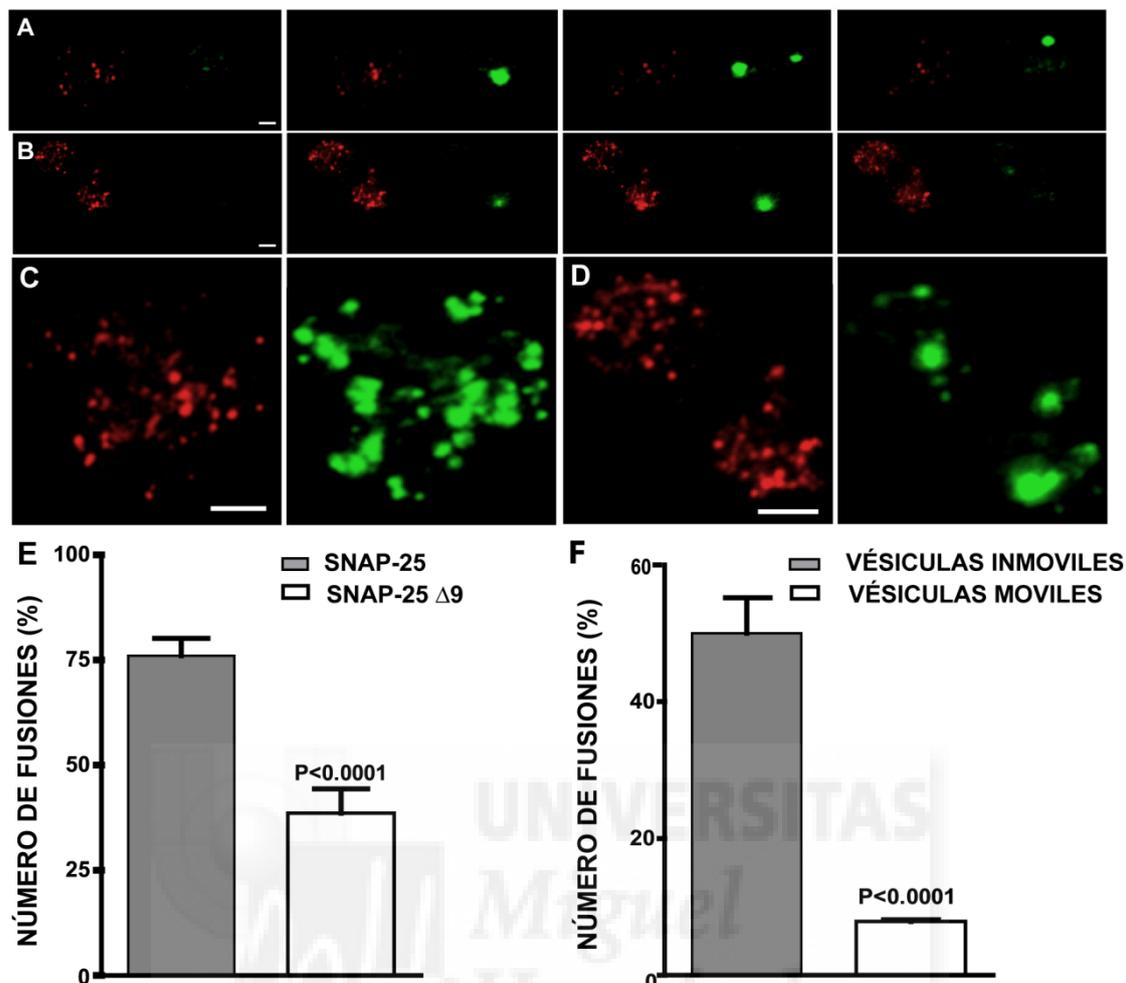


Figura 36. Las vesículas altamente móviles de células infectadas con la forma alterada de SNAP-25 presentan una baja probabilidad de fusión

Se infectaron células cromafines con amplicones del virus HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 Δ9. A las 48 h, se incubaron las células con NA y se visualizaron mediante la técnica de TIRFM tal y como ha sido descrito en la metodología. En A se ha representado una secuencia temporal de 4 imágenes, separadas entre ellas 20 s, de los parches de expresión de la proteína nativa y las vesículas en el canal de emisión del rojo (fluorescencia roja, imágenes de la ventana izquierda), y del NA o fusiones vesiculares en el canal de emisión del verde (fluorescencia verde, imágenes de la ventana derecha). En B se ha representado lo mismo para la proteína alterada. C y D se corresponden con las imágenes acumulativas obtenidas de la proteína nativa/vesículas (C: canal de emisión en rojo) y del NA (C: canal de emisión en verde), y de la proteína alterada/vesículas (D: canal de emisión en rojo) y del NA (D: canal de emisión en verde) (C y D: 60 s; 1 imag. /20ms; 2859 imágenes). Si se comparan las ventanas del canal de emisión en verde (C y D), puede observarse que se producen un mayor número de fusiones vesiculares cuando en las células se sobre-expresa la proteína nativa (C). Las imágenes acumulativas fueron utilizadas para calcular la probabilidad de fusión de las vesículas durante los 60 s de estimulación (E: 76 ± 4 % para la proteína nativa y 42 ± 6 % para la proteína alterada). En las células en las que se sobre-expresó la proteína alterada se realizó un estudio adicional de fusión de las vesículas moderadamente móviles frente a las altamente móviles. El 50 % de las vesículas moderadamente móviles (50 ± 5 %) se fusionaron frente al 8 % (de las vesículas con movilidad elevada 7,8 ± 0,2 %) (F). La barra representada en A, B y C se corresponde con 2 μm.

Se calculó el porcentaje de fusiones vesiculares mediante la imagen acumulativa o proyección Z obtenida del canal de emisión en verde (Figura 36 C y D; imágenes en verde), teniendo en cuenta el número total de vesículas calculado a partir de la imagen acumulativa del canal de emisión en rojo (Figura 36 C y D; imágenes en rojo). En las células en las que se sobre-expresó la proteína nativa, el 76 % de las vesículas se fusionaron durante el intervalo de tiempo de 60 s de estimulación (Figura 36 A, C y E, $76 \pm 4\%$, 515 fusiones de un total de 700 vesículas estudiadas en 14 células), mientras que en las células en las que se sobre-expresó la proteína alterada, únicamente se fusionaron el 42 % de las vesículas (Figuras 36 B, D y E, $42 \pm 6\%$, 434 fusiones de un total de 1029 vesículas estudiadas en 19 células), es decir, casi la mitad de las fusiones estimadas que cuando se infectaron las células con la proteína nativa.

Se observó que en las células en las que se expresaba la proteína alterada no todas las vesículas presentaban la misma movilidad. Se realizó un análisis con detalle de las fusiones vesiculares en estas células que dio como resultado que de las 1029 vesículas analizadas, el 19 % ($19 \pm 3\%$) presentaban una movilidad elevada y únicamente el 8 % ($7,8 \pm 0,2\%$) de esas vesículas se fusionaba (Figura 36 F: 15 fusiones en 191 vesículas altamente móviles), mientras que el 81 % ($81 \pm 3\%$) de las vesículas restantes presentaban una movilidad más moderada y una mayor probabilidad de fusión, concretamente el 50 % ($50 \pm 5\%$) de esas vesículas se fusionaron en el intervalo de tiempo de un minuto de estimulación (Figura 36 F: 419 fusiones en 838 vesículas con movilidad moderada). Para realizar estos cálculos consideramos que las vesículas presentaban una movilidad elevada a partir de los 30 nm/s de velocidad.

En el material complementario se han incluido dos videos representativos de las secuencias temporales obtenidas y utilizadas para realizar los análisis presentados. La duración de ambos videos es de 60 s y la frecuencia de adquisición de 1 imagen cada 20 ms. Los videos han sido acelerados 6 veces para su correcta visualización (6x). En el video 6 se pueden ver los parches de expresión de DsRed-SNAP-25 y las vesículas en la ventana izquierda de la imagen y las fusiones vesiculares en la ventana derecha. En el video 7 se pueden ver los parches de expresión de DsRed-SNAP-25 $\Delta 9$ y las vesículas en la ventana izquierda de la imagen y las fusiones vesiculares en la ventana derecha. De la comparación de ambos videos, se ve como hay un mayor número de fusiones vesiculares (ventana derecha de ambos videos) en la célula en la que se sobre-expresa la proteína nativa. Además, se ve como los parches de la imagen emitida en la ventana izquierda de la célula en la que se sobre-expresa la proteína nativa (video 6; SNAREs / vesículas), presentan un movimiento limitado característico de la expresión de esta proteína, mientras que en la misma ventana de la célula en la que se sobre-expresa la

proteína alterada, se observa un movimiento mayor producto de la expresión de esa proteína (video 7; SNAREs / vesículas) (compárense las ventanas izquierdas de ambos videos).

Se utilizaron las imágenes de las fusiones vesiculares para estudiar el nivel de secreción global de una célula. Para ello, se representó la fluorescencia máxima generada en el canal de emisión en verde frente al tiempo y dio como resultado registros como los representados en la figura 37. Tal y como se ha descrito, se observan un mayor número de fusiones vesiculares (espigas) cuando en la célula se sobre-expresa SNAP-25.

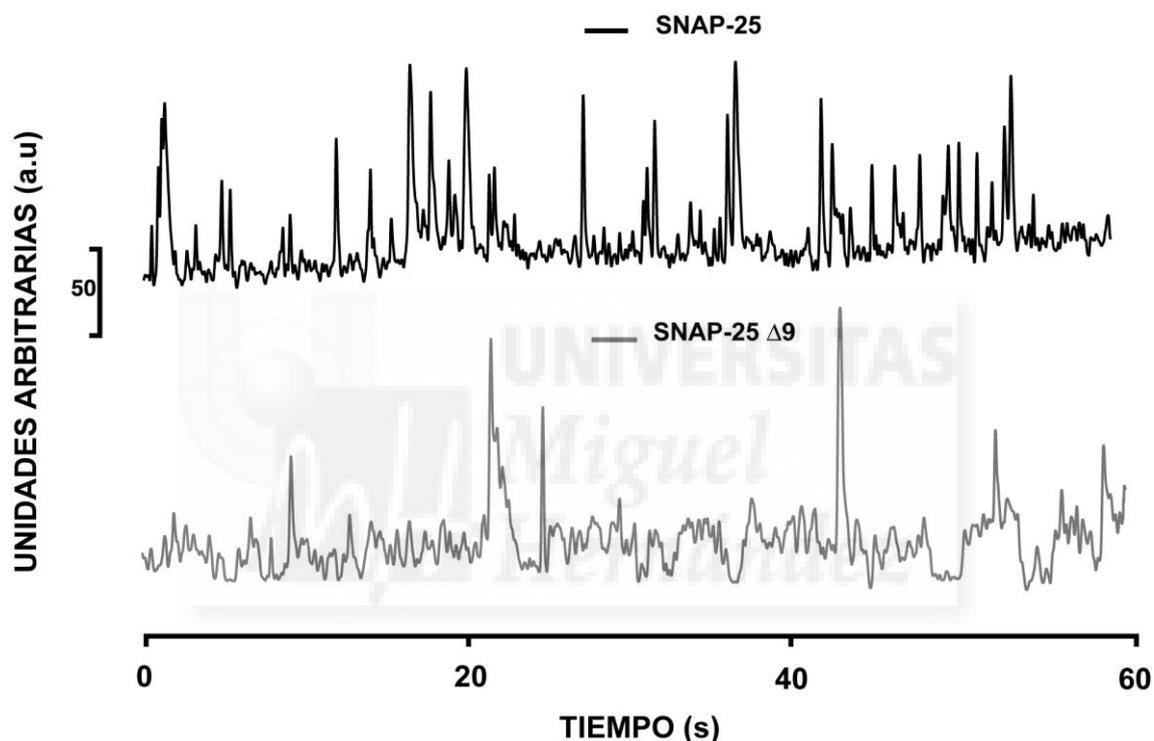


Figura 37: Las células infectadas con SNAP-25 Δ 9 presentan un menor número de espigas de fusión

Se infectaron células cromafines con amplicones del virus HVS-1 que contenían las construcciones pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 y pHSVpuc-DsRed-SNAP-25 Δ 9. A las 48 h, las células se incubaron con NA y se visualizaron mediante la técnica de TIRFM tal y como ha sido descrito en la metodología. Se representó la fluorescencia máxima generada en el canal de emisión en verde frente al tiempo que dio como resultado registros como los representados en la imagen. Si se comparan ambos registros se ve como hay un mayor número de fusiones vesiculares (espigas) cuando en las células se sobre-expresa SNAP-25.

De estos resultados se puede concluir que la sobre-expresión de SNAP-25 Δ 9 en las células, no sólo está influenciando el movimiento de las vesículas cromafines en la cercanía de la membrana plasmática, sino que también disminuye su probabilidad de fusión. Esto refuerza la idea de un papel importante de SNAP-25 no sólo en el atraque de las vesículas sino también en los últimos pasos de la secreción, la fusión vesicular.

13.- Las fusiones vesiculares son en promedio cinéticamente más lentas cuando se expresan los microdominios SNARE altamente móviles

Se observó que al generarse una espiga en el canal de emisión en verde, producto de la neutralización del naranja de acridina cuando es secretado al espacio extracelular, desaparecía la vesícula / SNARE que se encontraba en la misma posición en el canal de emisión en rojo. Esto se aprecia con claridad en la figura 38 A, B, C y D. En A y B puede observarse como uno de los parches correspondientes al marcaje de SNAP-25 / vesículas (A) desaparece cuando el naranja de acridina es secretado al exterior celular durante la fusión vesicular (B). En C y D se ve como ocurre lo mismo cuando en la célula se sobre-expresa SNAP-25 $\Delta 9$. Esto permitió utilizar las espigas bien resueltas, obtenidas de representar la fluorescencia máxima generada en el canal de emisión en verde frente al tiempo, para analizar la cinética de las fusiones vesiculares. En la figura 38 E se han representado dos ejemplos de estas espigas. El procedimiento detallado ha sido descrito en la metodología (apartado 6).

Se analizaron las fusiones vesiculares o espigas de cientos de vesículas en células en las que se sobre-expresó tanto la forma nativa como alterada de SNAP-25. De estas espigas se calculó el $t_{1/2}$, que es la anchura a la mitad de la altura del pico y un reflejo de la cinética de las fusiones vesiculares, y se realizó un análisis de su distribución (Figura 38 G). Las fusiones vesiculares en las células que expresaban la proteína nativa presentaron un valor promedio de $t_{1/2}$ de 178 ms (178 ± 7 ms; n = 370 fusiones en 22 células), mientras que en las células que expresaban la proteína alterada fueron en promedio más lentas, ya que presentaron un valor de $t_{1/2}$ de 219 ms (219 ± 9 ms; n = 342 fusiones en 29 células), representando un incremento pequeño pero estadísticamente significativo de aproximadamente un 23 % respecto a los datos obtenidos para la proteína nativa ($p < 0.001$; Figura 37 H, datos normalizados respecto a la proteína nativa: 100 ± 4 % para la proteína nativa; 123 ± 5 % para la alterada). En la figura 38 F se han representado las espigas resultantes de promediar todas las espigas analizadas, y como puede observarse, la forma de la espiga es mucho más estrecha cuando en la célula se sobre-expresa la proteína nativa.

Por tanto, estos resultados son indicativos de una cinética de fusión enlentecida cuando en las células se sobre-expresa SNAP-25 $\Delta 9$.

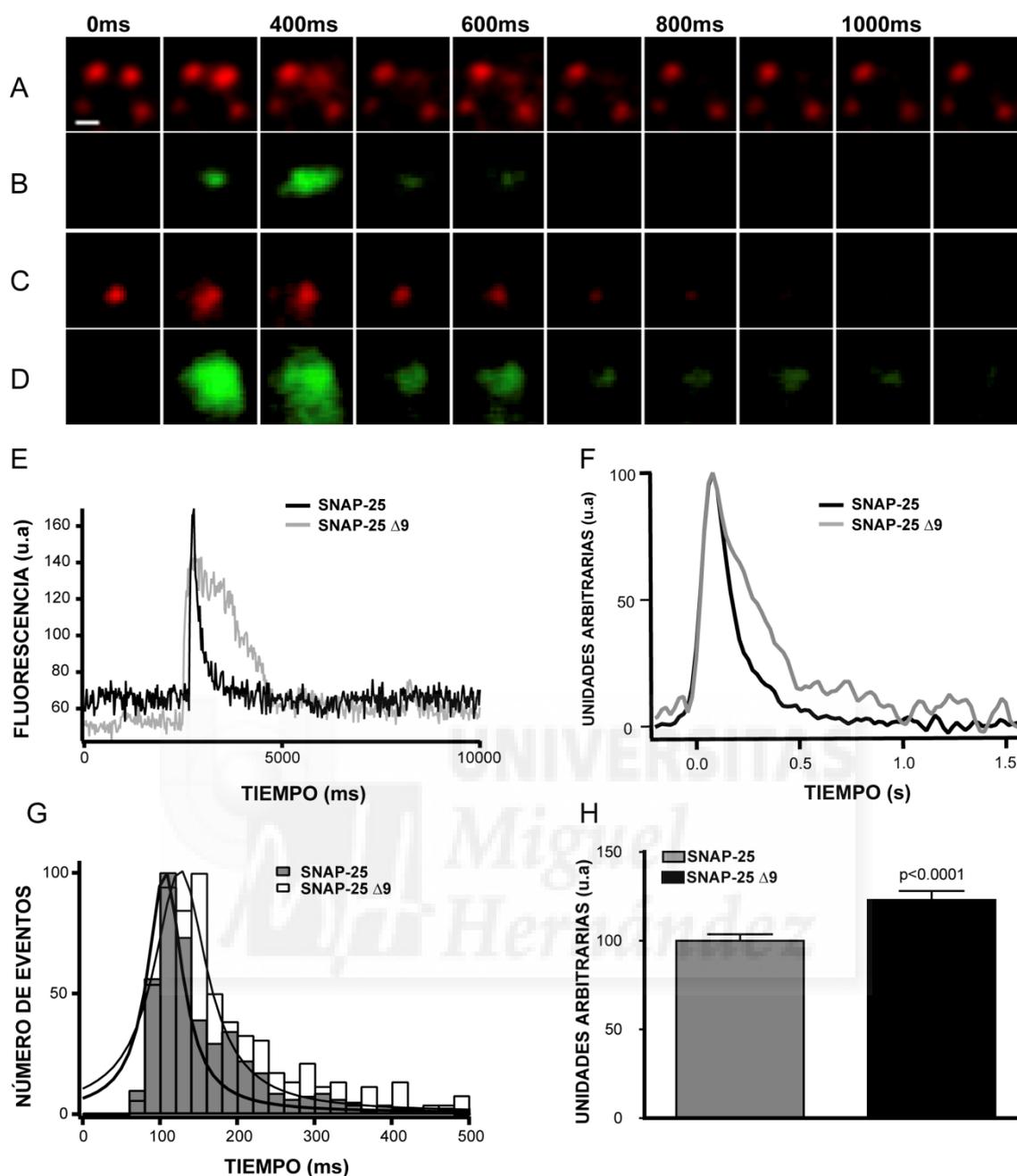


Figura 38. Las fusiones vesiculares son en promedio cinéticamente más lentas cuando se expresan los microdominios SNARE altamente móviles

Se analizó la cinética de las fusiones vesiculares en células que expresaban las construcciones SNARE. En las imágenes puede observarse que cuando se produce un destello de fluorescencia en el canal de emisión en verde, producto de la liberación del NA del interior de la vesícula al exterior celular, se produce la desaparición de una SNARE / vesícula del canal de emisión en rojo (A: DsRed-SNAP-25 / vesículas, B: NA; C: DsRed-SNAP-25 Δ 9 / vesículas, B: NA). En G se ha representado la distribución de los datos de $t_{1/2}$ obtenidos de analizar cientos de vesículas como las representadas en E. F se corresponde con la forma de las espigas generadas de promediar todas las fusiones vesiculares analizadas. La gráfica representada en H se corresponde con los promedios de $t_{1/2}$ obtenidos y normalizados respecto a la proteína nativa (100 ± 4 % para la proteína nativa, 370 fusiones analizadas en 22 células; 123 ± 5 % para la alterada, 342 fusiones en 29 células). La barra representada en A se corresponde con $1 \mu\text{m}$.



Discusión

DISCUSIÓN

1.- Caracterización de las zonas de secreción en un modelo neuroendocrino

Las neuronas poseen regiones especializadas en sus membranas presinápticas, denominadas zonas activas, donde las vesículas se acumulan y preparan para el proceso de fusión (Couteaux y Pecot-Dechavassine, 1970). Estas zonas, ricas en agrupaciones de canales de calcio dependientes de voltaje (CCDV) (Pumplin y col., 1981; Guthrie y col., 1991; Muller y Connor, 1991; Llinas y col., 1992), son de gran interés porque son las responsables del estrecho acoplamiento entre la excitación y la secreción ocurrido en la respuesta neuronal (Harlow y col., 1998). En estas células las zonas de entrada de calcio, denominadas puntos calientes, colocan con las zonas donde se produce la secreción o zonas activas (Matthews., 1996).

Las células cromafines secretan catecolaminas en zonas discretas de la membrana plasmática (Schroeder y col., 1994). En estas células, al igual que ocurre con las neuronas, las zonas de entrada de calcio también colocan con las zonas de secreción (Robinson y col., 1995 y 1996), lo que supone que los CCDV y las zonas de secreción no se organizan al azar.

Sin embargo, en las células neurosecretoras existe una demora de tiempo significativa entre la entrada de calcio y la secreción que no respalda la idea de una unión tan estrecha entre los distintos tipos de CCDV y las zonas de secreción como ocurre en las neuronas. Esta demora se atribuye al tiempo que tarda el calcio en difundir desde las zonas de entrada en la célula hasta las zonas donde se va a producir la secreción (Chow y col., 1992, 1994 y 1996; Klingauf y Neher, 1997), siendo esto indicativo de que las vesículas posiblemente se encuentran atracasadas a cierta distancia de las zonas de entrada del calcio.

Ya que la distribución espacial de los eventos de secreción en áreas discretas de la membrana plasmática sí es una consecuencia directa de la localización de las proteínas que median los procesos de fusión o proteínas SNARE (Söllner y col., 1993 b), nos planteamos investigar si son los CCDV o las proteínas SNARE, o ambos tipos de proteínas, los que definen las zonas de secreción en un modelo neuroendocrino como las células cromafines bovinas. Además, decidimos estudiar si existe una necesidad de proximidad entre los CCDV y las zonas de secreción dependiendo del tipo de preparación, es decir, dependiendo de si las células se encuentran aisladas mediante cultivo celular o agrupadas formando parte del tejido, ya que en este modelo celular se han realizado multitud de estudios pero en ninguno de ellos se muestran

evidencias de cómo se organizan las zonas de secreción en el tejido nativo, estando la mayoría de los datos presentados hasta el momento realizados en cultivos celulares. Teniendo en cuenta que las células al ser puestas en cultivo sufren profundos cambios en su fenotipo es difícil extrapolar con total seguridad los datos obtenidos en cultivo al tejido o animal intacto.

Elegimos la técnica de microscopía confocal para visualizar el marcaje, con diferentes anticuerpos, de células cromafines en cultivo y rodajas de médula adrenal por su amplio rango de aplicaciones. En primer lugar, la fuente de iluminación es temporal y focalizada en un solo punto de la muestra por lo que la imagen final se obtiene tras sucesivos barridos de la misma. En segundo lugar, la accesibilidad de la luz emitida al fotodetector está limitada por un diafragma (del inglés: "pinhole") que permite excluir la luz proveniente de puntos de la muestra que no se encuentran en el plano focal. Además, la utilización de un programa adecuado permite mejorar la calidad de la imagen por disminución de la sensibilidad de los fotodetectores a intensidades bajas de fluorescencia, con lo que se reduce el ruido de fondo. La combinación de la captación de imágenes en el plano focal con el software permite la utilización del microscopio confocal como un "microtomo óptico", lo cual posibilita la obtención de secciones ópticas de la muestra, base para la obtención de imágenes tridimensionales.

1.1.- Relación entre las proteínas SNARE y las zonas de secreción en las células cromafines bovinas

Lo primero que hicimos fue averiguar la relación espacial entre las proteínas SNARE, sintaxina 1A y SNAP-25, con las zonas de secreción en las células cromafines bovinas.

Una manera sencilla de visualizar las zonas de secreción en este modelo celular es mediante el seguimiento de la enzima dopamina β -hidroxilasa o DBH. Esta enzima tiene la particularidad de que, al encontrarse en la membrana de las vesículas cromafines, se incorpora a la membrana plasmática de la célula durante la secreción. Por este motivo, mediante un sencillo protocolo experimental se pueden marcar las zonas donde se fusionan las vesículas, o zonas de secreción, en la membrana plasmática de estas células.

Calculamos los porcentajes de colocalización entre ambas proteínas SNARE y las zonas de secreción (DBH) en células aisladas mediante cultivo celular (Figuras 13 y 14) y en células que se encontraban formando parte del tejido (Figura 18). Obtuvimos porcentajes en torno al 50 % cuando se trababa de las células en cultivo y superiores al 60 % en el caso de las rodajas de tejido. Estos porcentajes elevados son indicativos del alto nivel de colocalización existente entre los eventos de secreción y las proteínas SNARE en estas células, y contrastan con los

bajos porcentajes de colocalización obtenidos entre SNAP-25 y la proteína de membrana Na⁺/K⁺ ATPasa, situados en torno al 6-8 % dependiendo del tipo de preparación (Figura 19). Además, estos resultados son indicativos de una colocalización no inespecífica entre las proteínas SNARE y las zonas de secreción.

Un análisis más detallado de secciones polares de células cromafines en cultivo visualizadas a gran magnificación (100x 10x), nos reveló que las zonas de secreción se distribuían en la cara externa de la membrana plasmática separadas entre ellas una distancia de entre 0.5 y 2 μm . Los parches de fluorescencia correspondientes al marcaje de syntaxina 1A y los eventos de secreción (DBH) coincidieron en forma y tamaño y presentaron una distribución similar en cuanto a su área en ambos tipos de preparaciones, células en cultivo (Figura 15) y rodajas de médula adrenal (Figura 18). El valor de área promedio tanto para syntaxina 1A como para la DBH fue de 0.11 μm^2 en las células en cultivo y de 0.18 μm^2 en las rodajas de tejido.

Durante la visualización y análisis de este tipo de imágenes, nos dimos cuenta de que no toda la proteína SNARE disponible en la célula era ocupada para la secreción en un momento determinado (Figura 15 E y G; Figura 18 I). Esto nos hizo pensar que posiblemente el porcentaje de proteína utilizado para la secreción dependía del tipo de secretagogo utilizado para estimular la secreción de las células y de la intensidad del mismo. Utilizamos tres secretagogos diferentes para estimular la secreción de las células cromafines: el agonista fisiológico de estas células, acetilcolina; despolarización directa de las células mediante una solución con alto potasio, e iones de bario que pueden entrar en el citosol sin despolarizar la célula. Encontramos, para los tres secretagogos utilizados, un mayor porcentaje de syntaxina 1A libre en las células cuando se aplicó un estímulo corto, de 30 s de duración, que cuando por el contrario se aplicó uno más largo, concretamente de 5 min. de duración (Figuras 16 y 17, Tabla 3).

1.2.- Sintaxina 1A y SNAP-25 se encuentran formando microdominios estables en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas definiendo las zonas de secreción

El hecho de que la DBH coincidiera con ambas proteínas SNARE, nos sugirió que posiblemente sintaxina 1A y SNAP-25 se encontraban juntas en la membrana plasmática de las células cromafines formando microdominios.

Efectivamente, pudimos comprobar como ambas SNARE colocalizaban en la membrana plasmática de estas células en forma de parches con un diámetro promedio de unos 380 nm en las células en cultivo y unos 480 nm en las rodajas de medula adrenal (Figura 20), valores ligeramente superiores al diámetro promedio de un gránulo que se sitúa entre los 200 y los 400 nm dependiendo de si la célula es adrenérgica o noradrenérgica (Vitale y col., 1995; Giner y col., 2007). Por otro lado, el perfecto emparejamiento de la distribución del área de los parches de ambas proteínas en ambos tipos de preparaciones, también sugiere la interacción de ambas proteínas en la membrana plasmática de estas células. Los valores de área obtenidos en este trabajo para los microdominios SNARE se encuentran en concordancia con valores obtenidos en otros modelos celulares como las células PC12 (Lang y col., 2001) y las MIN6 β (Ohara-Imaizumi y col., 2004), y son ligeramente inferiores a valores obtenidos por otros autores en este modelo celular que se encuentran en torno a los 700 nm (Rickman y col., 2004 b).

Para asegurarnos de que sintaxina 1A y SNAP-25 se localizan en la membrana plasmática de estas células y no el interior celular, ya que de lo contrario no podríamos asegurar la formación de microdominios SNARE en la membrana plasmática celular, realizamos una reconstrucción tridimensional de una célula cromafín en cultivo en la que pudimos observar un marcaje preferencial de ambas proteínas en los límites de la célula característicos de la membrana plasmática (video 1 del material complementario; en este video se puede apreciar el marcaje de sintaxina 1A en verde y el de SNAP-25 en rojo).

Hasta el momento, hay un gran número de estudios en la bibliografía que demuestran la formación del complejo SNARE en los últimos pasos de la exocitosis molecular (Hayashi y col., 1994; Schiavo y col., 2000; Südhof, 2004); sin embargo, los eventos moleculares que llevan al ensamblaje de este complejo no están del todo claros y se han propuesto varias teorías que además se contradicen entre ellas.

Algunos estudios sugieren que en el camino de formación del complejo SNARE ternario se forma un intermediario binario, es decir, que sintaxina 1A y SNAP-25 formarían un heterodímero estable en la membrana plasmática de las células que actuaría como núcleo de interacción con VAMP-2 (Hu y col., 2002; Koh y Bellen, 2003; Rickman y col., 2004 b), de hecho, en líneas celulares en las que no se expresa sintaxina 1A, SNAP-25 se acumula en el citosol de estas células sin llegar a alcanzar la membrana plasmática (Vogel y col., 2000). Sin embargo, hay otros estudios que sugieren que sintaxina 1A y SNAP-25, aunque activas, no se encuentran formando un intermediario binario estable en la membrana plasmática de las células en reposo (Lang y col., 2002). Por último, también se ha propuesto que SNAP-25 se une primero a VAMP-2 y que la unión de sintaxina 1A es el elemento clave para la fusión de las membranas (Chen y col., 2001). De cualquier forma, no está del todo claro si se forma algún tipo de intermediario en el camino de formación del complejo SNARE.

De nuestros resultados previos, podíamos concluir que sintaxina 1A y SNAP-25 se encontraban formando microdominios en la membrana plasmática de las células cromafines definiendo las zonas de secreción, pero no podíamos saber si esos microdominios pre-existían en la membrana de las células en reposo o si por el contrario se formaban en el momento de la secreción. Si se formaban en el momento de la secreción, deberían cambiar algunos parámetros del marcaje observado de estas proteínas en la membrana plasmática antes y después de la secreción. Sin embargo, no observamos cambios significativos ni en el área ni en la densidad de los parches de sintaxina 1A y SNAP-25 antes y después del estímulo, o lo que es lo mismo, antes y después de la secreción en ninguna de las dos preparaciones (Figura 21).

Por tanto, podemos concluir que sintaxina 1A y SNAP-25 pre-existen en la membrana plasmática de las células cromafines definiendo las zonas de secreción, y además, podemos sugerir la formación de un intermediario estable entre sintaxina 1A y SNAP-25 en el camino de formación del complejo SNARE.

1.3.- Munc18-1 forma parte de los microdominios de proteínas SNARE

Lo siguiente que nos propusimos fue estudiar la ubicación de una de las principales proteínas reguladoras del complejo SNARE, Munc18-1. Se sabe que esta proteína se asocia con sintaxina 1A en la membrana plasmática de las células cromafines (Haynes y col., 1999) pero el papel que desempeña no está del todo claro y se han propuesto varias teorías.

Los primeros experimentos realizados *in vitro* indicaban que la unión de Munc18 a sintaxina era incompatible con la formación del complejo SNARE, atribuyendo un papel opuesto de esta proteína en la secreción (Pevsner y col., 1994; Yang y col., 2000). Sin embargo, estudios *in vivo* más recientes apoyan un doble papel facilitador de esta proteína en la secreción, concretamente en el atraque y la fusión de las vesículas (Fisher y col., 2001; Voets y col., 2001; Toonen y col., 2006). Por otro lado, también se le ha atribuido un papel indirecto en la exocitosis, ya que se ha visto que es fundamental para el tráfico de sintaxina 1A hacia la membrana plasmática (Rowe y col., 1999 y 2001).^o

Los elevados porcentajes de colocalización que obtuvimos entre SNAP-25 y Munc18-1, situados por encima del 60 %, nos sugerían que incluso después de que sintaxina 1A se asociase con SNAP-25 en la membrana plasmática de las células cromafines, Munc18-1 permanecía en el entorno de ambas proteínas (Figura 22). Estos porcentajes son indicativos de que no es necesario que sintaxina se disocie de Munc18 para unirse a SNAP-25 y discrepan de resultados obtenidos por algunos autores que sugieren que la unión de Munc18-1 a sintaxina 1A en su estado conformacional “cerrado” es un prerequisite para la “apertura” de sintaxina, y una vez en estado “abierto” es secretada y puede unirse a SNAP-25 permitiendo la formación del complejo SNARE (Dulubova y col., 1999; Misura y col., 2000).

Recientemente, se ha publicado un trabajo de Rickman y colaboradores (Rickman y col., 2007) que trata de integrar todas las funciones de Munc18 descritas hasta el momento. Según estos autores, Munc18-1 actuaría como un transportador de sintaxina 1A a la membrana plasmática en su conformación “cerrada”. Esto evitaría interacciones no productivas entre sintaxina 1A y SNAP-25 antes de llegar a su destino y explicaría porqué algunos autores atribuyen un papel negativo de esta proteína en la secreción. Una vez en la membrana plasmática, sintaxina 1A cambiaría su conformación a “abierto” bajo la regulación de ciertas proteínas o factores entre las que se baraja Munc13 (Richmond y col., 2001) y el ácido araquidónico (AA) (Rickman y Davletov, 2005). Dicho cambio conformacional permitiría la unión de sintaxina 1A a SNAP-25 para la formación de heterodímeros y por otro lado, seguiría

manteniendo su unión con Munc18 a través de su región N-term. Este complejo, formaría un andamiaje para las vesículas de manera que si falla se vería afectado el atraque de las vesículas a la membrana e incluso podría cambiar la dinámica del poro de fusión, dando una explicación razonable al papel positivo atribuido a esta proteína en la secreción.

Por lo tanto, la interacción de Munc18-1 con syntaxina 1A en diferentes conformaciones y espacios dentro de la célula podría explicar los múltiples y enfrentados papeles exhibidos por esta proteína y ofrecer una explicación razonable a los elevados porcentajes de colocalización que hemos obtenido entre SNAP-25 y Munc18-1 en la membrana plasmática de las células cromafines bovinas.

1.4.- Relación entre los microdominios de proteínas SNARE y los canales de calcio dependientes de voltaje

Una vez establecida la relación espacial entre las zonas de secreción y las proteínas SNARE en las células cromafines, decidimos estudiar la relación espacial existente entre las zonas de entrada de calcio en estas células y las proteínas SNARE, que como ha sido discutido con anterioridad marcan las zonas de secreción en este modelo celular.

En las células cromafines, la participación de cada uno de los subtipos de CCDV en la secreción de catecolaminas ha sido demostrada mediante diferentes técnicas (Artalejo y col., 1992; Albillos y col., 1993, Jiménez y col., 1993; Artalejo y col., 1994; Kim y col., 1995, Engisch y Nowycky, 1996; O'Farrell y col., 1997). Existe un consenso general de que en estas células se expresan todos los subtipos de CCDV de alto umbral, pero no está del todo claro la contribución de cada uno de ellos en la secreción (Lukyanetz y Neher, 1999). Dependiendo de la técnica y/o la especie utilizada el tipo de canal envuelto en la secreción muestra una amplia variedad (López y col., 1994 a y b; Kim y col., 1995; Engisch y Nowycky, 1996; Kitamura y col., 1998; García y col., 2006). Por otro lado, también se han encontrado grandes diferencias en cuanto al subtipo de canal acoplado a la secreción cuando se trata de células cromafines aisladas mediante cultivo celular o de la glándula intacta (Albillos y col., 2000; Benavides y col., 2004; Chan y col., 2005).

Los primeros experimentos realizados en este sentido fueron en células cromafines bovinas en cultivo. Mediante la utilización de anticuerpos específicos detectamos CCDV de tipo P/Q y L (Figura 23). Obtuvimos una colocalización parcial entre los CCDV y syntaxina 1A, en torno al 20 % para ambos tipos de canales (Figura 25). A pesar de los bajos porcentajes obtenidos, ambos marcajes se encontraban relativamente próximos, concretamente entre los

200 y los 400 nm de distancia, lo que significa que aunque no sea necesaria una interacción directa entre ambas proteínas sí parece ser necesaria cierta cercanía.

La distancia obtenida entre ambos tipos de proteínas podría explicar la demora de tiempo observada en las células neurosecretoras entre la entrada de calcio y la respuesta secretora, y respaldar la hipótesis de que en este tipo de células las vesículas se encuentran atracadas a cierta distancia de las zonas de entrada de calcio. Además, nuestros datos se encuentran en concordancia con varios estudios en los que empleando técnicas amperométricas (Chow y col., 1994), medidas de capacitancia (Zhou y Mislser, 1995), estimaciones matemáticas (Klingauf y Neher, 1997) y microscopía de onda evanescente (Becherer y col., 2003), llegaron a la conclusión de que en este tipo de células los CCDV y las zonas de secreción se encuentran a una distancia aproximada de unos 300 nm.

Realizamos el mismo marcaje en rodajas de médula adrenal y encontramos importantes diferencias con respecto a los resultados obtenidos en células. Detectamos CCDV de tipo P/Q, L y N (Figura 24) y obtuvimos porcentajes de colocalización con syntaxina 1A superiores al 60 % para los tres tipos de canales, es decir, tres veces superiores a los porcentajes de colocalización obtenidos en células (Figura 25).

Según los datos obtenidos, parece estar claro que se necesita un mayor acoplamiento entre los CCDV y las proteínas SNARE en las células que se encuentran formando parte del tejido que en las células aisladas mediante cultivo celular. Además, estos resultados podrían ofrecer una explicación racional para el rápido acoplamiento observado entre la respuesta secretora y la entrada de calcio en las células que se encuentran formando parte del tejido si son comparadas con células aisladas mediante cultivo celular (Moser y Neher., 1997; Albillos y col., 2000).

De todos modos, el significado fisiológico de la interacción entre las proteínas SNARE y los CCDV *in vivo* todavía no se conoce, y se baraja la propuesta de que esta interacción sirve para que colocalicen los sensores de calcio, las proteínas SNARE y las zonas de entrada de calcio de manera que se incremente la eficacia de la transmisión sináptica (Mochida y col., 1996; Rettig y col., 1997).

De la recopilación de nuestros datos, podemos sacar principalmente dos conclusiones. En primer lugar, se puede decir que en las células cromafines la localización espacial de los microdominios formados por sintaxina 1A y SNAP-25 es más importante para definir la zona donde se va a producir la secreción que la de los diferentes tipos de CCDV; y en segundo lugar, que existe una estrecha asociación entre los diferentes tipos de CCDV y los microdominios SNARE cuando las células se encuentran formando parte del tejido, asociación que se ve comprometida cuando son puestas en cultivo celular. Esta proximidad entre los microdominios SNARE y los diferentes subtipos de CCDV, antes y después de su aislamiento del tejido adrenal, debería explicar las diferencias encontradas en las características temporales de los procesos de secreción entre las células cromafines en cultivo y dichas células en su órgano nativo.

2.- Análisis del comportamiento de los microdominios SNARE en las células cromafines bovinas en cultivo y su relación con las vesículas cromafines

Lo siguiente que nos propusimos fue estudiar la dinámica de los microdominios SNARE y ver cómo afectaría una alteración en dichos microdominios a las vesículas cromafines.

Nuestra estrategia se basó en sobre-expresar SNAP-25 y SNAP-25 $\Delta 9$ en células cromafines de manera que compitiesen y sustituyesen la expresión endógena de SNAP-25. Se partió de un constructo de GFP o DsRed ligado al dominio N-term de la isoforma "a" de SNAP-25 (Bark y Wilson, 1994). Se eligió la región N-term porque al parecer es la menos crítica para su interacción con otras proteínas del complejo SNARE, ya que se sabe que la delección de los últimos 24 aminoácidos de esta zona no afecta a la formación del complejo (Hayashi y col., 1994; Gil y col., 2002). Una limitación potencial del trabajo podría ser el hecho de que la fusión de estas proteínas a SNAP-25 alterase sus propiedades. En un trabajo anterior de nuestro grupo en colaboración con el grupo del profesor Manuel Criado se comprobó, mediante la técnica de amperometría, como la construcción GFP-SNAP-25 presentaba la misma localización en la célula que la proteína endógena SNAP-25, y que la sobre-expresión de este constructo no afectaba ni a la exocitosis global ni a las fusiones individuales (Criado y col., 1999).

Como se ha mencionado con anterioridad, SNAP-25 $\Delta 9$ es el producto resultante de un tratamiento de las células con la NTBo/A. Las neurotoxinas botulínicas (NTBo) y la tetánica (NTTe) han sido herramientas fundamentales para entender las bases moleculares de la neurotransmisión, ya que se trata de proteasas con una especificidad absoluta por las distintas

proteínas del complejo SNARE (Montecucco y Schiavo, 1995). Concretamente, el uso de la NTBo/A en estudios bioquímicos y biofísicos de la exocitosis ha ayudado a esclarecer el papel de SNAP-25 en los diferentes estadios excitóticos. Sin embargo, estos estudios tienen algunas limitaciones, especialmente la dificultad que tiene la NTBo/A para proteolizar SNAP-25 cuando se encuentra formando parte del complejo SNARE (Hayashi y col., 1994; Xu y col., 1998), que enmascaran la intervención de esta proteína en el proceso de fusión excitótica. De este modo, la biología molecular supera algunas de las limitaciones del uso de las toxinas para inferir en el papel de esta proteína en la secreción vesicular.

Para visualizar las vesículas cromafines y los diferentes constructos SNARE, se eligió la técnica de microscopía de luz evanescente o TIRFM (Axelrod, 1981; Axelrod y col., 1984; Axelrod, 2001 b). Las características de esta técnica hacen que se utilice para múltiples aplicaciones dentro de la bioquímica y la biología molecular. Una de sus múltiples ventajas, es que permite visualizar la membrana plasmática y las partículas fluorescentes que se encuentran en contacto directo con ella o como mucho a pocos cientos de nanómetros de profundidad dependiendo de las características del equipo. De hecho, trabajos anteriores utilizando esta técnica han proporcionado por primera vez detalles cuantitativos del movimiento de las vesículas cromafines en la cercanía de la membrana plasmática de la célula antes y durante la secreción (Steyer y col., 1997; Oheim y col., 1998 y 1999; Steyer y Almers, 1999; Oheim y Stuhmer, 2000 b; Johns y col., 2001), y del comportamiento de las vesículas sinápticas en los terminales nerviosos (Zenisek y col., 2000). En la mayoría de estos trabajos, se han utilizado bases débiles que se acumulan en los compartimentos ácidos de la célula para marcar las vesículas. De esta forma, se pueden observar las vesículas fluorescentes y como desaparece su fluorescencia bajo la acción de un secretagogo si se fusionan con la membrana celular; además, se puede trazar el movimiento de estas vesículas en la superficie de la membrana antes de que desaparezcan (Steyer y col., 1997; Oheim y col., 1999; Steyer y Almers, 1999). Sin embargo, la mayoría de esos estudios han cuantificado aspectos del movimiento de las vesículas básicamente en el eje X-Y, de manera que en la actualidad se dispone de muy poca información sobre el movimiento de las vesículas en el eje Z (Johns y col., 2001).

En el presente trabajo evaluamos, no sólo el movimiento lateral y axial de las vesículas cromafines en la superficie de la membrana plasmática, sino que pasa con ese movimiento cuando estas vesículas se asocian a proteínas SNARE que han sido manipuladas genéticamente como SNAP-25 $\Delta 9$.

2.1- Estudio de la formación y dinámica de los microdominios SNARE

Lo primero que hicimos fue expresar los constructos GFP-SNAP-25 y GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ en células cromafines bovinas y visualizar dichas células mediante la técnica de TIRFM. Vimos como la expresión de estos constructos formaba parches en la membrana plasmática (Figura 26) en los que también se encontraban presentes syntaxina 1A (Figura 27) y VAMP-2 (Figura 28).

El diámetro promedio de los parches se encontraba en torno a los 500 y 600 nm (Figura 26), valores ligeramente superiores a los encontrados para estos microdominios en las células aisladas mediante cultivo celular, que se situaban en torno a los 380 nm, y prácticamente semejantes a los 480 nm encontrados en las células que formaban parte del tejido (Figura 20) (López y col., 2007). Se realizó un análisis de densidad de los parches y se vio que ambas proteínas presentaban densidades semejantes en la membrana plasmática de las células, siendo de 0.12 parches/ μm^2 para la proteína nativa y 0.14 parches/ μm^2 para la alterada.

A pesar de que ambas construcciones presentaron parámetros de área y densidad semejantes, las secuencias temporales adquiridas mediante la técnica de TIRFM (60 s, 1 imag. /s) revelaron una dinámica diferente de ambos microdominios SNARE. Cuando las células se infectaron con la proteína nativa, los parches de expresión que se formaron en la membrana plasmática permanecieron casi inmóviles; sin embargo, ese movimiento, aparentemente restringido, cambió considerablemente cuando en las células se sobre-expresó la proteína alterada, incrementando en casi el 50 % la velocidad promedio alcanzada por los parches de expresión de la proteína nativa y en dos puntos su coeficiente de difusión (Figuras 29 y 30; videos 2 (GFP-SNAP-25) y 3 (GFP-SNAP-25 $\Delta 9$) del material complementario). La velocidad promedio alcanzada por los parches de expresión de la proteína nativa fue de 22 nm/s, lo que significa que tardaron entre 22 y 28 s en recorrer su diámetro promedio de forma lineal, mientras que los parches de expresión de la proteína alterada tardaron casi la mitad, entre 13 y 17 s, ya que su velocidad promedio fue de 36 nm/s. Cualquiera de los parches estudiados raramente se movió en línea recta más allá de su diámetro durante el periodo de observación, ya que continuamente revertían su posición.

Las propiedades de la técnica de TIRFM hacen que sea particularmente sensible al movimiento de los parches en el eje Z. Mientras que los parches de expresión de la proteína nativa presentaron un movimiento oscilante con una probabilidad máxima de ser localizados cerca de los 40 nm desde el origen del campo evanescente y un valor promedio de distancia en el eje Z de unos 92 nm, los de la proteína alterada se situaron a una distancia aproximada del

origen del campo evanescente de unos 100 nm y presentaron un valor promedio de Z de 130 nm (Figura 31 A y B). Esto significa que los parches de expresión de la proteína alterada pasan más tiempo alejados del origen del campo evanescente y por lo tanto de las zonas de secreción.

Debido a que los parches de expresión de la proteína alterada también presentaron una amplitud de movimiento mayor en el eje Z (Figura 31 C y D), nos preguntamos si no sería debido a fluctuaciones en la membrana plasmática en lugar de al propio movimiento de los constructos. Comprobamos como la membrana plasmática no presentaba las mismas variaciones de intensidad de fluorescencia que los parches de expresión de la proteína alterada a los que se asociaba, lo que sugería que el movimiento observado era únicamente debido a cambios en la movilidad del complejo SNARE en el que se encontraba presente SNAP-25 Δ 9 (Figura 32).

El alineamiento de las hélices α de las tres proteínas SNARE puede ser con orientación paralela, de forma que los dominios N-term se encuentran próximos entre sí al igual que los dominios C-term; o antiparalela, en el que el dominio N-term de una hélice está cerca del dominio C-term de las otras. Cuando se formuló la hipótesis SNARE, se pensaba que la v- y las t-SNARE se ensamblaban con una orientación antiparalela, con sus anclajes de membrana embebidos en membranas opuestas de manera que harían de puente entre ambas membranas (Rothman, 1994). Sin embargo, estudios posteriores suministraron evidencias de que podían ensamblarse en paralelo (Nichols y col., 1997; Otto y col., 1997), mientras que otros trabajos más recientes han sugerido que *in vitro* pueden ensamblarse en ambas orientaciones (Weninger y col., 2003).

Una idea ampliamente discutida es que los complejos SNARE en conformación trans empiezan a ensamblarse de forma paralela desde la región N-term hacia la C-term como si se tratara de una cremallera (del inglés: "zippering"; Hanson y col., 1997), aproximando de esta forma la membrana de la vesícula y la membrana plasmática de la célula de manera que esa proximidad desencadene el mecanismo de fusión entre ambas membranas. Aunque se trata de una idea verdaderamente atractiva, las características del ensamblaje de las proteínas SNARE *in vitro* son difíciles de reconciliar con el papel de estas proteínas como catalizadoras de los últimos pasos de la fusión de las membranas, ya que se ha visto que promueven la fusión de liposomas pero de manera muy lenta (Weber y col., 1998). Esto podría ser debido a la formación de complejos SNARE no productivos, ya que cuando está presente sinaptobrevina se acelera la tasa de fusión (Melia y col., 2002). Posiblemente, la mejor evidencia de la formación de la cremallera tiene que ver con estudios bioquímicos y estructurales que indican que la región

proximal de las t-SNARE (C-term) se encuentra más estructurada cuando se unen a la v-SNARE (Fiebig y col., 1999; Melia y col., 2002). Sin embargo, aunque un gran número de trabajos son consistentes con el modelo de la cremallera hay una ventana abierta a interpretaciones alternativas.

En un estudio en el que se impedía el ensamblaje del complejo SNARE mediante la utilización de anticuerpos contra SNAP-25, se vio como consecuencia una inhibición del componente lento de la secreción de células cromafines bovinas. Esto fue atribuido a que el complejo SNARE podría existir en dos conformaciones en equilibrio dinámico, débil o abierta y fuerte o cerrada, ambas competentes para la exocitosis pero con diferentes afinidades por el calcio y por lo tanto con una cinética de secreción diferente (Xu y col., 1999).

Nuestros datos, junto con los datos publicados acerca de la menor termoestabilidad de los complejos SNARE cuando se encuentra presente SNAP-25 $\Delta 9$ (Gil y col., 2002), nos han llevado a la idea de que cuando en la célula se expresa la proteína alterada se favorece la formación de un complejo SNARE débil o en conformación abierta, y que dicha conformación da lugar a una amplitud de movimiento mayor como la detectada en nuestros experimentos de TIRFM.

2.2.- El movimiento de las vesículas cromafines se correlaciona con el movimiento de los microdominios SNARE a los que se asocian

Los resultados obtenidos hasta el momento, nos llevaron a pensar que una consecuencia importante de la formación de complejos SNARE con diferentes propiedades bioquímicas y dinámicas podría ser la alteración del movimiento de las vesículas cromafines en la proximidad de la membrana plasmática.

Efectivamente, al analizar el movimiento de aquellas vesículas que colocalizaban con los microdominios SNARE, vimos que su movimiento se correlacionaba con el movimiento de los parches de expresión a los que se encontraban asociadas (Figura 34). O lo que es lo mismo, las vesículas asociadas a los microdominios SNARE que contenían la proteína alterada presentaban una dinámica mayor; concretamente, se movían a una velocidad promedio en el eje X-Y de 30 nm/s en comparación con los 23 nm/s de velocidad de las vesículas asociadas a la proteína nativa (Figura 33). A modo de recordatorio, los valores de velocidad obtenidos para las proteínas SNARE fueron de 22 nm/s para la nativa y de 36 nm/s para la alterada (Figura 30). Los coeficientes de difusión también cambiaron de manera acorde (Figuras 30 y 33).

El análisis del movimiento en el eje Z, al igual que ocurría con los parches de expresión de las proteínas SNARE (Figura 31), dio como resultado que las vesículas asociadas a la proteína alterada se localizaban a una distancia mayor de la membrana plasmática (Figura 33; tabla 4). Concretamente, las vesículas asociadas a los parches de expresión de la proteína nativa presentaron un movimiento oscilante con una probabilidad máxima de ser localizadas cerca de los 60 nm desde el origen del campo evanescente y una distancia promedio en el eje Z de 94 nm, mientras que las vesículas asociadas a los parches de expresión de la proteína alterada presentaron una probabilidad máxima de ser localizadas alrededor de los 140 nm y un valor de Z promedio de 140 nm.

Los resultados que hemos obtenido podrían explicar los cambios observados en la tasa del movimiento lateral de las vesículas cromafines tratadas con la NTBo/A (Tsuboi y col., 2001); además, aclaran porqué las vesículas pasan poco tiempo en la proximidad de la membrana plasmática cuando las células son tratadas con esta toxina (Johns y col., 2001).

El hecho de que la proteína alterada pase la mayor parte del tiempo alejada de la membrana plasmática y de que las vesículas se comporten de la misma manera, refuerza la idea de un papel importante de SNAP-25 en el atraque de las vesículas cromafines como apoyan algunos estudios (Gutiérrez y col., 1995; Chieriegatti y col., 2002), y discrepa de algunos resultados que dan un papel importante a las proteínas SNARE únicamente en la fusión de las vesículas (Sorensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005). Además, nuestros datos ofrecen una explicación razonable a un trabajo reciente en el que discuten que se puede diferenciar entre una vesícula atracada (docking) y otra madura preparada para la secreción (priming) porque presentan diferencias en su movilidad (Nofal y col., 2007), pero yendo más allá, y sugiriendo que el responsable de esas diferencias son las diferentes conformaciones que puede adoptar el complejo SNARE.

En un estudio reciente realizado en células cromafines de ratón deficientes en Munc18, se vio como en estas células se ve afectado el atraque y la fusión de las vesículas cromafines y proponen dos mecanismos alternativos a lo que está ocurriendo. Según estos autores, podría ocurrir que las vesículas se atracasen en una plataforma formada por sintaxina/Munc18, o que Munc18 ayudara a la formación de heterodímeros de sintaxina 1A y SNAP-25 que servirán como plataforma para el atraque de las vesículas (Toonen y col., 2006). Por los resultados que nosotros hemos obtenido, apoyamos la formación de heterodímeros de sintaxina 1A y SNAP-25, posiblemente ayudados por Munc18, como los responsables del atraque y maduración de las vesículas, y como veremos más adelante, también de su fusión.

2.3.- El aumento en la concentración del calcio intracelular disminuye el movimiento de los parches de expresión de la proteína alterada

En 1977 se publicó un estudio en el que se vio como un aumento en la concentración del calcio intracelular podía sobreponer parcialmente el efecto paralítico de la NTBo/A en la unión neuromuscular (Lundh y col., 1977). Posteriormente, se vio que esta toxina disminuía la cooperatividad del calcio en la secreción de neurotransmisores y se sugirió que actuaba cerca de las zonas de acción del calcio, causando una menor eficacia de este catión en la secreción (Simpson, 1978). De la recopilación de los datos obtenidos en estos estudios clásicos se llegó a la conclusión de que la proteína sobre la que ejercía su acción la NTBo/A estaba ligada a la regulación de la neurotransmisión a partir de la concentración del calcio intracelular. Hoy en día, se sabe que la reversibilidad de los efectos de la NTBo/A debido a un aumento en la concentración del calcio intracelular es única, ya que no ha sido observada ni con la toxina tetánica ni el resto de las neurotoxinas botulínicas (Gerona y col., 2000).

Cuando se supo que la NTBo/A actuaba sobre SNAP-25, se relacionó a esta proteína como un efector importante para transmitir la señal de calcio al complejo SNARE a través del sensor de calcio sinaptotagmina, y se realizaron un gran número de estudios encaminados a encontrar la zona de interacción entre sinaptotagmina y el complejo de fusión. Muchos de estos trabajos señalaron una interacción, dependiente de calcio, entre sinaptotagmina 1 con monómeros de syntaxina 1 y SNAP-25 (Bennett y col., 1992; Chapman y col., 1995; Schiavo y col., 1997; Gerona y col., 2000), heterodímeros de syntaxina 1/SNAP-25 (Gerona y col., 2000; Rickman y col., 2004 a) y con sinaptobrevina cuando se encontraba formando parte del complejo SNARE (Davis y col., 1999; Gerona y col., 2000).

Parece ser que la interacción entre el complejo SNARE y sinaptotagmina 1 ocurre entre la región C-term de SNAP-25 y el dominio citoplasmático de sinaptotagmina 1, que es donde se encuentran los sensores de calcio. Además, el tratamiento de SNAP-25 con la NTBo/E, que proteoliza la región C-term de SNAP-25 liberando un péptido de 26 aminoácidos, abole completamente la interacción dependiente de la concentración de calcio entre SNAP-25 y sinaptotagmina 1, mientras que el tratamiento con la NTBo/A, que proteoliza los últimos nueve aminoácidos de SNAP-25, modifica la unión de sinaptotagmina 1 a SNAP-25 de manera que cambia su afinidad por esta proteína dependiendo de la concentración del calcio intracelular (Gerona y col., 2000).

Supongamos que la interacción entre sinaptotagmina 1 y SNAP-25 provoca un cambio conformacional dependiente de calcio en el complejo SNARE que hace que se cierre, aproximando las dos membranas que se van a fusionar entre sí e iniciando de esta manera la fusión. Una alteración en la región C-term de SNAP-25, que es la zona de interacción con sinaptotagmina 1, reduciría la eficacia de sinaptotagmina de transmitir la señal de calcio al complejo SNARE a través de SNAP-25. Si un complejo SNARE se encuentra en equilibrio dinámico entre dos estados conformacionales, uno más abierto que el otro, podría ocurrir que lo que provocara la transición entre las dos conformaciones fuese la concentración del calcio intracelular que el complejo siente a través de la interacción entre sinaptotagmina y SNAP-25. En este sentido, un complejo SNARE con una alteración en la región C-term de SNAP-25 pasaría más tiempo en estado conformacional abierto, ya que no sentiría el calcio de la misma manera que un complejo SNARE con la proteína SNAP-25 nativa. Si esto es cierto, un aumento en la concentración del calcio intracelular debería reducir el movimiento observado en los parches de expresión de la proteína alterada. En este sentido, se ha visto que células que han sido tratadas con NTBo/A y en las que se ve una inhibición parcial de la secreción (Xu y col., 1998), recuperan una secreción normal si se produce un aumento en la concentración del calcio intracelular (Gerona y col., 2000).

Para estudiar que ocurría en nuestro sistema, aumentamos la concentración del calcio intracelular en aquellas células en las que se sobre-expresaba SNAP-25 $\Delta 9$, y por lo tanto presentaban un elevado movimiento en sus parches de expresión. Observamos como al aumentar la concentración del calcio intracelular revertía la movilidad elevada de los parches de expresión de la proteína alterada a movilidades características de la proteína nativa; además, en la mayoría de los casos se producía un aumento de la fluorescencia de los parches, siendo esto indicativo de su acercamiento a la membrana plasmática (Figura 35; tabla 5; videos 4 (GFP-SNAP-25 $\Delta 9$) y 5 (GFP- SNAP-25 $\Delta 9$ / ionomicina) del material complementario).

Por tanto, un aumento en la concentración del calcio intracelular disminuye la alta movilidad observada en los parches de expresión donde se encuentra presente SNAP-25 $\Delta 9$ posiblemente porque provoca un cambio conformacional en el complejo SNARE hacia el estado cerrado. Estos datos refuerzan la idea de que el complejo SNARE puede existir en dos conformaciones en equilibrio dinámico, débil o abierta y fuerte y cerrada, ambas competentes para la exocitosis pero con diferentes afinidades por el calcio y por lo tanto, como veremos en el siguiente apartado, con una cinética de secreción diferente (Xu y col., 1999).

2.4.- La probabilidad de fusión de las vesículas disminuye en las células en las que se sobre-expresa la proteína alterada

Lo siguiente que nos planteamos fue estudiar si la dinámica de los microdominios SNARE estaba afectando a la fusión de las vesículas. Para ello, desarrollamos una estrategia experimental para analizar la cinética de las fusiones vesiculares basada en el incremento de fluorescencia generado tras la neutralización del naranja de acridina durante la exocitosis vesicular. Esta metodología es un análogo óptico a la detección de catecolaminas mediante la técnica de amperometría.

El hallazgo más sorprendente fue que las vesículas altamente móviles presentaron una baja probabilidad de fusión. En las células en las que se sobre-expresó la proteína alterada únicamente se fusionaron el 42 % de las vesículas en comparación con el 76 % de las fusiones observadas en las células en las que se sobre-expresó la proteína nativa. Además, en las que se sobre-expresó la proteína alterada las vesículas presentaban diferentes grados de movilidad correlacionados con su probabilidad de fusión. De hecho, de las 1029 vesículas estudiadas, 838 presentaron una movilidad moderada y un 50 % de estas vesículas se fusionaron durante el periodo de experimentación de 60 s, mientras que las 151 vesículas restantes presentaron una movilidad elevada y únicamente un 8 % de probabilidad de fusión (Figura 36).

Los datos presentados se encuentran en concordancia con trabajos recientes en los que se relaciona la movilidad de las vesículas con su estado de maduración y como consecuencia con su probabilidad de fusión, de manera que a medida que disminuye su movilidad en la membrana plasmática aumenta su probabilidad de fusión (Steyer y Almers, 1999; Oheim y Stuhmer, 2000 a; Johns y col., 2001; Nofal y col., 2007).

El papel exacto de las proteínas SNARE como parte de la maquinaria de fusión es un tema que en la actualidad presenta posturas encontradas. Originalmente, al complejo SNARE se le propuso el papel de atraque de las vesículas sinápticas en las denominadas zonas activas de la secreción (Tahara y col., 1998; Ungermann y col., 1998), pero luego, se vio que células tratadas con neurotoxinas tenían un atraque de sus vesículas aparentemente normal pero su fusión estaba bloqueada (Schiavo y col., 2000). En este sentido, algunos trabajos apuntan a un papel de las proteínas SNARE posterior al atraque, en los últimos pasos de la exocitosis (Sorensen y col., 2003; Borisovska y col., 2005; Sakaba y col., 2005). Sin embargo, estudios con la NTBo/A apuntan a que el complejo SNARE tiene un doble efecto, uno en etapas relativamente

tempranas de la secreción, afectando el atraque de las vesículas, y otro modificando el estallido exocitótico (Gil y col., 1998; Xu y col., 1998 y 1999).

La alteración de SNAP-25, aunque en menor medida, también tuvo un efecto en la cinética de la fusión, ya que en las células en las que se sobre-expresó la proteína alterada las fusiones vesiculares fueron en promedio cinéticamente más lentas (Figura 38), siendo esto indicativo de que SNAP-25 participa en el control o modulación de los últimos pasos de la exocitosis, la fusión vesicular.

Por lo tanto, por los datos que hemos obtenido, apoyamos un papel del complejo SNARE, y concretamente de SNAP-25, tanto en el atraque como en la fusión de las vesículas.

2.5.- Un modelo integrado de la función de los microdominios de proteínas SNARE en la exocitosis

El tema de los mecanismos moleculares de la exocitosis es un tema muy complejo en el que llevan trabajando un gran número de investigadores durante mucho tiempo. Hoy en día se conoce relativamente poco y de lo que se conoce quedan importantes lagunas por resolver. Nosotros nos hemos basado en algunos aspectos cruciales sobre el mecanismo de acción de las proteínas SNARE que no están del todo claros y por ello proponemos como punto final de esta tesis doctoral el siguiente modelo.

Bajo nuestro entender, el modelo más plausible sería sintaxina 1A y SNAP-25 se encontraran formando heterodímeros estables en la membrana plasmática de las células esperando la señal de calcio. Dicha señal se produciría a través de la unión, dependiente de calcio, entre el dominio citoplasmático de sinaptotagmina 1 y la región C-terminal de SNAP-25 y traería consigo la unión de VAMP para formar el complejo ternario e iniciar el proceso de fusión de la membrana de las vesículas y la membrana plasmática de la célula. En este sentido, se sabe que bajo la unión del calcio, los dominios de unión a calcio de sinaptotagmina penetran parcialmente en bicapas lipídicas que contienen fosfolípidos, en particular fosfatidilserina y PIP₂ (Chapman y Davis, 1998; Davis y col., 1999; Bai y col., 2002 y 2004 a; Südhof, 2004) y esto podría provocar un acercamiento entre la membrana de la vesícula y la membrana plasmática, acercando por lo tanto las membranas que se van a fusionar. Alternativamente, el calcio podría estimular la unión de sinaptotagmina a un complejo SNARE parcialmente cerrado, de manera que un aumento en la señal de calcio provocaría que el complejo se cerrara del todo acercando de esta forma las dos membranas que se van a fusionar y disminuyendo su movilidad.

Un complejo SNARE con una alteración en la región C-term de SNAP-25, que es la región de unión de SNAP-25 a sinaptotagmina, se quedaría en un estado conformacional abierto, o por lo menos, su transición al estado conformacional cerrado sería más lenta, ya que no sentiría el calcio de la misma manera que un complejo SNARE nativo. Esto ofrece una explicación razonable a la alta movilidad observada en los parches de expresión de SNAP-25 $\Delta 9$ y en las vesículas que se asocian a estos parches; además, explica porqué sigue habiendo un cierto porcentaje de vesículas que fusionan en función del grado de su movilidad y porqué cuando se fusionan lo hacen con una cinética enlentecida, consecuencia de una transición más lenta del estado conformacional abierto al cerrado (Figura 39). Por otro lado, también ofrece una explicación razonable de porqué en las células en las que se sobre-expresa SNAP-25 $\Delta 9$ se produce una disminución en la movilidad de los parches de expresión de esta proteína si se aumenta la concentración del calcio intracelular, ya que este aumento posiblemente provoca un cambio conformacional del complejo hacia el estado cerrado (Figura 39).

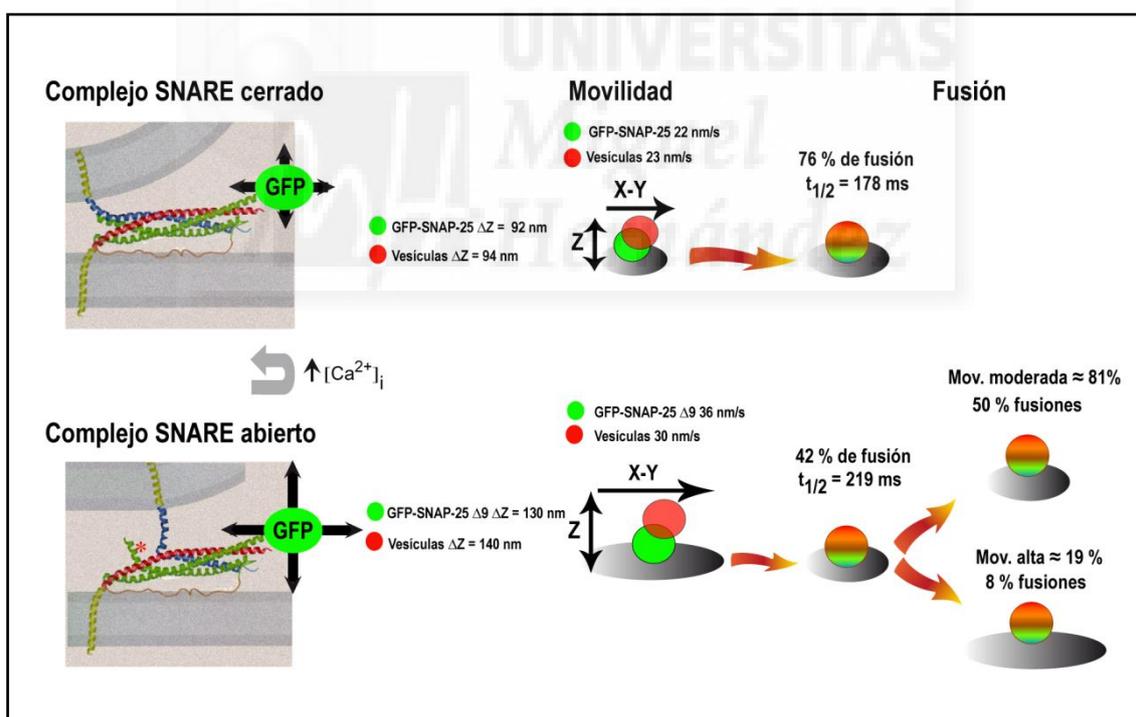


Figura 39. Modelo integrado de la función de los microdominios de proteínas SNARE en la excitación. * región alterada de SNAP-25.

En la figura se ha representado un complejo SNARE ternario cerrado y otro abierto. Además, se han representado algunos de los datos de movilidad y fusión obtenidos.





Conclusiones

CONCLUSIONES

1. Existe un nivel alto de colocalización entre los eventos de secreción y los parches de proteínas SNARE en las células cromafines bovinas tanto en cultivo como en rodajas de medula adrenal.
2. Sintaxina 1A y SNAP-25 forman microdominios en la membrana plasmática de las células cromafines que no cambian de área y densidad durante la secreción, siendo esto indicativo de que se encuentran pre-existentes en la membrana plasmática localizando la respuesta secretora.
3. No todos los microdominios de proteínas SNARE disponibles en la célula son utilizados para la secreción en un momento determinado. La intensidad y duración del estímulo aplicado para provocar la secreción condiciona el número de microdominios empleados para tal evento.
4. Los elevados porcentajes de colocalización observados entre Munc18-1 y SNAP-25 sugieren que, incluso después de que sintaxina 1A se asocie con SNAP-25, Munc18-1 permanece en el entorno de ambas proteínas.
5. La localización espacial de los microdominios formados por sintaxina 1A y SNAP-25 es más importante para definir la zona donde se va a producir la secreción en las células cromafines en cultivo que la de los diferentes tipos de CCDV.
6. Existe una estrecha asociación entre los diferentes tipos de CCDV y los microdominios SNARE en las células que se encuentran formando parte del tejido, asociación que se ve comprometida cuando estas células son puestas en cultivo celular.
7. La sobre-expresión de SNAP-25 y SNAP-25 $\Delta 9$ en las células cromafines da como resultado la formación de parches de expresión en la membrana plasmática de estas células en los que se encuentran presentes sintaxina 1A y VAMP-2.
8. Las células que sobre-expresan SNAP-25 $\Delta 9$ presentan un aumento en la movilidad lateral y axial de los parches de expresión de esta proteína, que además se correlaciona con un aumento en la movilidad de las vesículas cromafines que se asocian a dichos parches.

9. Un aumento en la concentración del calcio intracelular disminuye la movilidad de los parches de expresión de SNAP-25 $\Delta 9$ a movilidades semejantes a la de los parches de expresión de SNAP-25.
10. Las vesículas altamente móviles de células infectadas con la forma alterada de SNAP-25 presentan una baja probabilidad de fusión y en el caso de que fusionen lo hacen con una cinética enlentecida.





Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Albillos, A., García, A.G., y Gandía, L. (1993).** omega-Agatoxin-IVA-sensitive calcium channels in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 336, 259-262.
- Albillos, A., Neher, E., y Moser, T. (2000).** R-Type Ca²⁺ channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells. *J. Neurosci.* 20, 8323-8330.
- Aldea, M., Jun, K., Shin, H.S., Andrés-Mateos, E., Solís-Garrido, L.M., Montiel, C., García, A.G., y Albillos, A. (2002).** A perforated patch-clamp study of calcium currents and exocytosis in chromaffin cells of wild-type and alpha (1A) knockout mice. *J. Neurochem.* 81, 911-921.
- 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.
- Allersma, M.W., Bittner, M.A., Axelrod, D., y Holz, R.W. (2006).** Motion matters: secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis. *Mol. Biol. Cell* 17, 2424-2438.
- Álvarez, Y.D., Ibáñez, L.I., Uchitel, O.D., y Marengo, F.D. (2007).** P/Q Ca (2+) channels are functionally coupled to exocytosis of the immediately releasable pool in mouse chromaffin cells. *Cell Calcium*.
- Anderson, R.G., y Orci, L. (1988).** A view of acidic intracellular compartments. *J. Cell Biol.* 106, 539-543.
- Andrés-Mateos, E., Renart, J., Cruces, J., Solís-Garrido, L.M., Serantes, R., de Lucas-Cerrillo, A.M., Aldea, M., García, A.G., y Montiel, C. (2005).** Dynamic association of the Ca²⁺ channel alpha1A subunit and SNAP-25 in round or neurite-emitting chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* 22, 2187-2198.
- 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, A.R., García, A.G., y Neher, E. (1993).** Small-conductance Ca (2+)-activated K⁺ channels in bovine chromaffin cells. *Pflügers Arch.* 423, 97-103.
- Artalejo, C.R., Perlman, R.L., y Fox, A.P. (1992).** Omega-conotoxin GVIA blocks a Ca²⁺ current in bovine chromaffin cells that is not of the "classic" N type. *Neuron* 8, 85-95.
- 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.
- Atlas, D. (2001).** Functional and physical coupling of voltage-sensitive calcium channels with exocytotic proteins: ramifications for the secretion mechanism. *J. Neurochem.* 77, 972-985.
- Augustine, G.J. (2001).** How does calcium trigger neurotransmitter release? *Curr. Opin. Neurobiol.* 11, 320-326.
- Aunis, D., y Langley, K. (1999).** Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand.* 167, 89-97.
- 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.
- Axelrod, J. (1962).** Purification and properties of phenylethanolamine-N-methyl transferase. *J. Biol. Chem.* 237, 1657-1660.
- Bai, J., Wang, P., y Chapman, E.R. (2002).** C2A activates a cryptic Ca (2+)-triggered membrane penetration activity within the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1665-1670.
- Bai, J., Tucker, W.C., y Chapman, E.R. (2004 a).** PIP2 increases the speed of response of synaptotagmin and steers its membrane-penetration activity toward the plasma membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 36-44.
- Bai, J., Wang, C.T., Richards, D.A., Jackson, M.B., y Chapman, E.R. (2004 b).** Fusion pore dynamics are regulated by synaptotagmin^t-SNARE interactions. *Neuron* 41, 929-942.

- Baldelli, P., Hernández-Guijo, J.M., Carabelli, V., Novara, M., Cesetti, T., Andrés-Mateos, E., Montiel, C., y Carbone, E. (2004).** Direct and remote modulation of L-channels in chromaffin cells: distinct actions on alpha1C and alpha1D subunits? *Mol. Neurobiol.* 29, 73-96.
- Barg, S., Ma, X., Eliasson, L., Galvanovskis, J., Gopel, S.O., Obermuller, S., Platzer, J., Renstrom, E., Trus, M., Atlas, D., Striessnig, J., y Rorsman, P. (2001).** Fast exocytosis with few Ca (2+) channels in insulin-secreting mouse pancreatic B cells. *Biophys. J.* 81, 3308-3323.
- Bark, I.C. (1993).** Structure of the chicken gene for SNAP-25 reveals duplicated exon encoding distinct isoforms of the protein. *J. Mol. Biol.* 233, 67-76.
- Bark, I.C., y Wilson, M.C. (1994).** Human cDNA clones encoding two different isoforms of the nerve terminal protein SNAP-25. *Gene* 139, 291-292.
- Bark, I.C., Hahn, K.M., Ryabinin, A.E., y Wilson, M.C. (1995).** Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1510-1514.
- Barnard, R.J., Morgan, A., y Burgoyne, R.D. (1997).** Stimulation of NSF ATPase activity by alpha-SNAP is required for SNARE complex disassembly and exocytosis. *J. Cell Biol.* 139, 875-883.
- Basu, J., Shen, N., Dulubova, I., Lu, J., Guan, R., Guryev, O., Grishin, N.V., Rosenmund, C., Rizo, J. (2005).** A minimal domain responsible for Munc13 activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 1017-1018.
- Baumert, M., Maycox, P.R., Navone, F., De Camilli, P., y Jahn, R. (1989).** Synaptobrevin: an integral membrane protein of 18,000 daltons present in small synaptic vesicles of rat brain. *EMBO J.* 8, 379-384.
- Becherer, U., Moser, T., Stuhmer, W., y Oheim, M. (2003).** Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat. Neurosci.* 6, 846-853.
- Benavides, A., Calvo, S., Tornero, D., González-García, C., y Ceña, V. (2004).** Adrenal medulla calcium channel population is not conserved in bovine chromaffin cells in culture. *Neuroscience* 128, 99-109.
- 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.
- Bergsman, J.B., y Tsien, R.W. (2000).** Syntaxin modulation of calcium channels in cortical synaptosomes as revealed by botulinum toxin C1. *J. Neurosci.* 20, 4368-4378.
- Betz, A., Okamoto, M., Benseler, F., y Brose, N. (1997).** Direct interaction of the rat unc-13 homologue Munc13-1 with the N terminus of syntaxin. *J. Biol. Chem.* 272, 2520-2526.
- Bezprozvanny, I., Scheller, R.H., y Tsien, R.W. (1995).** Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378, 623-626.
- Bhattacharya, S., Stewart, B.A., Niemeyer, B.A., Burgess, R.W., McCabe, B.D., Lin, P., Boulianne, G., O'Kane, C.J., y Schwarz, T.L. (2002).** Members of the synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) family in *Drosophila* are functionally interchangeable in vivo for neurotransmitter release and cell viability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 13867-13872.
- Biales, B., Dichter, M., y Tischler, A. (1976).** Electrical excitability of cultured adrenal chromaffin cells. *J. Physiol* 262, 743-753.
- Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Südhof, T.C., Jahn, R., y Niemann, H. (1994).** Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinum neurotoxins. *J. Biol. Chem.* 269, 1617-1620.
- Blaschko, H. (1942).** The activity of l(-)-dopa decarboxylase. *J. Physiol* 101, 337-349.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Link, E., Binz, T., Yamasaki, S., De Camilli, P., Südhof, T.C., Niemann, H., y Jahn, R. (1993 a).** Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365, 160-163.
- Blasi, J., Chapman, E.R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H., y Jahn, R. (1993 b).** Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12, 4821-4828.
- Bock, J.B., Matern, H.T., Peden, A.A., y Scheller, R.H. (2001).** A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-841.
- Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T., y Rothman, J.E. (1988).** Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 7852-7856.
- 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, 2114-2126.

- Boschert, U., O'Shaughnessy, C., Dickinson, R., Tessari, M., Bendotti, C., Catsicas, S., y Pich, E.M. (1996).** Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *J. Comp Neurol.* 367, 177-193.
- Bournaud, R., Hidalgo, J., Yu, H., Jaimovich, E., y Shimahara, T. (2001).** Low threshold T-type calcium current in rat embryonic chromaffin cells. *J. Physiol* 537, 35-44.
- Breckenridge, L.J., y Almers, W. (1987).** Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. *Nature* 328, 814-817.
- Brose, N., Petrenko, A.G., Südhof, T.C., y Jahn, R. (1992).** Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256, 1021-1025.
- Bunge, M.B. (1973).** Fine structure of nerve fibers and growth cones of isolated sympathetic neurons in culture. *J. Cell Biol.* 56, 713-735.
- Burgess, S.W., McIntosh, T.J., y Lentz, B.R. (1992).** Modulation of poly(ethylene glycol)-induced fusion by membrane hydration: importance of interbilayer separation. *Biochemistry* 31, 2653-2661.
- Burgess, T.L., y Kelly, R.B. (1987).** Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3, 243-293.
- Burghardt, T.P., y Axelrod, D. (1981).** Total internal reflection/fluorescence photobleaching recovery study of serum albumin adsorption dynamics. *Biophys. J.* 33, 455-467.
- Burgoyne, R.D., y Morgan, A. (1993).** Regulated exocytosis. *Biochem. J.* 293 (Pt 2), 305-316.
- Butz, S., Fernández-Chacón, R., Schmitz, F., Jahn, R., y Südhof, T.C. (1999).** The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 274, 18290-18296.
- Catterall, W.A. (1999).** Interactions of presynaptic Ca²⁺ channels and snare proteins in neurotransmitter release. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 868, 144-159.
- Catterall, W.A. (2000).** Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 521-555.
- Catterall, W.A., Perez-Reyes, E., Snutch, P., y Striessnig, J. (2005).** International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol. Rev.* 57, 411-425.
- Ceña, V., Nicolas, G.P., Sanchez-Garcia, P., Kirpekar, S.M., Garcia, A.G. (1983).** Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience.* 10, 1455-1462.
- 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. U. S. A* 98, 5619-5624.
- Chan, S.A., Polo-Parada, L., y Smith, C. (2005).** Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices. *Arch. Biochem. Biophys.* 435, 65-73.
- 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. U. S. A* 94, 14423-14428.
- Chapman, E.R., An, S., Barton, N., y Jahn, R. (1994).** SNAP-25, a t-SNARE which binds to both syntaxin and synaptobrevin via domains that may form coiled coils. *J. Biol. Chem.* 269, 27427-27432.
- Chapman, E.R., Hanson, P.I., An, S., y Jahn, R. (1995).** Ca²⁺ regulates the interaction between synaptotagmin and syntaxin 1. *J. Biol. Chem.* 270, 23667-23671.
- Chapman, E.R., y Davis, A.F. (1998).** Direct interaction of a Ca²⁺-binding loop of synaptotagmin with lipid bilayers. *J. Biol. Chem.* 273, 13995-14001.
- Charvin, N., L'evêque, C., Walker, D., Berton, F., Raymond, C., Kataoka, M., Shoji-Kasai, Y., Takahashi, M., De Waard, M., y Seagar, M.J. (1997).** Direct interaction of the calcium sensor protein synaptotagmin I with a cytoplasmic domain of the alpha1A subunit of the P/Q-type calcium channel. *EMBO J.* 16, 4591-4596.
- Cheek, T.R., Jackson, T.R., O'Sullivan, A.J., Moreton, R.B., Berridge, M.J., y Burgoyne, R.D. (1989).** Simultaneous measurements of cytosolic calcium and secretion in single bovine adrenal chromaffin cells by fluorescent imaging of fura-2 in cocultured cells. *J. Cell Biol.* 109, 1219-1227.

- Chen, X., Tomchick, D.R., Kovrigin, E., Arac, D., Machius, M., Südhof, T.C., y Rizo, J. (2002).** Three-dimensional structure of the complexin/SNARE complex. *Neuron* 33, 397-409.
- Chen, Y.A., Scales, S.J., y Scheller, R.H. (2001).** Sequential SNARE assembly underlies priming and triggering of exocytosis. *Neuron* 30, 161-170.
- Chen, Y.A., y Scheller, R.H. (2001).** SNARE-mediated membrane fusion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 98-106.
- 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., Melikyan, G.B., y Chizmadzhev, Y.A. (1987).** Biomembrane fusion: a new concept derived from model studies using two interacting planar lipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 906, 309-352.
- Chieregatti, E., Witkin, J.W., y Baldini, G. (2002).** SNAP-25 and synaptotagmin 1 function in Ca²⁺-dependent reversible docking of granules to the plasma membrane. *Traffic*. 3, 496-511.
- Choi, A.Y., Cahill, A.L., Perry, B.D., y Perlman, R.L. (1993).** Histamine evokes greater increases in phosphatidylinositol metabolism and catecholamine secretion in epinephrine-containing than in norepinephrine-containing chromaffin cells. *J. Neurochem.* 61, 541-549.
- Chow, R.H., von Rüden, 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.
- Chow, R.H., Klingauf, J., y Neher, E. (1994).** Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 12765-12769.
- Chow, R.H., Klingauf, J., Heinemann, C., Zucker, R.S., y Neher, E. (1996).** Mechanisms determining the time course of secretion in neuroendocrine cells. *Neuron* 16, 369-376.
- Clary, D.O., Griff, I.C., y Rothman, J.E. (1990).** SNAPS, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709-721.
- Cocchia, D., y Michetti, F. (1981).** S-100 antigen in satellite cells of the adrenal medulla and the superior cervical ganglion of the rat. An immunochemical and immunocytochemical study. *Cell Tissue Res.* 215, 103-112.
- Cong, M., Perry, S.J., Hu, L.A., Hanson, P.I., Claing, A., y Lefkowitz, R.J. (2001).** Binding of the beta2 adrenergic receptor to N-ethylmaleimide-sensitive factor regulates receptor recycling. *J. Biol. Chem.* 276, 45145-45152.
- Coupland, R.E. (1965).** Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla. I. The ultrastructure and organization of chromaffin cells in the normal adrenal medulla. *J. Anat.* 99, 231-254.
- Coupland, R.E. (1968).** Determining sizes and distribution of sizes of spherical bodies such as chromaffin granules in tissue sections. *Nature* 217, 384-388.
- Couteaux, R., y Pecot-Dechavassine, M. (1970).** Synaptic vesicles and pouches at the level of "active zones" of the neuromuscular junction. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* 271, 2346-2349.
- Craxton, M. (2004).** Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes. *BMC. Genomics* 5, 43.
- Criado, M., Gil, A., Viniestra, S., y Gutiérrez, 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. U. S. A* 96, 7256-7261.
- Cuchillo-Ibanez, I., Michelena, P., Albillos, A., y García, A.G. (1999).** A preferential pole for exocytosis in cultured chromaffin cells revealed by confocal microscopy. *FEBS Lett.* 459, 22-26.
- Currie, K.P., y Fox, A.P. (1997).** Comparison of N- and P/Q-type voltage-gated calcium channel current inhibition. *J. Neurosci.* 17, 4570-4579.
- Davis, A.F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M.J., Lewis, J.L., y Chapman, E.R. (1999).** Kinetics of synaptotagmin responses to Ca²⁺ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. *Neuron* 24, 363-376.
- Darios, F y Davletov, B. (2006).** Omega-3 and omega-6 fatty acids stimulate cell membrane expansion by acting on syntaxin 3. *Nature* 444, 813-817.
- Del Castillo, J., y Katz, B. (1954).** Quantal components of the end-plate potential. *J. Physiol* 124, 560-573.
- DiAntonio, A., Burgess, R.W., Chin, A.C., Deitcher, D.L., Scheller, R.H., y Schwarz, T.L. (1993 a).** Identification and characterization of *Drosophila* genes for synaptic vesicle proteins. *J. Neurosci.* 13, 4924-4935.

- DiAntonio, A., Parfitt, K.D., y Schwarz, T.L. (1993 b).** Synaptic transmission persists in synaptotagmin mutants of *Drosophila*. *Cell* 73, 1281-1290.
- Diverse-Pierluissi, M., Dunlap, K., y Westhead, E.W. (1991).** Multiple actions of extracellular ATP on calcium currents in cultured bovine chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 1261-1265.
- 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.
- Douglas, W.W., y Poisner, A.M. (1965).** Preferential release of adrenaline from the adrenal medulla by muscarine and pilocarpine. *Nature* 208, 1102-1103.
- Douglas, W.W., Poisner, A.M., y Rubin, R.P. (1965).** Efflux of adenine nucleotides from perfused adrenal glands exposed to nicotine and other chromaffin cell stimulants. *J. Physiol* 179, 130-137.
- Douglas, W.W., Kanno, T., y Sampson, S.R. (1967 a).** Effects of acetylcholine and other medullary secretagogues and antagonists on the membrane potential of adrenal chromaffin cells: an analysis employing techniques of tissue culture. *J. Physiol* 188, 107-120.
- Douglas, W.W., Kanno, T., y Sampson, S.R. (1967 b).** Influence of the ionic environment on the membrane potential of adrenal chromaffin cells and on the depolarizing effect of acetylcholine. *J. Physiol* 191, 107-121.
- Douglas, W.W. (1968).** Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34, 451-474.
- Dreifuss, J.J. (1975).** A review on neurosecretory granules: their contents and mechanisms of release. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 248, 184-201.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernández, I., Südhof, T.C., y Rizo, J. (1999).** A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.* 18, 4372-4382.
- Elferink, L.A., Trimble, W.S., y Scheller, R.H. (1989).** Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *J. Biol. Chem.* 264, 11061-11064.
- Engisch, K.L., y Nowycky, M.C. (1996).** Calcium dependence of large dense-cored vesicle exocytosis evoked by calcium influx in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Neurosci.* 16, 1359-1369.
- 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. U. S. A* 95, 15781-15786.
- Fasshauer, D., Antonin, W., Margittai, M., Pabst, S., y Jahn, R. (1999).** Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J. Biol. Chem.* 274, 15440-15446.
- Fasshauer, D. (2003).** Structural insights into the SNARE mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 87-97.
- Fatt, P., y Katz, B. (1952).** Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol* 117, 109-128.
- Feldberg, W., Minz, B., y Tsudzimura, H. (1934).** The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *J. Physiol* 81, 286-304.
- Fenwick, E.M., Fajdiga, P.B., Howe, N.B., y Livett, B.G. (1978).** Functional and morphological characterization of isolated bovine adrenal medullary cells. *J. Cell Biol.* 76, 12-30.
- Fenwick, E.M., Marty, A., y Neher, E. (1982 a).** Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J. Physiol* 331, 599-635
- Fenwick, E.M., Marty, A., y Neher, E. (1982 b).** A patch-clamp study of bovine chromaffin cells and of their sensitivity to acetylcholine. *J. Physiol* 331, 577-597.
- Fernández, I., Arac, D., Ubach, J., Gerber, S.H., Shin, O., Gao, Y., Anderson, R.G., Südhof, T.C., y Rizo, J. (2001).** Three-dimensional structure of the synaptotagmin 1 C2B-domain: synaptotagmin 1 as a phospholipid binding machine. *Neuron* 32, 1057-1069.
- 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., Königstorfer, A., Gerber, S.H., García, J., Matos, M.F., Stevens, C.F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C., y Südhof, T.C. (2001).** Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410, 41-49.
- Ferro-Novick, S., y Jahn, R. (1994).** Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370, 191-193.

- Fiebig, K.M., Rice, L.M., Pollock, E., y Brunger, A.T. (1999).** Folding intermediates of SNARE complex assembly. *Nat. Struct. Biol.* 6, 117-123.
- Fischer-Colbrrie, R., Diez-Guerra, J., Emson, P.C., y Winkler, H. (1986).** Bovine chromaffin granules: immunological studies with antisera against neuropeptide Y, [Met]enkephalin and bombesin. *Neuroscience* 18, 167-174.
- Fisher, R.J., Pevsner, J., y Burgoyne, R.D. (2001).** Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. *Science* 291, 875-878.
- Foran, P., Lawrence, G.W., Shone, C.C., Foster, K.A., y Dolly, J.O. (1996).** Botulinum neurotoxin C1 cleaves both syntaxin and SNAP-25 in intact and permeabilized chromaffin cells: correlation with its blockade of catecholamine release. *Biochemistry* 35, 2630-2636.
- Fujita, T. (1988).** In "the paraneuron". Fujita, T., Kanno, T. y Kobayashi, S. Editors (Springer Verlag, Tokio) pp 135-144.
- Fujita, T. (1989).** Present status of paraneuron concept. *Arch. Histol. Cytol.* 52 *Suppl.*, 1-8.
- Gallwitz, D., y Jahn, R. (2003).** The riddle of the Sec1/Munc-18 proteins - new twists added to their interactions with SNAREs. *Trends Biochem. Sci.* 28, 113-116.
- García, A.G., Sala, F., Reig, J.A., Viniestra, S., Frias, J., Fonteriz, R., y Gandía. (1984).** Dihydropyridine BAY-K-8644 activates chromaffin cell calcium channels. *Nature* 309, 69-71.
- García, A.G., García-De-Diego, A.M., Gandía, L., Borges, R., y García-Sancho, J. (2006).** Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev.* 86, 1093-1131.
- García-Palomero, E., Cuchillo-Ibanez, I., García, A.G., Renart, J., Albillos, A., y Montiel, C. (2000).** Greater diversity than previously thought of chromaffin cell Ca²⁺ channels, derived from mRNA identification studies. *FEBS Lett.* 481, 235-239.
- Geller, A.I., During, M.J., Haycock, J.W., Freese, A. y Neve, R. (1993).** Long-term increases in neurotransmitter release from neuronal cells expressing a constitutively active adenylate cyclase from a herpes simplex virus type 1 vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90,7603-7607.
- Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F., y Südhof, T.C. (1994).** Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79, 717-727.
- Gerona, R.R., Larsen, E.C., Kowalchuk, J.A., y Martin, T.F. (2000).** The C terminus of SNAP25 is essential for Ca²⁺-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. *J. Biol. Chem.* 275, 6328-6336.
- Gerst, J.E. (1999).** SNAREs and SNARE regulators in membrane fusion and exocytosis. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 707-734.
- Gerst, J.E. (2003).** SNARE regulators: matchmakers and matchbreakers. *Biochim Biophys Acta.* 18, 99-110.
- Gil, A., Viniestra, S., y Gutiérrez, L.M. (1998).** Dual effects of botulinum neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* 10, 3369-3378.
- Gil, A., Viniestra, S., Neco, P., y Gutiérrez, L.M. (2001).** Co-localization of vesicles and P/Q Ca²⁺-channels explains the preferential distribution of exocytotic active zones in neurites emitted by bovine chromaffin cells. *Eur. J. Cell Biol.* 80, 358-365.
- Gil, A., Gutiérrez, L.M., Carrasco-Serrano, C., Alonso, M.T., Viniestra, 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.
- Giner, D., López, I., Villanueva, J., Torres, V., Viniestra, S., y Gutiérrez, L.M. (2007).** Vesicle movements are governed by the size and dynamics of F-actin cytoskeletal structures in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* 11, 659-669.
- Goldstein, M., Fuxe, K., Hokfelt, T., y Joh, T.H. (1971).** Immunohistochemical studies on phenylethanolamine-N-methyltransferase, dopa-decarboxylase and dopamine- β -hydroxylase. *Experientia* 27, 951-952.
- González, L., Jr., y Scheller, R.H. (1999).** Regulation of membrane trafficking: structural insights from a Rab/effector complex. *Cell* 96, 755-758.
- Grant, N.J., König, F., Aunis, D., y Langley, K. (1994).** Expression of GAP-43 (neuromodulin) during the development of the rat adrenal gland. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 82, 265-276.

- Grant, N.J., Hepp, R., Krause, W., Aunis, D., Oehme, P., y Langley, K. (1999).** Differential expression of SNAP-25 isoforms and SNAP-23 in the adrenal gland. *J. Neurochem.* 72, 363-372.
- Greenberg, A., y Zinder, O. (1982).** Alpha- and beta-receptor control of catecholamine secretion from isolated adrenal medulla cells. *Cell Tissue Res.* 226, 655-665.
- Guthrie, P.B., Segal, M., y Kater, S.B. (1991).** Independent regulation of calcium revealed by imaging dendritic spines. *Nature* 354, 76-80.
- Gutiérrez LM, Cànaves JM, Ferrer-Montiel AV, Reig JA, Montal M, Vinięgra S.(1995).** A peptide that mimics the carboxy-terminal domain of SNAP-25 blocks Ca(2+)-dependent exocytosis in chromaffin cells. *FEBS Lett.* 372, 39-43.
- Gutiérrez, L.M., Gil, A., y Vinięgra, S. (1998).** Preferential localization of exocytotic active zones in the terminals of neurite-emitting chromaffin cells. *Eur. J. Cell Biol.* 76, 274-278.
- Halachmi N., Lev Z (1996).** The Sec1 Family: A Novel Family of Proteins Involved in Synaptic Transmission and General Secretion. *J. Neurochem.* 66, 889-897.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., y Sigworth, F.J. (1981).** Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391, 85-100.
- Hanson, P.I., Otto, H., Barton, N., y Jahn, R. (1995).** The N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein and alpha-SNAP induce a conformational change in syntaxin. *J. Biol. Chem.* 270, 16955-16961.
- Hanson, P.I., Heuser, J.E., y Jahn, R. (1997).** Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. *Curr. Opin. Neurobiol.* 7, 310-315.
- Hata, Y., Slaughter, C.A., y Südhof, T.C. (1993).** Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347-351.
- Hata Y., Südhof TC. (1995).** A novel ubiquitous form of Munc-18 interacts with multiple syntaxins. Use of the yeast two-hybrid system to study interactions between proteins involved in membrane traffic. *J Biol Chem.* 270, 13022-13038.
- Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Südhof, T.C., y Niemann, H. (1994).** Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 13, 5051-5061.
- Hayashi, T., Yamasaki, S., Nauenburg, S., Binz, T., y Niemann, H. (1995).** Disassembly of the reconstituted synaptic vesicle membrane fusion complex in vitro. *EMBO J.* 14, 2317-2325.
- Haynes, L.P., Barnard, R.J., Morgan, A., y Burgoyne, R.D. (1998).** Stimulation of NSF ATPase activity during t-SNARE priming. *FEBS Lett.* 436, 1-5.
- Haynes, L.P., Morgan, A., y Burgoyne, R.D. (1999).** nSec-1 (munc-18) interacts with both primed and unprimed syntaxin 1A and associates in a dimeric complex on adrenal chromaffin granules. *Biochem. J.* 342 Pt 3, 707-714.
- Heinemann, C., Chow, R.H., Neher, E., y Zucker, R.S. (1994).** Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca²⁺. *Biophys. J.* 67, 2546-2557.
- Helle, K.B. (1971).** Biochemical studies of the chromaffin granule. II. Properties of membrane-bound and water-soluble forms of chromogranin A and dopamine- β -hydroxylase activity. *Biochim. Biophys. Acta* 245, 94-104.
- Helm, C.A., Israelachvili, J.N., y McGuiggan, P.M. (1992).** Role of hydrophobic forces in bilayer adhesion and fusion. *Biochemistry* 31, 1794-1805.
- Hillarp, N.A., y Hokfelt, B. (1953).** Evidence of adrenaline and noradrenaline in separate adrenal medullary cells. *Acta Physiol Scand.* 30, 55-68.
- Hirning, L.D., Fox, A.P., McCleskey, E.W., Olivera, B.M., Thayer, S.A., Miller, R.J., y Tsien, R.W. (1988).** Dominant role of N-type Ca²⁺ channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239, 57-61.
- Harlow, M., Ress D., Koster, A., Marshall, R.M., Schwarz, M., McMahan, U.J (1988).** Dissection of active zones at the neuromuscular junction by EM tomography. *J.Physiol.* 92, 75-78.
- Hodel, A. (1998).** SNAP-25. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 1069-1073.
- Hodel, A. (2001).** Effects of glucocorticoids on adrenal chromaffin cells. *J. Neuroendocrinol.* 13, 216-220.

- Hofmann, F., Lacinova, L., y Klugbauer, N. (1999).** Voltage-dependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol Biochem. Pharmacol.* 139, 33-87.
- Hohenstein, A.C., y Roche, P.A. (2001).** SNAP-29 is a promiscuous syntaxin-binding SNARE. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285, 167-171.
- Hohl, T.M., Parlati, F., Wimmer, C., Rothman, J.E., Söllner, T.H., y Engelhardt H. (1998).** Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. *Mol. Cell* 2, 539-548.
- Hollins, B., y Ikeda, S.R. (1996).** Inward currents underlying action potentials in rat adrenal chromaffin cells. *J. Neurophysiol.* 76, 1195-1211.
- Holt, M., Varoqueaux, F., Wiederhold, K., Takamori, S., Urlaub, H., Fasshauer, D., y Jahn, R. (2006).** Identification of SNAP-47, a novel Qbc-SNARE with ubiquitous expression. *J. Biol. Chem.* 281, 17076-17083.
- 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.
- Hu, K., Carroll, J., Rickman, C., y Davletov, B. (2002).** Action of complexin on SNARE complex. *J. Biol. Chem.* 277, 41652-41656.
- Huber, K. (2006).** The sympathoadrenal cell lineage: specification, diversification, and new perspectives. *Dev. Biol.* 298, 335-343.
- Hui, A., Ellinor, P.T., Krizanova, O., Wang, J.J., Diebold, R.J., y Schwartz, A. (1991).** Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the alpha 1 subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Neuron* 7, 35-44.
- Hui, E., Bai, J., Wang, P., Sugimori, M., Llinas, R.R., y Chapman, E.R. (2005).** Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 5210-5214.
- Iijima, T., Matsumoto, G., y Kidokoro, Y. (1992).** Synaptic activation of rat adrenal medulla examined with a large photodiode array in combination with a voltage-sensitive dye. *Neuroscience* 51, 211-219.
- Ikeda, M., Fahien, L.A., y Udenfriend, S. (1966).** A kinetic study of bovine adrenal tyrosine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 241, 4452-4456.
- Jackson, M.B., y Chapman, E.R. (2006).** Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 135-160.
- Jackson, M.B. (2007).** In search of the fusion pore of exocytosis. *Biophys. Chem.* 126, 201-208.
- Jackson, M.B., y Chapman, E.R. (2006).** Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 135-160.
- Jahn, R., Lang, T., y Südhof, T.C. (2003).** Membrane fusion. *Cell* 112, 519-533.
- Jankowski, J.A., Schroeder, T.J., Ciolkowski, E.L., y Wightman, R.M. (1993).** Temporal characteristics of quantal secretion of catecholamines from adrenal medullary cells. *J. Biol. Chem.* 268, 14694-14700.
- Jarvis, S.E., Barr, W., Feng, Z.P., Hamid, J., y Zamponi, G.W. (2002).** Molecular determinants of syntaxin 1 modulation of N-type calcium channels. *J. Biol. Chem.* 277, 44399-44407.
- Jiménez, R.R., López, M.G., Sancho, C., Maroto, R., y García, A.G. (1993).** A component of the catecholamine secretory response in the bovine adrenal gland is resistant to dihydropyridines and omega-conotoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191, 1278-1283.
- 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.
- Kajiwara, R., Sand, O., Kidokoro, Y., Barish, M.E., y Iijima, T. (1997).** Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn. J. Physiol* 47, 449-464.
- Kannan, R., Grant, N.J., Aunis, D., y Langley, K. (1996).** SNAP-25 is differentially expressed by noradrenergic and adrenergic chromaffin cells. *FEBS Lett.* 385, 159-164.
- Kanno, T. (1998).** Intra- and intercellular Ca²⁺ signaling in paraneurons and other secretory cells. *Jpn. J. Physiol* 48, 219-227.

- Kao, L.S., y Schneider, A.S. (1985).** Muscarinic receptors on bovine chromaffin cells mediate a rise in cytosolic calcium that is independent of extracellular calcium. *J. Biol. Chem.* 260, 2019-2022.
- Kao, L.S., y Schneider, A.S. (1986).** Calcium mobilization and catecholamine secretion in adrenal chromaffin cells. A Quin-2 fluorescence study. *J. Biol. Chem.* 261, 4881-4888.
- Kasai, H. (1999).** Comparative biology of Ca²⁺-dependent exocytosis: implications of kinetic diversity for secretory function. *Trends Neurosci.* 22, 88-93.
- Kee, Y., Lin, R.C., Hsu, S.C., y Scheller, R.H. (1995).** Distinct domains of syntaxin are required for synaptic vesicle fusion complex formation and dissociation. *Neuron* 14, 991-998.
- Keith, R.K., Poage, R.E., Yokoyama, C.T., Catterall, W.A., y Meriney, S.D. (2007).** Bidirectional modulation of transmitter release by calcium channel/syntaxin interactions in vivo. *J. Neurosci.* 27, 265-269.
- Kelly, R.B. (1985).** Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science* 230, 25-32.
- Khvotchev, M.V., y Südhof, T.C. (2004).** Stimulus-dependent dynamic homo- and heteromultimerization of synaptobrevin/VAMP and synaptophysin. *Biochemistry* 43, 15037-15043.
- Kim, S.J., Lim, W., y Kim, J. (1995).** Contribution of L- and N-type calcium currents to exocytosis in rat adrenal medullary chromaffin cells. *Brain Res.* 675, 289-296.
- Kitamura, N., Ohta, T., Ito, S., y Nakazato, Y. (1998).** Calcium channel current facilitation in porcine adrenal chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 435, 781-788.
- Kittler, J.T., Rostaing, P., Schiavo, G., Fritschy, J.M., Olsen, R., Triller, A., y Moss, S.J. (2001).** The subcellular distribution of GABARAP and its ability to interact with NSF suggest a role for this protein in the intracellular transport of GABA(A) receptors. *Mol. Cell Neurosci.* 18, 13-25.
- Klein, R.L., y Thureson-Klein, A. (1971).** An electron microscopic study of noradrenaline storage vesicles isolated from bovine splenic nerve trunk. *J. Ultrastruct. Res.* 34, 473-491.
- Klingauf, J., y Neher, E. (1997).** Modeling buffered Ca²⁺ diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells. *Biophys. J.* 72, 674-690.
- Knight, D.E., y Kesteven, N.T. (1983).** Evoked transient intracellular free Ca²⁺ changes and secretion in isolated bovine adrenal medullary cells. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 218, 177-199.
- Koh, T.W., y Bellen, H.J. (2003).** Synaptotagmin I, a Ca²⁺ sensor for neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 26, 413-422.
- Koval, L.M., Yavorskaya, E.N., y Lukyanetz, E.A. (2001).** Electron microscopic evidence for multiple types of secretory vesicles in bovine chromaffin cells. *Gen. Comp Endocrinol.* 121, 261-277.
- Kozlov, M.M., y Markin, V.S. (1983).** Possible mechanism of membrane fusion. *Biofizika* 28, 242-247.
- 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, 2202-2213.
- Lang, T., Margittai, M., Holzler, H., y Jahn, R. (2002).** SNAREs in native plasma membranes are active and readily form core complexes with endogenous and exogenous SNAREs. *J. Cell Biol.* 158, 751-760.
- Langley, O.K., y Aunis, D. (1984).** Ultrastructural immunocytochemical demonstration of D2-protein in adrenal medulla. *Cell Tissue Res.* 238, 497-502.
- Lara, B., Gandía, L., Martínez-Sierra, R., Torres, A., y García, A.G. (1998).** Q-type Ca²⁺ channels are located closer to secretory sites than L-type channels: functional evidence in chromaffin cells. *Pflugers Arch.* 435, 472-478.
- Lawrence, G.W., Foran, P., Mohammed, N., DasGupta, B.R., y Dolly, J.O. (1997).** Importance of two adjacent C-terminal sequences of SNAP-25 in exocytosis from intact and permeabilized chromaffin cells revealed by inhibition with botulinum neurotoxins A and E. *Biochemistry* 36, 3061-3067.
- Lazarides, E. (1976).** Actin, alpha-actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. *J. Cell Biol.* 68, 202-219.
- Lee, R.W., y Trifaró, J.M. (1981).** Characterization of anti-actin antibodies and their use in immunocytochemical studies on the localization of actin in adrenal chromaffin cells in culture. *Neuroscience* 6, 2087-2108.
- Lenzen, C.U., Steinmann, D., Whiteheart, S.W., y Weis, W.I. (1998).** Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* 94, 525-536.

- León, C., Grant, N., Aunis, D., y Langley, K. (1992 a).** L1 Cell Adhesion Molecule is Expressed by Noradrenergic but not Adrenergic Chromaffin Cells: A Possible Major Role for L1 in Adrenal Medullary Design. *Eur. J. Neurosci.* 4, 201-209.
- León, C., Grant, N.J., Aunis, D., y Langley, K. (1992 b).** Expression of cell adhesion molecules and catecholamine synthesizing enzymes in the developing rat adrenal gland. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 70, 109-121.
- Lerman, J.C., Robblee, J., Fairman, R., y Hughson, F.M. (2000).** Structural analysis of the neuronal SNARE protein syntaxin-1A. *Biochemistry* 39, 8470-8479.
- Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., el, F.O., Sato, K., Martin-Moutot, N., Newsom-Davis, J., Takahashi, M y Seagar, M.J. (1992).** The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 3625-3629.
- Leveque, C., el, F.O., Martin-Moutot, N., Sato, K., Kato, R., Takahashi, M., y Seagar, M.J. (1994).** Purification of the N-type calcium channel associated with syntaxin and synaptotagmin. A complex implicated in synaptic vesicle exocytosis. *J. Biol. Chem.* 269, 6306-6312.
- Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., y Udenfriend, S. (1965).** Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 148, 1-8.
- Lim, F., Hartley, D., Starr, P., Lang, P., Song, S., Yu, L., Wang, Y., y Geller, A.I. (1996).** Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. *Biotechniques* 20, 460-469.
- Lin, R.C., y Scheller, R.H. (1997).** Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* 19, 1087-1094.
- 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.
- Link, E., Edelmann, L., Chou, J.H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Südhof, T.C., Niemann, H., y Jahn, R. (1992).** Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 1017-1023.
- Liu, C., y Hermann, T.E. (1978).** Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.* 253, 5892-5894.
- Liu, Y., y Barlowe, C. (2002).** Analysis of Sec22p in endoplasmic reticulum/Golgi transport reveals cellular redundancy in SNARE protein function. *Mol. Biol. Cell* 13, 3314-3324.
- Livett, B.G. (1984).** Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol Rev.* 64, 1103-1161.
- Llinas, R., Sugimori, M., y Silver, R.B. (1992).** Microdomains of high calcium concentration in a presynaptic terminal. *Science* 256, 677-679.
- López, I., Giner, D., Ruiz-Ñuno, A., Fuentealba, J., Viniestra, S., García, A.G., Davletov, B., y Gutiérrez, L.M. (2007).** Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium* 41, 547-558.
- López, M.G., Albillos, A., De la Fuente, M.T., Borges, R., Gandía, L., Carbone, E., García, A.G., y Artalejo, A.R. (1994 a).** Localized L-type calcium channels control exocytosis in cat chromaffin cells. *Pflügers Arch.* 427, 348-354.
- López, M.G., Villarroya, M., Lara, B., Martínez, S.R., Albillos, A., García, A.G., y Gandía, L. (1994 b).** Q- and L-type Ca²⁺ channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells. *FEBS Lett.* 349, 331-337.
- Lukyanetz, E.A., y Neher, E. (1999).** Different types of calcium channels and secretion from bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2865-2873.
- Lundh, H., Leander, S., y Thesleff, S. (1977).** Antagonism of the paralysis produced by botulinum toxin in the rat. The effects of tetraethylammonium, guanidine and 4-aminopyridine. *J. Neurol. Sci.* 32, 29-43.
- Lynch, K.L., Gerona, R.R., Larsen, E.C., Marcia, R.F., Mitchell, J.C., y Martin, T.F. (2007).** Synaptotagmin C2A Loop 2 Mediates Ca²⁺-dependent SNARE Interactions Essential for Ca²⁺-triggered Vesicle Exocytosis. *Mol. Biol. Cell.*
- Malhotra, V., Orci, L., Glick, B.S., Block, M.R., y Rothman, J.E. (1988).** Role of an N-ethylmaleimide-sensitive transport component in promoting fusion of transport vesicles with cisternae of the Golgi stack. *Cell* 54, 221-227.
- Markin, V.S., y Albanesi, J.P. (2002).** Membrane fusion: stalk model revisited. *Biophys. J.* 82, 693-712.

- Marrink, S.J., y Mark, A.E. (2003).** The mechanism of vesicle fusion as revealed by molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 11144-11145.
- Martin, T.F. (1997).** Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol.* 7, 271-276.
- Martin-Moutot, N., Charvin, N., Leveque, C., Sato, K., Nishiki, T., Kozaki, S., Takahashi, M., y Seagar, M. (1996).** Interaction of SNARE complexes with P/Q-type calcium channels in rat cerebellar synaptosomes. *J. Biol. Chem.* 271, 6567-6570.
- Matthews G. (1996).** Neurotransmitter release. *Ann. Review, Neurosci.* 19, 219-233.
- Matveeva, E., y Whiteheart, S.W. (1998).** The effects of SNAP/SNARE complexes on the ATPase of NSF. *FEBS Lett.* 435, 211-214.
- McDonald, P.H., Cote, N.L., Lin, F.T., Premont, R.T., Pitcher, J.A., y Lefkowitz, R.J. (1999).** Identification of NSF as a beta-arrestin1-binding protein. Implications for beta2-adrenergic receptor regulation. *J. Biol. Chem.* 274, 10677-10680.
- McMahon, H.T., Bolshakov, V.Y., Janz, R., Hammer, R.E., Siegelbaum, S.A., y Südhof, T.C. (1996).** Synaptophysin, a major synaptic vesicle protein, is not essential for neurotransmitter release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 4760-4764.
- McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Söllner, T.H., y Rothman, J.E. (2000).** Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407, 153-159.
- McNew, J.A., Weber, T., Engelman, D.M., Söllner, T.H., y Rothman, J.E. (1999).** The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. *Mol. Cell* 4, 415-421.
- Melia, T.J., Weber, T., McNew, J.A., Fisher, L.E., Johnston, R.J., Parlati, F., Mahal, L.K., Söllner, T.H., y Rothman, J.E. (2002).** Regulation of membrane fusion by the membrane-proximal coil of the t-SNARE during zippering of SNAREpins. *J. Cell Biol.* 158, 929-940.
- Michel, B.M., Cotte, G., Picard, D., y Haon, A.M. (1963).** Ultrastructural cytology of the adrenal medulla of the golden hamster (*Cricetus auratus*). *Ann. Endocrinol. (Paris)* 24, 1044-1048.
- Misura, K.M., Scheller, R.H., y Weis, W.I. (2000).** Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature* 404, 355-362.
- Mochida, S., Sheng, Z.H., Baker, C., Kobayashi, H., y Catterall, W.A. (1996).** Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca²⁺ channels. *Neuron* 17, 781-788.
- Mochida, S., Westenbroek, R.E., Yokoyama, C.T., Zhong, H., Myers, S.J., Scheuer, T., Itoh, K., y Catterall, W.A. (2003).** Requirement for the synaptic protein interaction site for reconstitution of synaptic transmission by P/Q-type calcium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 2819-2824.
- Monck, J.R., y Fernández, J.M. (1992).** The exocytotic fusion pore. *J. Cell Biol.* 119, 1395-1404.
- Monck, J.R., y Fernández, J.M. (1994).** The exocytotic fusion pore and neurotransmitter release. *Neuron* 12, 707-716.
- Montecucco, C., y Schiavo, G. (1993).** Tetanus and botulinum neurotoxins: a new group of zinc proteases. *Trends Biochem. Sci.* 18, 324-327.
- Montecucco, C., y Schiavo, G. (1994).** Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* 13, 1-8.
- Montecucco, C., y Schiavo, G. (1995).** Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins. *Q. Rev. Biophys.* 28, 423-472.
- Morgan, A., Dimaline, R., y Burgoyne, R.D. (1994).** The ATPase activity of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is regulated by soluble NSF attachment proteins. *J. Biol. Chem.* 269, 29347-29350.
- Mori, Y., Friedrich, T., Kim, M.S., Mikami, A., Nakai, J., Ruth, P., Bosse, E., Hofmann, F., Flockerzi, V., Furuichi, T., Mikoshiba, K., Imoto, K., Tanabe, T y Numa, S. (1991).** Primary structure and functional expression from complementary DNA of a brain calcium channel. *Nature* 350, 398-402.
- Moser, T., y Neher, E. (1997).** Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J. Neurosci.* 17, 2314-2323.
- Mosharov, E.V., y Sulzer, D. (2005).** Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat. Methods* 2, 651-658.

- Muller, W., y Connor, J.A. (1991).** Dendritic spines as individual neuronal compartments for synaptic Ca²⁺ responses. *Nature* 354, 73-76.
- Neher, E., y Zucker, R.S. (1993).** Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10, 21-30.
- Neves, G., Neef, A., y Lagnado, L. (2001).** The actions of barium and strontium on exocytosis and endocytosis in the synaptic terminal of goldfish bipolar cells. *J. Physiol* 535, 809-824.
- Nichols, B.J., Ungermann, C., Pelham, H.R., Wickner, W.T., y Haas, A. (1997).** Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* 387, 199-202.
- Niemann, H., Blasi, J., y Jahn, R. (1994).** Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4, 179-185.
- Nishimune, A., Isaac, J.T., Molnar, E., Noel, J., Nash, S.R., Tagaya, M., Collingridge, G.L., Nakanishi, S., y Henley, J.M. (1998).** NSF binding to GluR2 regulates synaptic transmission. *Neuron* 21, 87-97.
- 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.
- Novick, P., Field, C., y Schekman, R. (1980).** Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.
- Ñeco, P., Gil, A., del Mar, F.M., Viniegra, S., y Gutiérrez, L.M. (2002).** The role of myosin in vesicle transport during bovine chromaffin cell secretion. *Biochem. J.* 368, 405-413.
- Ñeco, P., Giner, D., del Mar, F.M., Viniegra, S., y Gutiérrez, L.M. (2003).** Differential participation of actin- and tubulin-based vesicle transport systems during secretion in bovine chromaffin cells. *Eur. J. Neurosci.* 18, 733-742.
- Ñeco, P., Giner, D., Viniegra, S., Borges, R., Villarroel, A., y Gutiérrez, L.M. (2004).** New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 279, 27450-27457.
- O'Farrell, M., Ziogas, J., y Marley, P.D. (1997).** Effects of N- and L-type calcium channel antagonists and (+/-)-Bay K8644 on nerve-induced catecholamine secretion from bovine perfused adrenal glands. *Br. J. Pharmacol.* 121, 381-388.
- O'Sullivan, A.J., y Burgoyne, R.D. (1989).** A comparison of bradykinin, angiotensin II and muscarinic stimulation of cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Biosci. Rep.* 9, 243-252.
- 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 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Biol. Chem.* 279, 8403-8408.
- Oheim, M., Loerke, D., Stuhmer, W., y Chow, R.H. (1998).** The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur. Biophys. J.* 27, 83-98.
- Oheim, M., Loerke, D., Stuhmer, W., y Chow, R.H. (1999).** Multiple stimulation-dependent processes regulate the size of the releasable pool of vesicles. *Eur. Biophys. J.* 28, 91-101.
- Oheim, M., y Stuhmer, W. (2000 a).** Interaction of secretory organelles with the membrane. *J. Membr. Biol.* 178, 163-173.
- Oheim, M., y Stuhmer, W. (2000 b).** Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur. Biophys. J.* 29, 67-89.
- Olivera, B.M., Miljanich, G.P., Ramachandran, J., y Adams, M.E. (1994).** Calcium channel diversity and neurotransmitter release: the omega-conotoxins and omega-agatoxins. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 823-867.
- Olivos, L. y Artalejo, A.R. (2008).** Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol.* 192, 213-220.
- Otto, H., Hanson, P.I., y Jahn, R. (1997).** Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 6197-6201.
- 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.

- Pan, P.Y., Cai, Q., Lin, L., Lu, P.H., Duan, S., y Sheng, Z.H. (2005). SNAP-29-mediated modulation of synaptic transmission in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 280, 25769-25779.
- Parlati, F., McNew, J.A., Fukuda, R., Miller, R., Söllner, T.H., y Rothman, J.E. (2000). Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. *Nature* 407, 194-198.
- Patterson, P.H. (1990). Control of cell fate in a vertebrate neurogenic lineage. *Cell* 62, 1035-1038.
- Patzak, A., Bock, G., Fischer-Colbrie, R., Schauenstein, K., Schmidt, W., Lingg, G., y Winkler, H. (1984). Exocytotic exposure and retrieval of membrane antigens of chromaffin granules: quantitative evaluation of immunofluorescence on the surface of chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 98, 1817-1824.
- Pelham, H.R. (1999). SNAREs and the secretory pathway-lessons from yeast. *Exp. Cell Res.* 247, 1-8.
- Pereverzev, A., Leroy, J., Krieger, A., Malecot, C.O., Hescheler, J., Pfitzer, G., Klockner, U., y Schneider, T. (2002). Alternate splicing in the cytosolic II-III loop and the carboxy terminus of human E-type voltage-gated Ca(2+) channels: electrophysiological characterization of isoforms. *Mol. Cell Neurosci.* 21, 352-365.
- Perin, M.S., Fried, V.A., Mignery, G.A., Jahn, R., y Südhof, T.C. (1990). Phospholipid binding by a synaptic vesicle protein homologous to the regulatory region of protein kinase C. *Nature* 345, 260-263.
- Perlman, R.L., Cossi, A.F., y Role, L.W. (1980). Mechanisms of ionophore-induced catecholamine secretion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 213, 241-246.
- Pevsner, J., Hsu, S.C., Braun, J.E., Calakos, N., Ting, A.E., Bennett, M.K., y Scheller, R.H. (1994). Specificity and regulation of a synaptic vesicle docking complex. *Neuron* 13, 353-361.
- Phillips, J.H. (1982). Dynamic aspects of chromaffin granule structure. *Neuroscience* 7, 1595-1609.
- Phillips, J.H., Burridge, K., Wilson, S.P., y Kirshner, N. (1983). Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 97, 1906-1917.
- Phillips, J.H., y Pryde, J.G. (1987). The chromaffin granule: a model system for the study of hormones and neurotransmitters. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 493, 27-42.
- Plattner, H., Artalejo, A.R., y Neher, E. (1997). Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J. Cell Biol.* 139, 1709-1717.
- Protopopov, V., Govindan, B., Novick, P., y Gerst, J.E. (1993). Homologs of the synaptobrevin/VAMP family of synaptic vesicle proteins function on the late secretory pathway in *S. cerevisiae*. *Cell* 74, 855-861.
- Pumplin, D.W., Reese, T.S., y Llinas, R. (1981). Are the presynaptic membrane particles the calcium channels? *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7210-7213.
- 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.
- Ravichandran, V., Chawla, A., y Roche, P.A. (1996). Identification of a novel syntaxin- and synaptobrevin/VAMP-binding protein, SNAP-23, expressed in non-neuronal tissues. *J. Biol. Chem.* 271, 13300-13303.
- Rettig, J., Sheng, Z.H., Kim, D.K., Hodson, C.D., Snutch, T.P., y Catterall, W.A. (1996). Isoform-specific interaction of the alpha1A subunits of brain Ca2+ channels with the presynaptic proteins syntaxin and SNAP-25. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 7363-7368.
- Rettig, J., Heinemann, C., Ashery, U., Sheng, Z.H., Yokoyama, C.T., Catterall, W.A., y Neher, E. (1997). Alteration of Ca2+ dependence of neurotransmitter release by disruption of Ca2+ channel/syntaxin interaction. *J. Neurosci.* 17, 6647-6656.
- Rettig, J., y Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca++-triggered exocytosis. *Science* 298, 781-785.
- 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.
- Rickman, C., Archer, D.A., Meunier, F.A., Craxton, M., Fukuda, M., Burgoyne, R.D., y Davletov, B. (2004 a). Synaptotagmin interaction with the syntaxin/SNAP-25 dimer is mediated by an evolutionarily conserved motif and is sensitive to inositol hexakisphosphate. *J. Biol. Chem.* 279, 12574-12579.
- Rickman, C., Meunier, F.A., Binz, T., y Davletov, B. (2004 b). High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *J. Biol. Chem.* 279, 644-651.

- Rickman, C., y Davletov, B. (2005).** Arachidonic acid allows SNARE complex formation in the presence of Munc18. *Chem. Biol.* 12, 545-553.
- 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, 12097-12103.
- Risinger, C., Blomqvist, A.G., Lundell, I., Lambertsson, A., Nassel, D., Pieribone, V.A., Brodin, L., y Larhammar, D. (1993).** Evolutionary conservation of synaptosome-associated protein 25 kDa (SNAP-25) shown by *Drosophila* and *Torpedo* cDNA clones. *J. Biol. Chem.* 268, 24408-24414.
- Rizo, J., y Südhof, T.C. (2002).** Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nat. Rev. Neurosci.* 3, 641-653.
- Robinson, I.M., Finnegan, J.M., Monck, J.R., Wightman, R.M., y Fernández, J.M. (1995).** Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 2474-2478.
- Robinson, I.M., Yamada, M., Carrión-Vazquez, M., Lennon, V.A., y Fernández, J.M. (1996).** Specialized release zones in chromaffin cells examined with pulsed-laser imaging. *Cell Calcium* 20, 181-201.
- Rohrbough, J y Broadie, K (2005).** Lipid regulation of the synaptic vesicle cycle. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 139-150.
- Rothman, J.E. (1994).** Mechanisms of intracellular protein transport. *Nature* 372, 55-63.
- Rowe, J., Calegari, F., Taverna, E., Longhi, R., y Rosa, P. (2001).** Syntaxin 1A is delivered to the apical and basolateral domains of epithelial cells: the role of munc-18 proteins. *J. Cell Sci.* 114, 3323-3332.
- Rowe, J., Corradi, N., Malosio, M.L., Taverna, E., Halban, P., Meldolesi, J., y Rosa, P. (1999).** Blockade of membrane transport and disassembly of the Golgi complex by expression of syntaxin 1A in neurosecretion-incompetent cells: prevention by rbSEC1. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 12), 1865-1877.
- Saisu, H., Ibaraki, K., Yamaguchi, T., Sekine, Y., y Abe, T. (1991).** Monoclonal antibodies immunoprecipitating omega-conotoxin-sensitive calcium channel molecules recognize two novel proteins localized in the nervous system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 59-66.
- Sakaba, T., Stein, A., Jahn, R., y Neher, E. (2005).** Distinct kinetic changes in neurotransmitter release after SNARE protein cleavage. *Science* 309, 491-494.
- Sako, Y., Minoghchi, S., y Yanagida, T. (2000).** Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nat. Cell Biol.* 2, 168-172.
- Sakurai, T., Hell, J.W., Woppmann, A., Miljanich, G.P., y Catterall, W.A. (1995).** Immunochemical identification and differential phosphorylation of alternatively spliced forms of the alpha 1A subunit of brain calcium channels. *J. Biol. Chem.* 270, 21234-21242.
- Scales, S.J., Yoo, B.Y., y Scheller, R.H. (2001).** The ionic layer is required for efficient dissociation of the SNARE complex by alpha-SNAP and NSF. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14262-14267.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de, L.P., DasGupta, B.R., y Montecucco, C. (1992).** Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359, 832-835.
- Schiavo, G., Rossetto, O., Catsicas, S., Polverino de, L.P., DasGupta, B.R., Benfenati, F., y Montecucco, C. (1993 a).** Identification of the nerve terminal targets of botulinum neurotoxin serotypes A, D, and E. *J. Biol. Chem.* 268, 23784-23787.
- Schiavo, G., Santucci, A., DasGupta, B.R., Mehta, P.P., Jontes, J., Benfenati, F., Wilson, M.C., y Montecucco, C. (1993 b).** Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. *FEBS Lett.* 335, 99-103.
- Schiavo, G., Shone, C.C., Rossetto, O., Alexander, F.C., y Montecucco, C. (1993 c).** Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. *J. Biol. Chem.* 268, 11516-11519.
- Schiavo, G., Stenbeck, G., Rothman, J.E., y Söllner, T.H. (1997).** Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 997-1001.
- Schiavo, G., Matteoli, M., y Montecucco, C. (2000).** Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev.* 80, 717-766.
- Schmoranzler, J., Goulian, M., Axelrod, D., y Simon, S.M. (2000).** Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 149, 23-32.

- Schroeder, T.J., Jankowski, J.A., Senyshyn, J., Holz, R.W., y Wightman, R.M. (1994).** Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture. *J. Biol. Chem.* 269, 17215-17220.
- Shao, X., Li, C., Fernández, I., Zhang, X., Südhof, T.C., y Rizo, J. (1997).** Synaptotagmin-syntaxin interaction: the C2 domain as a Ca²⁺-dependent electrostatic switch. *Neuron* 18, 133-142.
- Sheng, Z.H., Rettig, J., Takahashi, M., y Catterall, W.A. (1994).** Identification of a syntaxin-binding site on N-type calcium channels. *Neuron* 13, 1303-1313.
- Sheng, Z.H., Rettig, J., Cook, T., y Catterall, W.A. (1996).** Calcium-dependent interaction of N-type calcium channels with the synaptic core complex. *Nature* 379, 451-454.
- Sheng, Z.H., Yokoyama, C.T., y Catterall, W.A. (1997).** Interaction of the synprint site of N-type Ca²⁺ channels with the C2B domain of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 5405-5410.
- Sheng, Z.H., Westenbroek, R.E., y Catterall, W.A. (1998).** Physical link and functional coupling of presynaptic calcium channels y the synaptic vesicle docking/fusion machinery. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 335-345.
- Silinsky, E.M. (1975).** On the association between transmitter secretion and the release of adenine nucleotides from mammalian motor nerve terminals. *J. Physiol* 247, 145-162.
- Simpson, L.L. (1978).** Pharmacological studies on the subcellular site of action of botulinum toxin type A. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 206, 661-669.
- Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., y Rothman, J.E. (1993 a).** A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409-418.
- Söllner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., y Rothman, J.E. (1993 b).** SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362, 318-324.
- Sorensen, J.B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R.B., Brose, N., Wilson, M.C., y Neher, E. (2003).** Differential control of the releasable vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell* 114, 75-86.
- Speier, S., y Rupnik, M. (2003).** A novel approach to in situ characterization of pancreatic beta-cells. *Pflugers Arch.* 446, 553-558.
- Starr, T.V., Prystay, W., y Snutch, T.P. (1991).** Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 5621-5625.
- Stauderman, K.A., y Pruss, R.M. (1990).** Different patterns of agonist-stimulated increases of 3H-inositol phosphate isomers and cytosolic Ca²⁺ in bovine adrenal chromaffin cells: comparison of the effects of histamine and angiotensin II. *J. Neurochem.* 54, 946-953.
- Stauderman, K.A., y Murawsky, M.M. (1991).** The inositol 1,4,5-trisphosphate-forming agonist histamine activates a ryanodine-sensitive Ca²⁺ release mechanism in bovine adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 266, 19150-19153.
- Steggmaier, M., Yang, B., Yoo, J.S., Huang, B., Shen, M., Yu, S., Luo, Y., y Scheller, R.H. (1998).** Three novel proteins of the syntaxin/SNAP-25 family. *J. Biol. Chem.* 273, 34171-34179.
- Steel, G.J., y Morgan, A. (1998).** Selective stimulation of the D1 ATPase domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) by soluble NSF attachment proteins. *FEBS Lett.* 423, 113-116.
- Stevens, D.R., Wu, Z.X., Matti, U., Junge, H.J., Schirra, C., Becherer, U., Wojcik, S.M., Brose, N., Rettig, J. (2005).** Identification of the minimal protein domain required for priming activity of Munc13-1. *Curr. Biol.* 15, 2243-2248.
- Stewart, L.C., y Klinman, J.P. (1988).** Dopamine beta-hydroxylase of adrenal chromaffin granules: structure and function. *Annu. Rev. Biochem.* 57, 551-592.
- Steyer, J.A., Horstmann, H., y Almers, W. (1997).** Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388, 474-478.
- Steyer, J.A., y Almers, W. (1999).** Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 76, 2262-2271.
- Steyer, J.A., y Almers, W. (2001).** A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 268-275.
- Su, Q., Mochida, S., Tian, J.H., Mehta, R., y Sheng, Z.H. (2001).** SNAP-29: a general SNARE protein that inhibits SNARE disassembly and is implicated in synaptic transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 14038-14043.

- Südhof, T.C., Baumert, M., Perin, M.S., y Jahn, R. (1989).** A synaptic vesicle membrane protein is conserved from mammals to *Drosophila*. *Neuron* 2, 1475-1481.
- Südhof, T.C. (1995).** The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375, 645-653.
- Südhof, T.C. (2002).** Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277, 7629-7632.
- Südhof, T.C. (2004).** The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27, 509-547.
- Sugita, S., Han, W., Butz, S., Liu, X., Fernández-Chacón, R., Lao, Y., y Südhof, T.C. (2001).** Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca²⁺ sensor in exocytosis. *Neuron* 30, 459-473.
- Sutton, R.B., Davletov, B.A., Berghuis, A.M., Südhof, T.C., y Sprang, S.R. (1995).** Structure of the first C2 domain of synaptotagmin I: a novel Ca²⁺/phospholipid-binding fold. *Cell* 80, 929-938.
- Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R., y Brunger, A.T. (1998).** Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- Sutton, R.B., Ernst, J.A., y Brunger, A.T. (1999).** Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca²⁺-independent snare complex interaction. *J. Cell Biol.* 147, 589-598.
- Sweeney, S.T., Broadie, K., Keane, J., Niemann, H., y O'Kane, C.J. (1995).** Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* 14, 341-351.
- Tagaya, M., Wilson, D.W., Brunner, M., Arango, N., y Rothman, J.E. (1993).** Domain structure of an N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein involved in vesicular transport. *J. Biol. Chem.* 268, 2662-2666.
- Tahara, M., Coorsen, J.R., Timmers, K., Blank, P.S., Whalley, T., Scheller, R., y Zimmerberg, J. (1998).** Calcium can disrupt the SNARE protein complex on sea urchin egg secretory vesicles without irreversibly blocking fusion. *J. Biol. Chem.* 273, 33667-33673.
- Teng, F.Y., Wang, Y., y Tang, B.L. (2001).** The syntaxins. *Genome Biol.* 2, REVIEWS3012.
- Terrian, D.M., y White, M.K. (1997).** Phylogenetic analysis of membrane trafficking proteins: a family reunion and secondary structure predictions. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 198-204.
- Thomas-Reetz, A.C., y De Camilli, C.P. (1994).** A role for synaptic vesicles in non-neuronal cells: clues from pancreatic beta cells and from chromaffin cells. *FASEB J.* 8, 209-216.
- Thompson, N.L., Burghardt, T.P., y Axelrod, D. (1981).** Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy. *Biophys. J.* 33, 435-454.
- Toomre, D., y Manstein, D.J. (2001).** Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy. *Trends Cell Biol.* 11, 298-303.
- Toonen, R.F., Kochubey, O., de, W.H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sorensen, J.B., Klingauf, J., y Verhage, M. (2006).** Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J.* 25, 3725-3737.
- Trifaró, J.M., y Vitale, M.L. (1993).** Cytoskeleton dynamics during neurotransmitter release. *Trends Neurosci.* 16, 466-472.
- 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.
- Trimble, W.S., Gray, T.S., Elferink, L.A., Wilson, M.C., y Scheller, R.H. (1990).** Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain. *J. Neurosci.* 10, 1380-1387.
- Tsien, R.Y., Pozzan, T., y Rink, T.J. (1982).** Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J. Cell Biol.* 94, 325-334.
- Tsuboi, T., Kikuta, T., Warashina, A., y Terakawa, S. (2001).** Protein kinase C-dependent supply of secretory granules to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 621-628.
- Tucker, W.C., Weber, T., y Chapman, E.R. (2004).** Reconstitution of Ca²⁺-regulated membrane fusion by synaptotagmin and SNAREs. *Science* 304, 435-438.
- Udenfriend, S., Cooper, J.R., Clark, C.T., y Baer, J.E. (1953).** Rate of turnover of epinephrine in the adrenal medulla. *Science* 117, 663-665.

- Ungermann, C., Nichols, B.J., Pelham, H.R., y Wickner, W. (1998). A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *J. Cell Biol.* 140, 61-69.
- Vaidyanathan, V.V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dorries, C., Bade, S., Nauenburg, S., Niemann, H., y Binz, T. (1999). Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. *J. Neurochem.* 72, 327-337.
- Valtorta, F., Pennuto, M., Bonanomi, D., y Benfenati, F. (2004). Synaptophysin: leading actor or walk-on role in synaptic vesicle exocytosis? *Bioessays* 26, 445-453.
- Vitale, M.L., Seward, E.P., y Trifaró, J.M. (1995). Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. *Neuron* 14, 353-363.
- Vitale, N., Gasman, S., Caumont, A.S., Gensse, M., Galas, M.C., Chasserot-Golaz, S., y Bader, M.F. (2000). Insight in the exocytotic process in chromaffin cells: regulation by trimeric and monomeric G proteins. *Biochimie* 82, 365-373.
- Voets, T., Neher, E., y Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 23, 607-615.
- Voets, T. (2000). Dissection of three Ca²⁺-dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* 28, 537-545.
- Voets, T., Toonen, R.F., Brian, E.C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., Südhof, T.C., Neher, E., y Verhage, M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31, 581-591.
- Vogel, K., Cabaniols, J.P., y Roche, P.A. (2000). Targeting of SNAP-25 to membranes is mediated by its association with the target SNARE syntaxin. *J. Biol. Chem.* 275, 2959-2965.
- von Rüden, L., García, A.G., y López, M.G. (1993). The mechanism of Ba(2+)-induced exocytosis from single chromaffin cells. *FEBS Lett.* 336, 48-52.
- von Rüden, L., y Neher, E. (1993). A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science* 262, 1061-1065.
- 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, G., Witkin, J.W., Hao, G., Bankaitis, V.A., Scherer, P.E., y Baldini, G. (1997). Syndet is a novel SNAP-25 related protein expressed in many tissues. *J. Cell Sci.* 110 (Pt 4), 505-513.
- Wang, M.D., y Axelrod, D. (1994). Time-lapse total internal reflection fluorescence video of acetylcholine receptor cluster formation on myotubes. *Dev. Dyn.* 201, 29-40.
- Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Söllner, T.H., y Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.
- 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.
- Weninger, K., Bowen, M.E., Chu, S., y Brunger, A.T. (2003). Single-molecule studies of SNARE complex assembly reveal parallel and antiparallel configurations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 14800-14805.
- Westenbroek, R.E., Hell, J.W., Warner, C., Dubel, S.J., Snutch, T.P., y Catterall, W.A. (1992). Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit. *Neuron* 9, 1099-1115.
- Weston, J.A. (1970). The migration and differentiation of neural crest cells. *Adv. Morphog.* 8, 41-114.
- Wheeler, D.B., Randall, A., y Tsien, R.W. (1994). Roles of N-type and Q-type Ca²⁺ channels in supporting hippocampal synaptic transmission. *Science* 264, 107-111.
- Whiteheart, S.W., Rossnagel, K., Buhrow, S.A., Brunner, M., Jaenicke, R., y Rothman, J.E. (1994). N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein: a trimeric ATPase whose hydrolysis of ATP is required for membrane fusion. *J. Cell Biol.* 126, 945-954.
- Whiteheart, S.W., Schraw, T., y Matveeva, E.A. (2001). N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) structure and function. *Int. Rev. Cytol.* 207, 71-112.

- Wilson, S.P., y Kirshner, N. (1977).** The acetylcholine receptor of the adrenal medulla. *J. Neurochem.* 28, 687-695.
- Winkler, H. (1976).** The composition of adrenal chromaffin granules: an assessment of controversial results. *Neuroscience* 1, 65-80.
- Winkler, H., y Westhead, E. (1980).** The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* 5, 1803-1823.
- Winkler, H. (1997).** Membrane composition of adrenergic large and small dense cored vesicles and of synaptic vesicles: consequences for their biogenesis. *Neurochem. Res.* 22, 921-932.
- Wiser, O., Trus, M., Hernández, A., Renstrom, E., Barg, S., Rorsman, P., y Atlas, D. (1999).** The voltage sensitive Lc-type Ca²⁺ channel is functionally coupled to the exocytotic machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 248-253.
- 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.
- Xu, T., Binz, T., Niemann, H., y Neher, E. (1998).** Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nat. Neurosci.* 1, 192-200.
- 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.
- Yamasaki, S., Hu, Y., Binz, T., Kalkuhl, A., Kurazono, H., Tamura, T., Jahn, R., Kandel, E., y Niemann, H. (1994).** Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of *Aplysia californica*: structure and proteolysis by tetanus toxin and botulinum neurotoxins type D and F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 91, 4688-4692.
- Yang, B., Steegmaier, M., González, L.C., Jr., y Scheller, R.H. (2000).** nSec1 binds a closed conformation of syntaxin1A. *J. Cell Biol.* 148, 247-252.
- Ybe, J.A., Wakeham, D.E., Brodsky, F.M., y Hwang, P.K. (2000).** Molecular structures of proteins involved in vesicle fusion. *Traffic.* 1, 474-479.
- Yoshida, A., Oho, C., Omori, A., Kuwahara, R., Ito, T., y Takahashi, M. (1992).** HPC-1 is associated with synaptotagmin and omega-conotoxin receptor. *J. Biol. Chem.* 267, 24925-24928.
- Zenisek, D., Steyer, J.A., y Almers, W. (2000).** Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 406, 849-854.
- Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W.A., Sather, W.A., Tanabe, T., Schwarz, T.L., y Tsien, R.W. (1993).** Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca²⁺ channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology* 32, 1075-1088.
- Zhang, X., Kim-Miller, M.J., Fukuda, M., Kowalchuk, J.A., y Martin, T.F. (2002).** Ca²⁺-dependent synaptotagmin binding to SNAP-25 is essential for Ca²⁺-triggered exocytosis. *Neuron* 34, 599-611.
- Zhong, H., Yokoyama, C.T., Scheuer, T., y Catterall, W.A. (1999).** Reciprocal regulation of P/Q-type Ca²⁺ channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat. Neurosci.* 2, 939-941.
- Zhou, Z., y Mislis, S. (1995).** Action potential-induced quantal secretion of catecholamines from rat adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 270, 3498-3505.
- 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.



ANEXOS

Anexo 1

López I, Giner D, Ruiz-Nuño A, Fuentealba J, Viniegra S, García AG, Davletov B, Gutierrez LM: "Tight coupling of T-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in culture chromaffin cells". *Cell Calcium*. 2007, Jun; 41 (6): 547-558.

Anexo 2

López I, Ortiz JA, Villanueva J, Torres V, Cristina J. Torregrosa-Hetland, del Mar Francés M, Viniegra S, Gutiérrez LM: "Chromaffin granule motion and fusion is influenced by SNARE cluster dynamics". Enviado a publicar a la revista *Molecular Biology of the cell*.





Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells

Inmaculada Lopez^a, Daniel Giner^a, Ana Ruiz-Nuño^b, Jorge Fuentealba^b,
Salvador Viniegra^a, Antonio G. Garcia^b, Bazbek Davletov^c, Luis M. Gutiérrez^{a,*}

^a Instituto de Neurociencias, Centro Mixto CSIC-Universidad Miguel Hernández, Sant Joan d'Alacant, 03550 Alicante, Spain

^b Instituto Teófilo Hernando, Servicio de Farmacología Clínica, Hospital de la Princesa Departamento de Farmacología y Terapéutica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, Arzobispo Morcillo 4, 28029 Madrid, Spain

^c Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, United Kingdom

Received 7 July 2006; received in revised form 26 September 2006; accepted 12 October 2006

Available online 16 November 2006

Abstract

Regulated exocytosis involves calcium-dependent fusion of secretory vesicles with the plasma membrane with three SNARE proteins playing a central role: the vesicular synaptobrevin and the plasma membrane syntaxin1 and SNAP-25. Cultured bovine chromaffin cells possess defined plasma membrane microdomains that are specifically enriched in both syntaxin1 and SNAP-25. We now show that in both isolated cells and adrenal medulla slices these target SNARE (t-SNARE) patches quantitatively coincide with single vesicle secretory spots as detected by exposure of the intravesicular dopamine β -hydroxylase onto the plasmalemma. During exocytosis, neither area nor density of the syntaxin1/SNAP-25 microdomains changes on the plasma membrane of both preparations confirming that preexisting clusters act as the sites for vesicle fusion. Our analysis reveals a high level of colocalization of L, N and P/Q type calcium channel clusters with SNAREs in adrenal slices; this close association is altered in individual cultured cells. Therefore, microdomains carrying syntaxin1/SNAP-25 and different types of calcium channels act as the sites for physiological granule fusion in “in situ” chromaffin cells. In the case of isolated cells, it is the t-SNAREs microdomains rather than calcium channels that define the sites of exocytosis.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: SNARE microdomains; Calcium channels; Exocytosis; Bovine chromaffin cells; Adrenomedullary slices

1. Introduction

Neurotransmitter release in neurons takes place at active zones, highly specialized sites on the presynaptic membrane where vesicles initially accumulate and dock [1]. These zones are of great interest because they are responsible for the tight excitation–secretion coupling underlying the fast neuronal response [2]. In contrast to neuronal exocytosis, our under-

standing of spatial organization of secretion in hormone-releasing endocrine cells, especially in native tissues, is less clear. Interestingly, chromaffin cells isolated from adrenal glands appear to release catecholamines in discrete areas of the plasma membrane—at so-called exocytotic “hot spots” [3,4]. Chromaffin cells share their embryological origin with peripheral autonomic neurons and are widely used as a cellular model to investigate the molecular mechanisms of exocytosis [5,6]. It is clear that understanding hormonal secretion requires a detailed spatial and molecular characterization of secretory ‘hot spots’ in neuroendocrine cells.

A previous study suggested that the defined distribution of secretory events in chromaffin cells is due to clustering of calcium channels which produce focal and restricted elevations in the cytosolic concentration of calcium [3]. However, a

Abbreviations: DBH, dopamine β -hydroxylase; SNAP, soluble NSF attachment protein; NSF, *N*-ethylmaleimide-sensitive fusion protein; SNARE, SNAP receptors; SNAP-25, synaptosome-associated protein of 25 kDa

* Corresponding author. Tel.: +34 96 5919563; fax: +34 96 5919561.

E-mail address: luisguti@umh.es (L.M. Gutiérrez).

significant delay between depolarization-dependent calcium entry and the secretory response does not support the idea of a direct linkage between calcium channels and dense-core vesicles [7,8]. It is conceivable, on the other hand, that spatial distribution of secretory events in discrete areas of the plasma membrane is a consequence of restricted localization of exocytotic machinery, i.e. proteins that mediate fusion process. In other words, the fusion machinery is likely the key determinant of the sites of exocytosis on the target plasma membrane but this has not been addressed in a quantitative way. For example, in pheochromocytoma cells, two target SNARE proteins, implicated in vesicle fusion, – syntaxin1 and SNAP-25 – do partially account for vesicle exocytosis in discrete areas of the plasma membrane [9]. Heterodimers of the plasma membrane SNAREs, syntaxin1 and SNAP-25, have been suggested to form a stable intermediate in the SNARE assembly pathway and also were shown to exist in defined clusters in bovine chromaffin cells [10]. In the present work, we quantitatively investigated whether syntaxin1/SNAP-25 clusters or calcium channels define sites for vesicle fusion in chromaffin cells and in adrenal medulla slices. Our results reveal a nearly complete spatial coincidence between the target SNARE clusters and the secretory events in mature secretory cells. This suggests that distribution of both syntaxin1 and SNAP-25, rather than calcium channel distribution, is the critical factor underlying the spatial characteristics of dense-cored vesicle exocytosis; the proximity of such microdomains to calcium channel subtypes in chromaffin cells before and after the isolation from native adrenal tissue may explain the difference in temporal characteristics of the secretory process between cultured cells and “in situ” chromaffin cells in its natural environment of the adrenal slices, as has been proved for rat adrenomedullary cells [11].

2. Methods

2.1. Culture of bovine chromaffin cells and preparation of adrenal slices

Chromaffin cells were prepared from bovine adrenal glands by collagenase digestion and further separated from debris and erythrocytes by centrifugation on Percoll gradients as described elsewhere [12–14]. Cells were maintained in monolayer cultures using Dulbecco’s modified Eagle’s medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 10 μ M cytosine arabinoside, 10 μ M 5-fluoro-2’-deoxyuridine, 50 IU/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin and maintained in 35 mm Petri dishes (500,000 cells/dish, Corning Inc., Corning, NY, USA). All experiments were performed between the second and fourth day after plating.

Adrenal slices were prepared from bovine glands by separation from the adrenal cortex and embedding small cubes in 4% low fusion agarose (Type VII-A, Sigma, Co., Madrid, Spain). Slices of about 180 μ m were prepared using a Leica

VT 1000 vibratome at 6 Hz frequency and the cutted tissue maintained at 4 °C in BBS buffer with low calcium (125 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.1 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 1.25 mM NaH₂PO₄, 10 mM d-glucose), under continuous air bubbling (95% O₂, 5% CO₂). After that, experiments with slices were performed at room temperature.

2.2. Immunochemical detection of syntaxin1 and SNAP-25 interaction

In other experiments, chromaffin cell extract was prepared using buffer A (20 mM HEPES, pH 7.0, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA) containing 2% Triton X-100. Sepharose beads with covalently attached anti-SNAP-25 antibody (clone SMI81, Sternberger Monoclonals, Lutherville, USA) were incubated with the cell extract for 1 h at 4 °C, and then extensively washed in buffer A containing 0.1% Triton X-100. Bound protein was eluted into SDS-containing sample buffer and separated by SDS-PAGE. Syntaxin1 and SNAP-25 were identified by Western immunoblotting using corresponding antibodies and the WestDura chemiluminescent kit from Pierce. General chemicals were from Sigma (Sigma Co., Madrid, Spain).

2.3. Confocal microscopy studies of the cellular distribution of syntaxin1, SNAP-25, and calcium channels subtypes

Cells were fixed and permeabilized using a modification of the method described by Lazarides [15]. Briefly, cells were fixed using a 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline solution (PBS) for 20 min. Then cells were permeabilized with 0.2% Triton X-100 in a 3.6% formaldehyde during a 10 min incubation and washed twice with 1% BSA in PBS within 10 min. Fixation and permeabilization of adrenomedullary slices were performed within 25 min followed by a 15 min wash.

Labeling of syntaxin1 and SNAP-25 in permeabilized cells and slices was performed overnight in 3% bovine serum albumin (BSA) PBS media containing 1:200 dilutions of rabbit anti-SNAP-25 [16] and/or chicken antibodies produced against recombinant rat syntaxin1A. This syntaxin antibody recognized syntaxin1 and it has a very weak cross-reactivity with syntaxin2 that is present in very low proportion in bovine chromaffin cells. After extensive washes, secondary rabbit anti-chicken coupled to FITC (1:200 dilution, Sigma, Madrid, Spain) or goat anti-rabbit antibodies coupled to TRITC (1:200 dilution, Sigma, Madrid, Spain) were added and after 2 h unbound material was washed away using PBS. The monoclonal anti-Na⁺/K⁺ ATPase antibody (BIOMOL International, PA, USA) was used at 1:100 dilution in conjunction with a goat anti-mouse antibody coupled to FITC (1:200 dilution, Sigma, Madrid, Spain). Calcium channel subtypes were labeled using rabbit polyclonal antibodies (Alomone Labs, Jerusalem, Israel). Anti-L-type channels were raised against a highly purified peptide corresponding to

the residues 809–825 of the α_{1D} subunit of rat brain voltage-dependent calcium channels [17] and affinity purified using a column immobilizing the same peptide. Anti-P/Q channels were produced against residues 865–881 of α_{1A} subunit [18] of rat brain voltage-dependent calcium channels. Similarly, anti-N-type channels were produced against residues 851–867 of α_{1B} subunit from the same biological source [19]. Immunolabeling was performed as described above using a 1:200 dilution of the antibodies and the non-specific labeling investigated using antibody solutions pre-incubated with 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of the corresponding peptides during 1 h at room temperature. Secondary antibodies coupled to rhodamine were used to visualize epitope distribution. Fluorescence was investigated using an Olympus Fluoview FV300 confocal laser system mounted in a BX-50 WI up-right microscope incorporating a 100X LUMPlan FI water-immersion objective (spatial resolution based in this objective and the scanner characteristics was estimated in 60–80 nm for 2–3 pixel separations). This system allows for z -axis reconstruction with theoretical z slice of about 0.5 μm thick and sequential mode studies in double labeling experiments. Images were processed using the ImageJ program with Plugins for: ROI measurement, image average, multiple channel image comparison, and co-localization analysis using images with the same magnification.

The use of the peptides completely blocked the specific fluorescent signal observed in our microscopy studies and therefore resulted in negative black images. Controls using primary or secondary antibodies alone resulted also in the absence of any observed labeling in our experimental conditions.

2.4. Spatial determination of secretion using immunodetection of dopamine- β -hydroxylase incorporated to the plasma membrane

Prior to stimulation of exocytosis, the culture medium was replaced with a Krebs/HEPES (K/H) basal solution containing 134 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM KH_2PO_4 , 1.2 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , 11 mM glucose, 0.56 mM ascorbic acid and 15 mM HEPES, pH 7.4. Cells were stimulated for 5 min using depolarizing solution with 59 mM high potassium (obtained by replacing isosmotically NaCl by KCl) in K/H basal solution. To prevent vesicle membrane withdrawal by endocytosis, at the end of stimulation the media was replaced with ice-cold basal K/H solution lacking CaCl_2 . Cells were incubated with a rabbit anti-dopamine- β -hydroxylase antibody (anti-DBH, 1:500 dilution, Oncogene Research Products, Cambridge, UK) in ice-cold K/H buffer for 120 min, washed, and fixed as described above. Anti-syntaxin1 antibody was incubated overnight as described above. After extensive washing, a secondary goat anti-rabbit coupled to TRITC was employed to detect DBH incorporation to the plasmalemma (1:200 dilution, Sigma, Madrid, Spain), whereas a rabbit anti-chicken antibody coupled to FITC was used to label syntaxin1, as indicated

above. In secretory experiments, a goat anti-SNAP-25 (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) was employed at a 1:200 dilution to combine with DBH labeling. Finally, cells were mounted and their fluorescence investigated in the Olympus FluoviewFV300 confocal laser system.

Experiments with slices were performed similarly using BBS buffer with 2 mM CaCl_2 and slice stimulation was accomplished by using KCl 59 mM (obtained by replacing isosmotically NaCl by KCl).

2.5. Flash-photolysis experiments in isolated cells

Photorelease of calcium from cage compounds in control isolated cells as well as cells treated with 10 mM methyl- β -cyclodextrine during 30 min to extract cholesterol from the cell membrane was done using a 5 μM concentration of *o*-nitrophenyl EGTA-AM (NP-EGTA, Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) in Krebs-HEPES buffer with the following composition (in mM): NaCl 134, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.2, MgCl_2 1.2, CaCl_2 2.5, glucose 11, ascorbic acid 0.56 and Hepes 15 and pH adjusted to 7.4 using a NaOH solution. After 30 min incubation, three washes were performed, and the glass coverslip containing the cells was mounted in the stage of a Zeiss Axiovert 100S inverted microscope using a 100 \times Plan-Neofluar objective. In this system a dual-port condenser allowed excitation of the specimen with a monochromator Polychrome IV (8% incoming light, Till-Photonics, Munich, Germany) and simultaneous application of a 5 ms UV flash using a pulsed Xenon arc lamp system (92% incoming light, UV Flash II, Till-Photonics), therefore allowing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ measurements using Fura 2 excitation at 340–380 nm (for this purpose 4 μM Fura 2-AM was incubated simultaneously with the NP-EGTA). Fluorescence emission from a 20 $\mu\text{m} \times 20 \mu\text{m}$ restricted area (Viewfinder III, Till-Photonics) was detected in a photomultiplier tube (Hamamatsu Inc., Hamamatsu, Japan). Control of excitation light and acquisition were performed through PClamp 8.0 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) in a PC computer. In these conditions, uncaged calcium produced a rapid elevation of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimated in $900 \pm 400 \text{ nM}$ [14]. Calcium elevation causes a rapid release of vesicles as detected by membrane incorporation of FM 1-43 (Molecular Probes) present at a 1 μM concentration in K/H buffer. FM1-43 fluorescence after excitation at 475 nm was determined and integrated at 50 ms intervals using a fluorescein emission filter set.

2.6. Statistical analysis

The Student's *t*-test for paired samples or the two-way ANOVA test were used to establish statistical significance among the experimental data (samples were considered significantly different when $p < 0.05$). Non-Gaussian data distributions were analysed using the non-parametric Mann-Whitney *U* test. Data were expressed

as mean \pm S.E.M. from experiments performed in a number (n) of individual cells from at least three different cultures.

3. Results

3.1. The plasma membrane SNAREs and vesicular dopamine β -hydroxylase colocalize after exocytosis in chromaffin cells

To test spatial co-occurrence of exocytosis with the SNAREs we employed a double-immunostaining approach. Analysis of secretory events was done by following vesicular dopamine β -hydroxylase (DBH). This enzyme is normally present in the membrane of chromaffin granules but incorporates into the plasma membrane upon exocytosis, making it possible to locate the sites of exocytosis [20,21]. Therefore, a simple and yet accurate way to test the hypothesis was to allow a DBH antibody [21,22] to find its exposed target at the plasma membrane of intact stimulated cells and then, following fixation and permeabilization, highlight the plasma membrane SNAREs which locate on its inner leaflet using an anti-SNARE antibody. This approach led to a rather conclusive result as evidenced by staining of a cell stimulated for 5 min with the 59 mM KCl depolarizing solution (Fig. 1): both syntaxin1 and SNAP-25 puncta nearly completely co-localized with the exposed vesicular marker on the plasma membrane of cultured chromaffin cells. The equatorial sections show that patches of anti-DBH (Fig. 1B and F) were coincident with anti-syntaxin1 (Fig. 1A) and anti-

SNAP-25 patches (Fig. 1E), producing yellow overlapping patches which decorated the cell contour in a merged image (Fig. 1C and G). Co-localization analysis of the pixels with intensities over 50% of the maximal fluorescence in each channel shows a good match of both labels at the cell plasma membrane (Fig. 1D and H).

3.2. Analysis of secretory microdomains in polar sections of cultured chromaffin cells

Analysis of the polar sections of stimulated chromaffin cells at high magnification revealed that secretory zones distribute on the external face of the plasma membrane separated by distances ranging from 0.5 to 2 μm (Fig. 2). Furthermore, in the polar sections, a precise coincidence in shape and size of the exposed DBH with the spots labeled with anti-syntaxin1 was apparent (Fig. 2E–H). The excellent match of both labels was further supported by particle analysis showing: (i) nearly precise co-localization in position and size of the syntaxin1 clusters and exocytotic event maps (Fig. 2I) and (ii) the very similar size distribution histograms representing both labels after analysis of 282 syntaxin1 clusters and 301 secretory events (Fig. 3J). This size distribution study gave modal values of 0.04 and 0.06 μm^2 and identical average values of 0.11 μm^2 for syntaxin1 cluster and secretory event area, respectively. Importantly, a fraction of syntaxin1 spots were not coincident with secretory events (Fig. 2E and G, marked by arrows), indicating that not all available SNARE clusters were used for vesicle secretion simultaneously in our 5 min stimulation protocol.

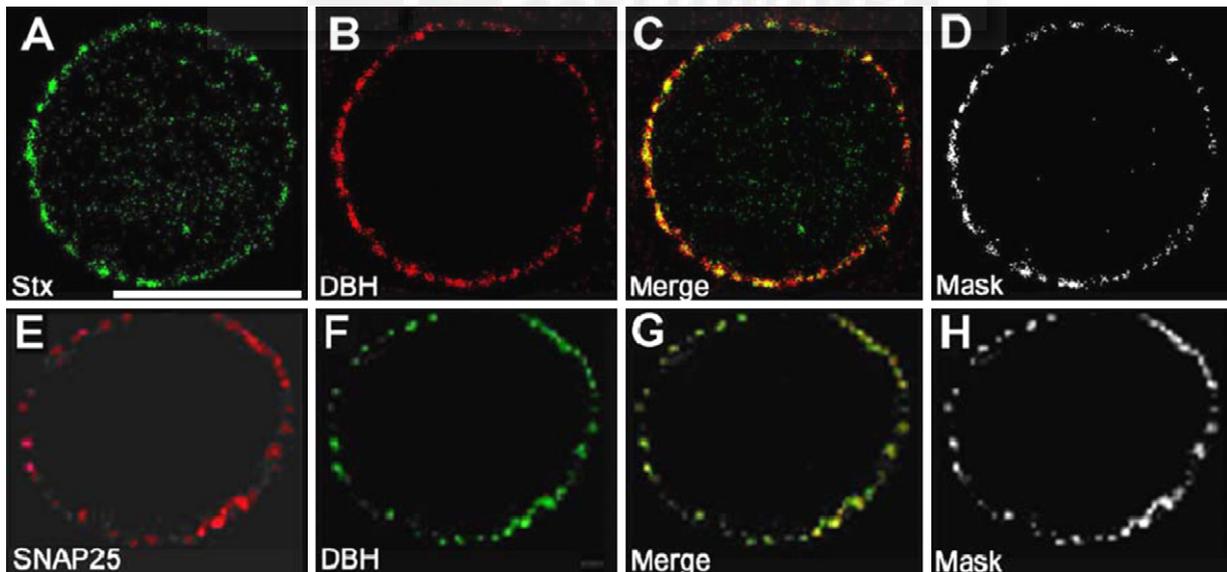


Fig. 1. Vesicular dopamine β -hydroxylase exposed during secretion co-localizes with both syntaxin1 and SNAP-25 clusters on the plasma membrane of chromaffin cells in culture. Cultured chromaffin cells were stimulated by 59 mM KCl depolarizing solution at 22–23 $^{\circ}\text{C}$. Then, temperature was immediately lowered to 4 $^{\circ}\text{C}$ to block vesicle recycling and cells incubated with a rabbit anti-dopamine β -hydroxylase (DBH) for 2 h. After extensive washing, cells were fixed, permeabilized, and incubated overnight with either anti-syntaxin1 or anti-SNAP-25 followed by secondary fluorescently labelled antibodies as described in Section 2. Shown are confocal sections at the equatorial plane displaying syntaxin1 (A), SNAP-25 (E) and DBH labelling (B and F). Co-localization is highlighted by the yellow colour in the merge image (C and G), and is further demonstrated in the mask image which represents colocalized pixels of at least 50% maximal intensity in both channels (D and H). The bar in panel (A) represents 10 μm .

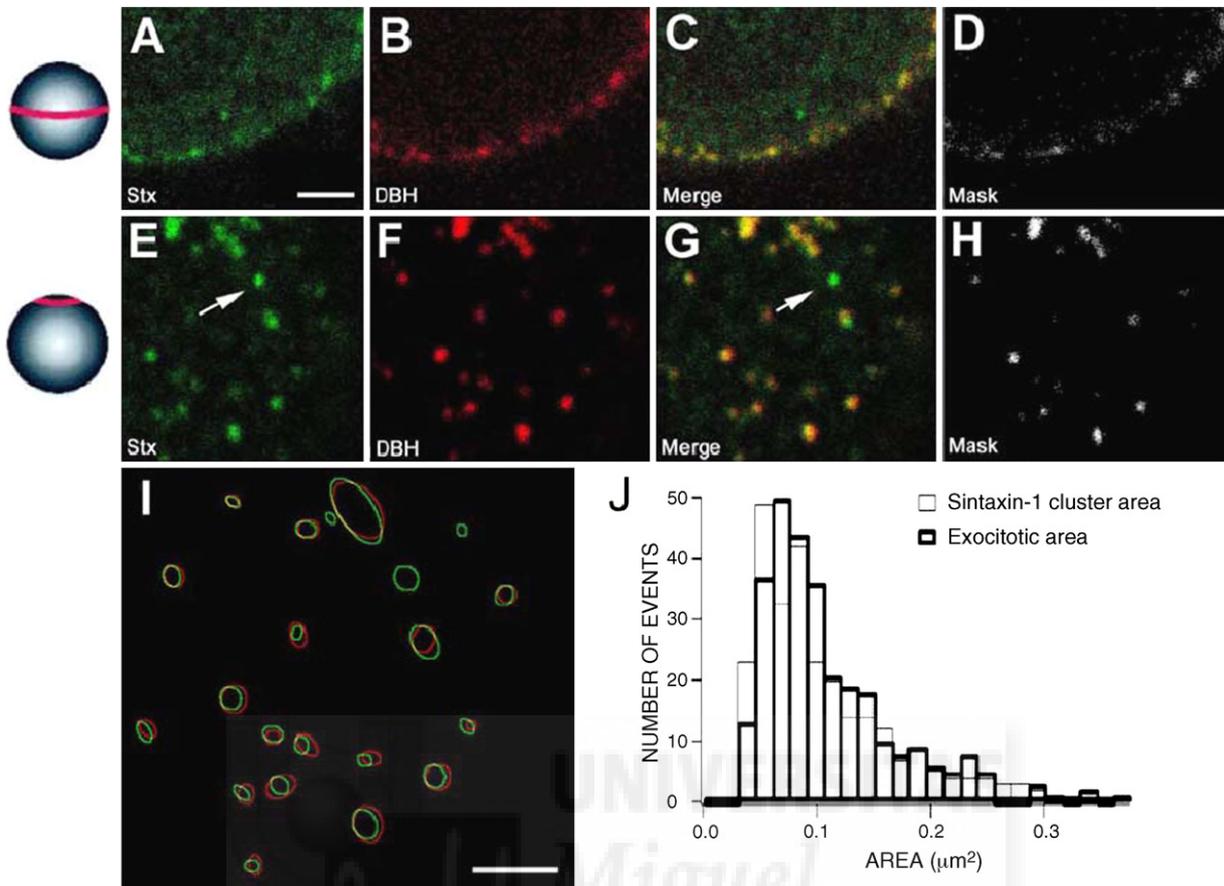


Fig. 2. Cluster size distribution for syntaxin1 and exposed dopamine β -hydroxylase in high magnification confocal images of stimulated cultured chromaffin cells. Cell stimulation and immunofluorescent labelling was performed as indicated in Fig. 1. High magnification images were obtained from chromaffin cell equatorial and polar sections presenting anti-syntaxin1 (A and E) and anti-D β H labelling (B and F). Co-localization was observed as spatially matched pixels in both channels (C and G) and confirmed by the mask analysis which represents colocalized pixels of at least 50% maximal intensity in both channels (D and H). Precise co-localization in clusters size and shape was determined by particle analysis of polar images displaying a map of ellipses covering the pixels labelled in both fluorescent channels (I). Cluster size analysis for 282 syntaxin1 clusters and 301 vesicle fusions revealed similar distributions for syntaxin1 areas and the exposed DBH (J). Modal values of 0.049 and 0.044 μm^2 were obtained for syntaxin1 and the exposed DBH areas, respectively. Bar represents 1 μm . The arrows indicate lone syntaxin1 clusters free of anti-DBH labelling.

3.3. SNARE clusters also colocalized with secretory patches in stimulated adrenal medulla slices

In order to test if the described colocalization is of functional and physiological relevance for the cells present in the intact native adrenal medulla tissue, we prepared bovine adrenal slices embedded in agar and stimulated them using the same protocol previously employed for the isolated cells. Posterior DBH immunostaining and cell fixation followed by SNARE labeling was used as above. Fig. 3 shows that syntaxin1 and SNAP-25 appeared to distribute in puncta which overlapped exocytosing membrane patches (Fig. 3C and G) similarly to the isolated chromaffin cells. This was evidenced by the colocalization mask corresponding to the pixels presenting intensities over 50% of the maximal fluorescence in each channel (Fig. 3D and H) and by the detailed area analysis (Fig. 3I). Further analysis by employing size distribution histograms for 515 experimental spots, gave modal values around 0.06 and 0.07 μm^2 for the syntaxin1 and exocytotic

patches area, respectively (Fig. 3J), being slightly bigger to the values found in isolated cells and reported above (Fig. 2). This distribution analysis also indicated the mean values around 0.18 μm^2 for both syntaxin1 and exocytotic puncta area, which is above the mean values of 0.11 μm^2 found in cultured cells. In both cases we obtained similar spot radius of around 0.18–0.24 μm . Taking together both the data obtained in isolated cell cultures as well as in the cells present in the native adrenomedullary tissue, strongly suggest that SNARE clusters colocalize with exocytotic events. In control experiments, double immunolabeling using antibodies against SNAP-25 and the plasma membrane Na/K ATPase produced non-overlapping patterns of staining and negative black colocalization mask (Supplementary Fig. 1), these labelings indicate the absence of significant random co-localization among plasma membrane microdomains of the different proteins studied in cultured cells and adrenomedullary slices. In these experiments less than 5–7% of the SNAP-25 total pixels were co-localized with Na/K ATPase positive pixels.

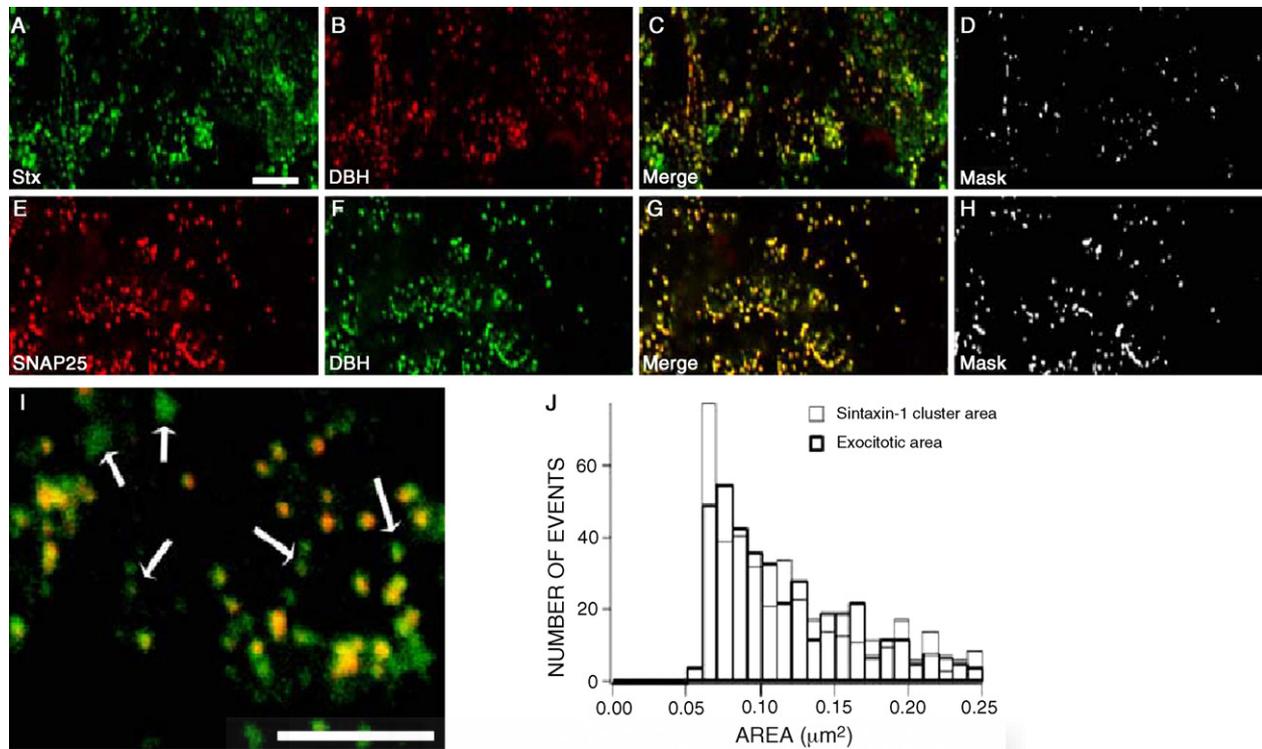


Fig. 3. Size distribution for SNARE microdomains and exocytotic spots in adrenomedullary slices. Bovine adrenomedullary slices were prepared as described in Section 2 and stimulated by depolarization with a 59 mM KCl solution during 5 min; then, immunofluorescence labelling was performed and analyzed by confocal microscopy as indicated in Fig. 1. Shown are images from adrenal medulla magnified at 40 \times of anti-syntaxin1 (A) or anti-SNAP-25 (E) from slices simultaneously labelled with anti-DBH antibodies (B and F). Co-localization was observed as spatially matched pixels in both channels (C and G) and confirmed by the mask analysis which represents colocalized pixels of at least 50% maximal intensity in both channels (D and H). Also shown is a magnified detail presenting syntaxin1 and DBH clusters (I) where it can be observed SNARE microdomains not used for secretion (highlighted by arrows). In panel (J), cluster size analysis corresponding to 515 data revealed similar distributions for syntaxin1 area and the exposed DBH secretory spots. Modal values of 0.06 and 0.07 μm^2 were obtained for syntaxin1 and DBH area, respectively. Bars represent 5 μm .

3.4. Syntaxin1/SNAP-25 clusters are present in patches on the plasma membrane in both isolated cultured cells and the intact adrenomedullary tissue

The fact that the exposed vesicular DBH coincides with both syntaxin1 and SNAP-25 plasma membrane localization strongly suggests an existence of plasma membrane microdomains where syntaxin1 and SNAP-25 co-exist. This is consistent with a recent report employing a combination of mouse and rabbit antibodies [10]. We tested co-distribution of target SNARE proteins in resting chromaffin cells using double immunolabeling with chicken and rabbit antibodies against syntaxin1 and SNAP-25, respectively. Confocal analysis of the double-immunostained images in planar sections of chromaffin cells confirmed the presence of SNARE colocalization patches in the plasma membrane (Fig. 4). Syntaxin1 patches were similar in size with patches observed using an anti-SNAP-25 antibody (Fig. 4B and C). An image of the mask image with 50% intensity co-labeling of the pixels from the two channels highlighted the high degree of colocalization of syntaxin1 and SNAP-25 (Fig. 4D). Staining of adrenomedullary slices with the same antibodies demonstrated the presence of overlapping clusters of syntaxin1 and

SNAP-25 in the native tissue as evidenced by yellow colored pixels in the matched image (Fig. 4G) and the presence of abundant white positive pixels in the mask image (Fig. 4H). Analysis of cluster size for both preparations after stimulation revealed that both types of SNARE clusters have similar sizes being not different at the statistical level, with average values of 0.11 μm^2 in the cells (Fig. 4I) and 0.18 μm^2 in slices (Fig. 4J). The presence of clusters containing both syntaxin1 and SNAP-25 demonstrated here for the stimulated adrenomedullary tissue and isolated cells is in agreement with the specific interaction between these SNAREs shown in resting chromaffin cells [10] and PC12 cells [23]. In addition, to demonstrate the syntaxin1/SNAP-25 interaction in resting chromaffin cells we prepared an immunofluorescence column that can efficiently isolate SNAP-25 and analyzed syntaxin co-immunoprecipitation. Western immunoblotting confirmed that a SNAP-25 antibody efficiently brings down syntaxin1 from an extract chromaffin cells while in these basal conditions both proteins form clusters in isolated as well as in the cells present in the tissue (Supplementary Fig. 2).

Next, we analyzed whether densities and average areas of syntaxin1 (Fig. 5A and B for cultured cells and Fig. 5E

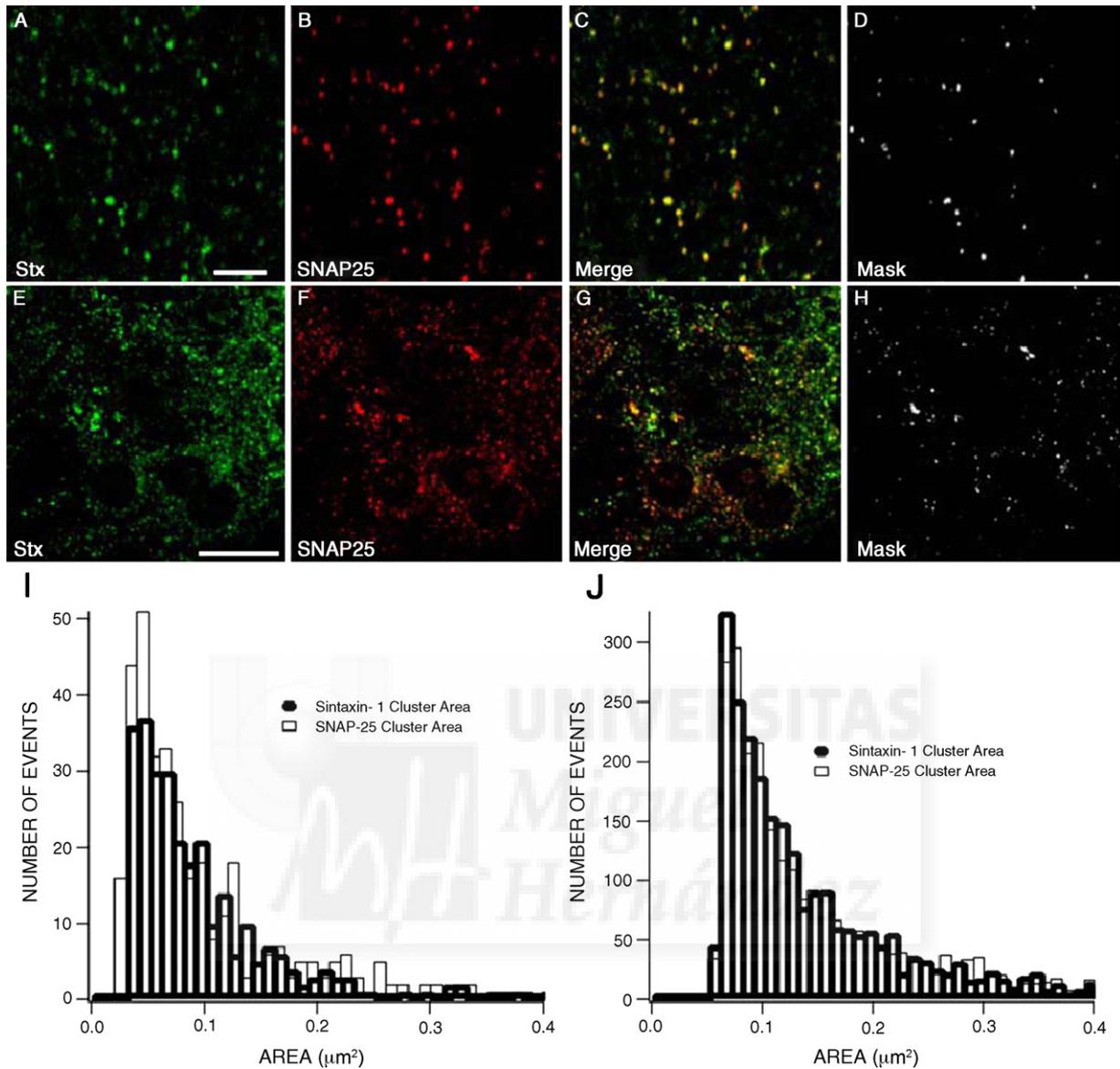


Fig. 4. Coincident presence of syntaxin1 and SNAP-25 on the plasma membrane of isolated chromaffin cells and adrenal medulla slices. Confocal images of polar sections of isolated cultured chromaffin cells immunostained with chicken anti-syntaxin1 (A) or rabbit anti-SNAP-25 (B) reveal a strong colocalization of the two t-SNAREs illustrated by the yellow colour in the merge image (C). The mask which represents colocalized pixels of at least 50% maximal intensity in both channels (D) confirms SNARE co-localization in the plasma membrane clusters. Similarly, labelling of adrenal slices with the same antibodies (E and F panels for syntaxin1 and SNAP-25, respectively) reveal a high extent of colocalization in superimposed images (G) or the 50% co-localization mask (H). Cluster size analysis for 282 syntaxin1 clusters and 349 SNAP-25 clusters in isolated cells revealed similar distributions for both SNAREs. (I) Cluster size analysis for SNAREs clusters in adrenal slices (J). Analyzed values corresponded to 515 syntaxin1 and 515 SNAP-25 clusters. Bars represent 5 μm in panel (A) and 10 μm in panel (E).

and F for tissue cells) and SNAP-25 patches (Fig. 5C, D, G and H for isolated and tissue cells, respectively) change upon stimulation. Taking into our analysis a high number of confocal images of non-stimulated cells and slices and preparations exposed to different secretory agents, we estimated that, statistically, there are no significant changes neither in the spot area (Fig. 5I), nor in the density of the t-SNARE clusters (Fig. 5J). We conclude therefore that the co-incidence of the SNARE clusters and the exposed DBH

is due to syntaxin1 and SNAP-25 molecules that pre-exist in the plasma membrane of both isolated cultured cells and the intact adrenomedullary slices.

These clusters seems to be associated to cholesterol rich domains since the treatment of the isolated cells with 10 mM methyl β-cyclodextrine disperse the SNARE clusters in both preparations and inhibited fast exocytosis studied using FM1-43 and elicited by uncaging of calcium from NP-EGTA in the cultured cells (see Section 2 and Supplementary Fig. 3).

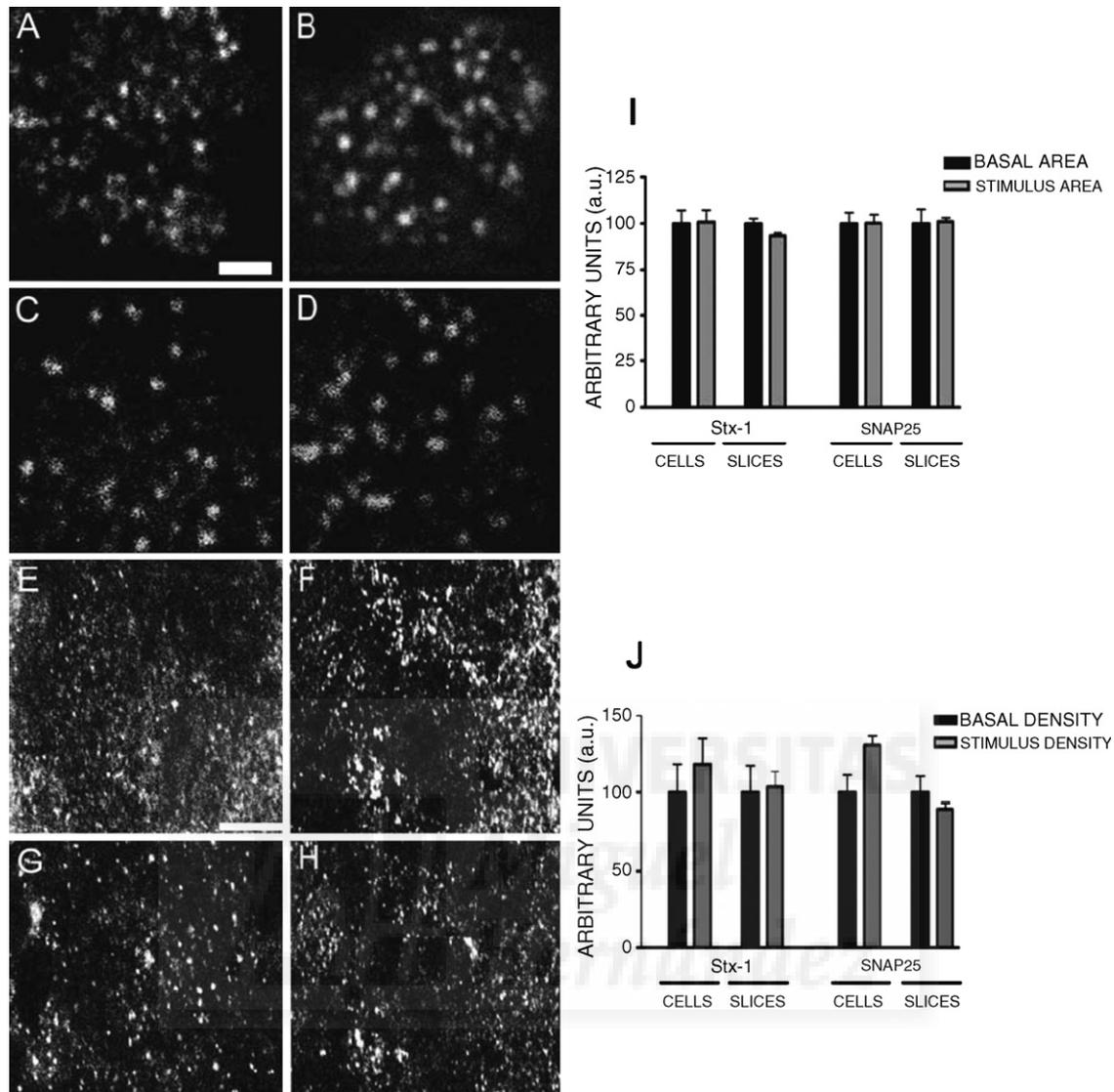


Fig. 5. Pre-existing syntaxin1/SNAP-25 microdomains define exocytotic sites in isolated cultured cells and the cells present in adrenal slices. Examples of polar images from control (A and C) and stimulated cultured cells (B and D) as well as control (E and G) and KCl stimulated slices (F and H) labelled with anti-syntaxin1 (A, B, E and F) and anti-SNAP-25 (C, D, G and H). Statistical analysis for the average cluster area (I) and density (J) is presented as normalized values. Bar represents 1 μm in (A) and 5 μm in (E). The particle analysis for 64 anti-syntaxin1-labelled and 70 anti-SNAP-25-labelled cells demonstrates that there are no statistically significant changes for any of these parameters. Similarly, no significant changes were detected between the control and stimulated parameters analyzed for 740 syntaxin1 and 555 SNAP-25 clusters in adrenal slices.

3.5. Calcium channels only partially colocalize with the plasma membrane SNARE microdomains in cultured chromaffin cells but are closely associated with the t-SNARE 'hot spots' in the adrenomedullary tissue

Calcium channels have been shown to colocalize with the secretory events in chromaffin cells [3] and were also suggested to interact directly with SNAREs in brain tissue [24]. We investigated using the double immunostaining approach the extent of the plasma membrane SNARE colocalization with the P/Q, N and L type voltage-dependent calcium channels (VDCC) that are responsible for the calcium influx leading to secretion in bovine chromaffin

cells [25]. Staining of chromaffin cells with anti-syntaxin1 and either anti-P/Q (anti-Cav2.1), L-type (anti-Cav1.2) [26] revealed only a partial colocalization (Fig. 6) with some channel immunolabeling in the near vicinity to the SNARE clusters. Overall, only around 20% of the total VDCC staining colocalized strictly with syntaxin1 spots. This colocalization is significant compared with the random colocalization expected for a membrane protein estimated in a 5–7% in double immunostains using the Na/K ATPase antibody (Supplemental Fig. 1). Importantly, however, for any given syntaxin1 it was possible to locate a VDCC cluster that resided at a distance of 200–400 nm. In addition no specific labeling was found when the antibody against N-

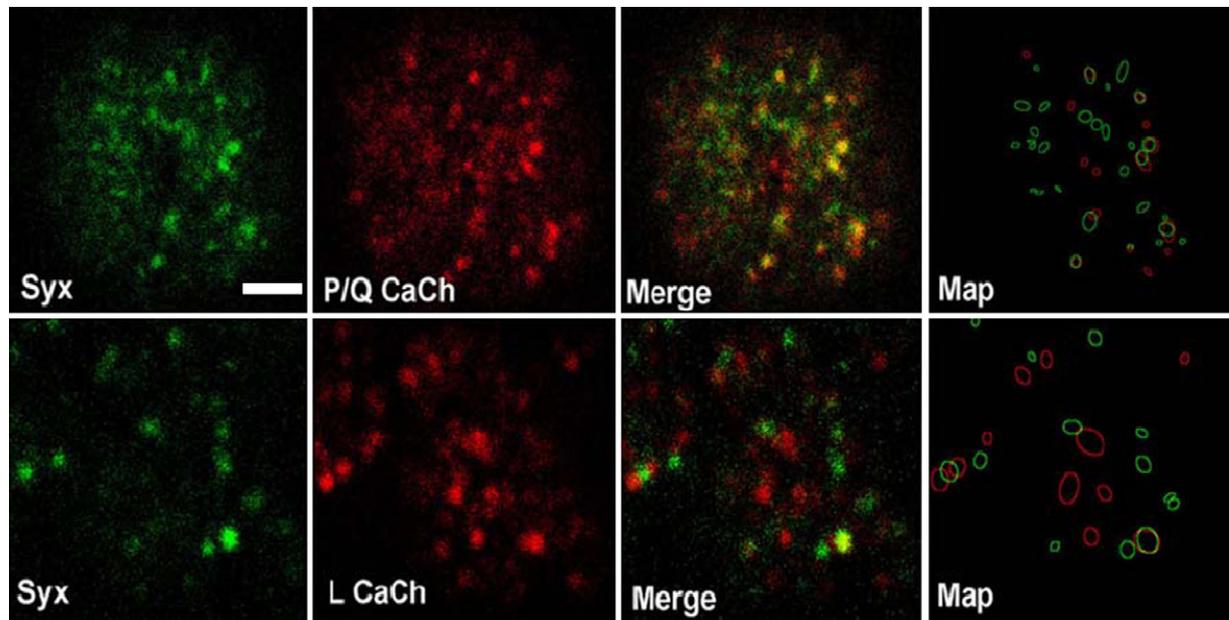


Fig. 6. Voltage-dependent calcium channels only partially colocalize with syntaxin1 clusters in isolated chromaffin cells. High magnification polar sections of chromaffin cells immunolabeled with chicken anti-syntaxin1 (green), and either rabbit anti-P/Q voltage-dependent calcium channels (VDCC) (anti- $\text{Ca}_v2.1$), or rabbit anti-L-type VDCC (anti- $\text{Ca}_v1.2$) (red). Yellow colour in the superimposed images highlights partial co-localization. Contour ellipsoid maps of clusters reveal that colocalization is limited to just a few syntaxin1 clusters on the plasma membrane of chromaffin cells. Bar represents 1 μm .

type VDCC (anti- $\text{Ca}_v2.2$) was employed. Crucially, double labeling with anti-VDCC and SNAREs revealed important differences between intact adrenomedullary tissue and isolated chromaffin cells. As seen in Fig. 7, for syntaxin1 and L- or N-type VDCC labeling there is a clear colocalization of both antigens at the level of the plasma membrane where it can be detected in dense patches profiling the contour of the multiple polygonal chromaffin cells forming part of the tissue observed at low magnification. This colocalization is better observed at higher magnification and after performing a study of the pixels containing 50% of the labeling of both green and red channels shown by colocalization masks in Fig. 7. When the ratio of colocalized VDCC versus its total pixels was calculated it resulted in values around 60% for L, N and P/Q labeling as shown in Fig. 8, values that demonstrated an estimated three-fold enhanced colocalization when compared with the reported here for individual cultured cells also shown in this figure. Taking together these results show that the adrenomedullary tissue contains SNAREs in a very close proximity to VDCC ensuring a tight coupling between calcium signaling and catecholamine release. In contrast, in isolated chromaffin cells VDCC are more loosely distributed in relation with the exocytotic machinery.

4. Discussion

Investigation of the molecular factors determining spatial properties of exocytosis is important for understanding how the neuronal and endocrine cells accomplish their func-

tion. The two main findings of this work are: first, stable syntaxin1/SNAP-25 microdomains are more important than calcium channels in defining the spatial localization of the secretory response; and second, that a close spatial association between SNAREs microdomains and VDCC does exist in the native adrenal medulla but is compromised in isolated cells.

Two independent lines of evidence support our first conclusion: the spatial distribution of both syntaxin1 and SNAP-25 dimers exhibits extensive colocalization with the secretory response as deduced from the incorporation of vesicular dopamine β -hydroxylase proving unambiguously that the plasma membrane fusion proteins determine the place for vesicle exocytosis. And second, the number of SNARE clusters does not change during secretion indicating that pre-existing plasma membrane SNAREs determine localization of the secretory response. These observations are valid for both isolated cultured cells and the cells present in adrenomedullary slices. Despite that a number of studies have previously suggested coupling of SNARE fusion proteins to vesicle fusion [27], however, to date, there was no such evidence for native neuroendocrine tissues. The average size of the SNARE patches described here (about 400 nm in diameter) is in the range described for SNARE clusters in other systems such as PC12 cells [9] or insulin containing MIN6 β cells [28]. The original work of Robinson et al. [3] suggested that neuro-endocrine secretion occurs in “active zone”-like spots where focal calcium entry triggers a fast secretory response in bovine adrenal chromaffin cells in culture. Our data imply that microdomains of the t-SNARE heterodimers

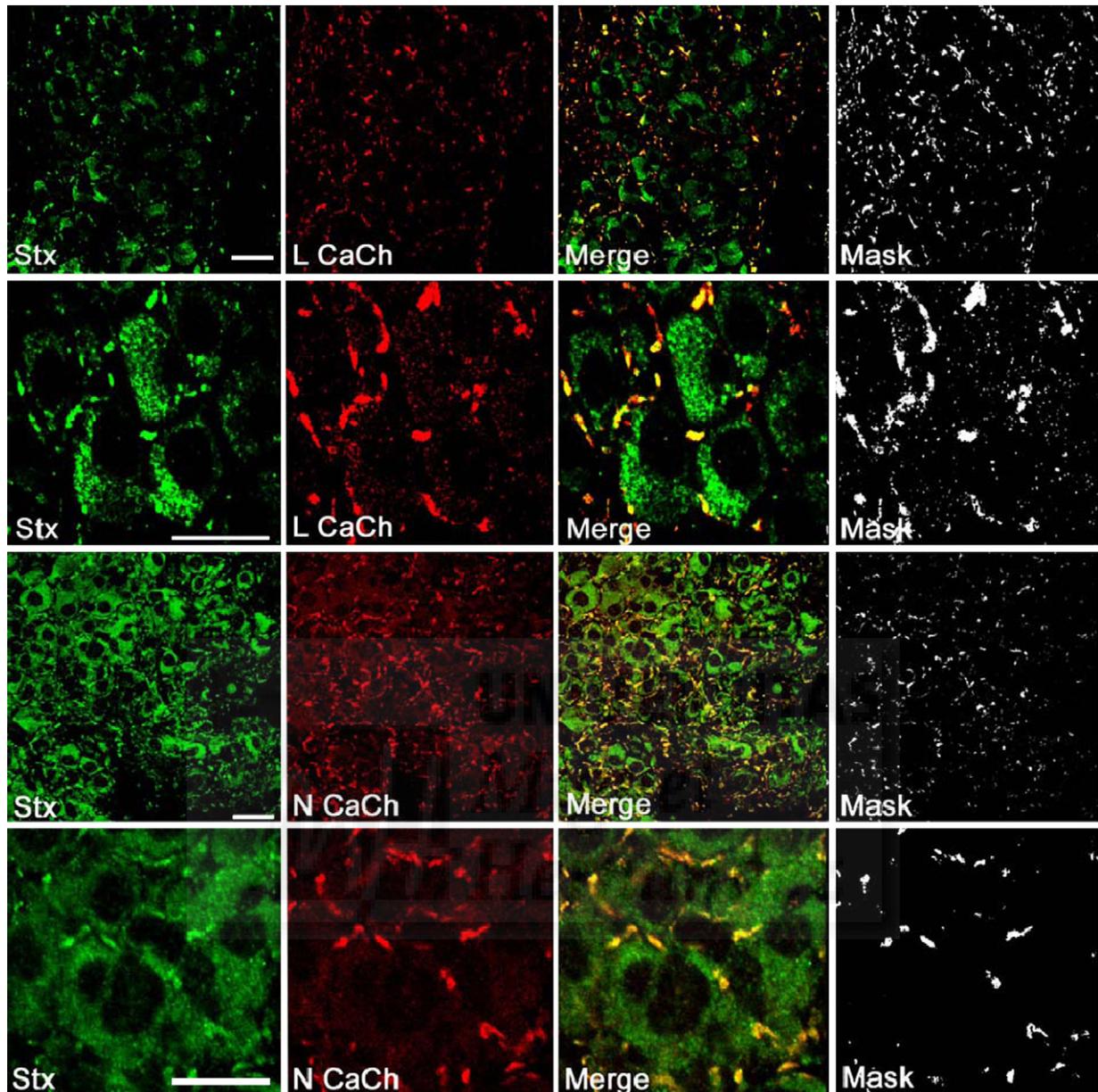


Fig. 7. SNARE microdomains and voltage-dependent calcium channels are highly colocalized on the plasmalemma of chromaffin cells in adrenal slices. Confocal images depict chromaffin cells from adrenal slices labelled with chicken anti-syntaxin1 (green) and either rabbit anti-L-type (anti- $\text{Ca}_v1.2$) (red) or rabbit anti-N VDCC (anti- $\text{Ca}_v2.2$) (red). Also shown are magnified details of the cells showing the presence of dense patches of both labelings in the cell periphery. The high level of co-localization of snare microdomains and calcium channels is highlighted by the yellow colour of superimposed channels as well as the 50% co-localization masks. Similar results were obtained when anti-P/Q VDCC (anti- $\text{Ca}_v2.1$) immunostaining was performed. Bars represent 10 μm .

constitute the core of such structures with VDCC either strictly co-localizing (20% of the channel population), or forming nearby clusters in the close vicinity. Such an arrangement of calcium channels and the secretory machinery may underlie a complex secretory response consisting of (i) a fast component with short latency response and (ii) an additional component characterized by an evident time delay between Ca^{2+} entry and secretion [7]. This scenario is in agreement with a recent study of chromaffin cells that highlighted both Ca^{2+} microdomains of 350 nm diameter required for fast vesicle fusion (<100 ms), and global elevations of Ca^{2+} which

increase colocalization of the secretory response with the calcium channels [29]. Our study provides an independent evidence for the suggestion that the average distance of chromaffin granules from VDCC is in the range of 300 nm [30]. Importantly, we detected a closer association between VDCC and the fusion machinery in the native tissue compared to chromaffin cells after their isolation. The observed difference implies a faster coupling between calcium entry and the secretory response in adrenal slices when compared with isolated cells, and indeed this has been demonstrated for mouse and rat adrenomedullary cells [11,31]. In addition it has been shown

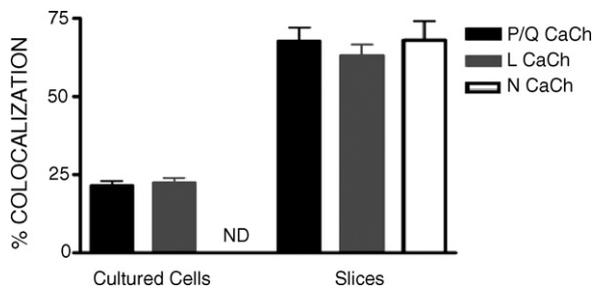


Fig. 8. Analysis of syntaxin1 and VDCC microdomains reveal a higher level of co-localization of these proteins in adrenomedullary slices compared with isolated cultured cells. High magnification confocal images of syntaxin1 and VDCC immunofluorescence labelings were analyzed for the colocalized pixels of at least 50% maximal intensity in both channels and the colocalization degree represented as the ratio of VDCC colocalized vs. its total pixels from experiments performed in at least four different cell cultures and five slice preparations.

in both mouse and bovine cells that there are differences in the proportion of the channel subtypes between the isolated and the cells forming part of the adrenal tissue [31–33] accounting for the detection of different VDCC subtypes in this work. The distribution of L and P/Q channels in chromaffin cells agrees well with previous results using the same antibodies [26,34]. Taking together, our results demonstrate the importance of syntaxin1/SNAP-25 patches in defining the spatial and temporal characteristics of the secretory response in mature secreting cells. Their spatial arrangement in relation to the VDCC microdomains can now explain the functional drastic differences found in hormone secretion in native adrenomedullary tissue and isolated cultured chromaffin cells. Our findings, stress the need of performing functional studies in adrenomedullary slices, to show the relationship between a given calcium channel subtype and the exocytotic responses. Improvement of techniques to prepare adrenal medulla slices from various species will facilitate such studies.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministry of Science and Technology (BMC2002-00845) and Ministry of Education and Culture of Spain/Fondos FEDER (BFU2005-02154/BFI), and the Generalitat Valenciana (GRUPOS 03/040). Also by grant BFI-2003-02722, Ministry of Education and Science of Spain to AGG. IL was recipient of fellowships from the Generalitat Valenciana and the MEC of Spain. DG was a fellow of the MST of Spain. BD was supported by Medical Research Council, UK.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.ceca.2006.10.004](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.10.004).

References

- [1] J.E. Heuser, T.S. Reese, Structural changes after transmitter release at the frog neuromuscular junction, *J. Cell Biol.* 88 (1981) 564–580.
- [2] M. Harlow, D. Ress, A. Koster, R.M. Marshall, M. Schwarz, U.J. McMahan, Dissection of active zones at the neuromuscular junction by EM tomography, *J. Physiol. (Paris)* 92 (1988) 75–78.
- [3] I.M. Robinson, J.M. Finnegan, J.R. Monck, R.M. Wightman, J.M. Fernandez, Colocalization of calcium entry and exocytotic release sites in adrenal chromaffin cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 (1995) 2474–2478.
- [4] M. Oheim, W. Stuhmer, Interaction of secretory organelles with the membrane, *J. Membr. Biol.* 178 (2000) 163–173.
- [5] Rettig F J., E. Neher, Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis, *Science* 298 (2002) 781–785.
- [6] M.F. Bader, R.W. Holz, K. Kumakura, M. Vitale, Exocytosis: the chromaffin cell as a model system, *Ann. NY Acad. Sci.* 971 (2002) 178–183.
- [7] R.H. Chow, L. von Ruden, E. Neher, Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells, *Nature* 356 (1992) 60–63.
- [8] R.H. Chow, J. Klingauf, E. Neher, Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91 (1994) 12765–12769.
- [9] T. Lang, D. Bruns, D. Wenzel D, et al., SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis, *EMBO J.* 20 (2001) 2202–2213.
- [10] C. Rickman, F.A. Meunier, T. Binz, B. Davletov, High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 644–651.
- [11] T. Moser, E. Neher, Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices, *J. Neurosci.* 17 (1997) 2314–2323.
- [12] G. Almazan, D. Aunis, A.G. Garcia, C. Montiel, G.P. Nicolas, P. Sanchez-Garcia, Effects of collagenase on the release of [3H]-noradrenaline from bovine cultured adrenal chromaffin cells, *Br. J. Pharmacol.* 81 (1984) 599–610.
- [13] A. Gil, S. Viniegra, L.M. Gutierrez, Dual effects of botulinum neurotoxin A on the secretory stages of chromaffin cells, *Eur. J. Neurosci.* 10 (1998) 3369–3378.
- [14] P. Neco, D. Giner, S. Viniegra, R. Borges, A. Villarreal, L.M. Gutierrez, New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27450–27457.
- [15] E. Lazarides, Actin, alpha-actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells, *J. Cell Biol.* 68 (1976) 202–219.
- [16] C. Rickman, B. Davletov, Mechanism of calcium-independent synaptotagmin binding to target SNAREs, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 5501–5504.
- [17] A. Hui, P.T. Ellinor, O. Krizanova, J.J. Wang, R.J. Diebold, A. Schwartz, Molecular cloning of multiple subtypes of a novel rat brain isoform of the alpha 1 subunit of the voltage-dependent calcium channel, *Neuron* 7 (1991) 35–44.
- [18] T.V. Starr, W. Prystay, T.P. Snutch, Primary structure of a calcium channel that is highly expressed in the rat cerebellum, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88 (1991) 5621–5625.
- [19] R.E. Westenbroek, J.W. Hell, C. Warner, S.J. Dubel, T.P. Snutch, W.A. Catterall, Biochemical properties and subcellular distribution of an N-type calcium channel alpha 1 subunit, *Neuron* 9 (1992) 1099–1115.
- [20] J.H. Phillips, K. Burridge, S.P. Wilson, N. Kirshner, Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells, *J. Cell Biol.* 97 (1983) 1906–1917.
- [21] A. Patzak, G. Bock, R. Fischer-Colbrie, et al., Exocytotic exposure and retrieval of membrane antigens of chromaffin granules: quantitative evaluation of immunofluorescence on the surface of chromaffin cells, *J. Cell Biol.* 98 (1984) 1817–1824.
- [22] L.M. Gutierrez, A. Gil, S. Viniegra, Preferential localization of exocytotic active zones in the terminals of neurite-emitting chromaffin cells, *Eur. J. Cell Biol.* 76 (1998) 274–278.

- [23] S.J. An, W. Almers, Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells, *Science* 306 (2004) 1042–1046.
- [24] W.A. Catterall, Interactions of presynaptic Ca^{2+} channels and snare proteins in neurotransmitter release, *Ann. NY Acad. Sci.* 868 (1999) 144–159.
- [25] M.G. Lopez, M. Villarroya, B. Lara, et al., Q- and L-type Ca^{2+} channels dominate the control of secretion in bovine chromaffin cells, *FEBS Lett.* 349 (1994) 331–337.
- [26] A. Gil, S. Viniegra, P. Neco, L.M. Gutierrez, Co-localization of vesicles and P/Q Ca^{2+} -channels explains the preferential distribution of exocytotic active zones in neurites emitted by bovine chromaffin cells, *Eur. J. Cell Biol.* 80 (2001) 358–365.
- [27] D. Zenisek, J.A. Steyer, W. Almers, Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones, *Nature* 406 (2000) 849–854.
- [28] M. Ohara-Imaizumi, C. Nishiwaki, T. Kikuta, K. Kumakura, Y. Nakamichi, S. Nagamatsu, Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 8403–8408.
- [29] U. Becherer, T. Moser, W. Stuhmer, M. Oheim, Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles, *Nat. Neurosci.* 6 (2003) 846–853.
- [30] J. Klingauf, E. Neher, Modeling buffered Ca^{2+} diffusion near the membrane: implications for secretion in neuroendocrine cells, *Biophys. J.* 72 (1997) 674–690.
- [31] A. Albillos, E. Neher, T. Moser, R-type Ca^{2+} channels are coupled to the rapid component of secretion in mouse adrenal slice chromaffin cells, *J. Neurosci.* 20 (2000) 8323–8330.
- [32] A. Benavides, S. Calvo, D. Tornero, C. Gonzalez-Garcia, V. Ceña, Adrenal medulla calcium channel population is not conserved in bovine chromaffin cells in culture, *Neuroscience* 128 (2004) 99–109.
- [33] E. Garcia-Palomero, J. Renart, E. Andres-Mateos, et al., Differential expression of calcium channel subtypes in the bovine adrenal medulla, *Neuroendocrinology* 74 (2001) 251–261.
- [34] E. Andres-Mateos, J. Renart, J. Cruces, et al., Dynamic association of the Ca^{2+} channel $\alpha 1A$ subunit and SNAP-25 in round or neurite-emitting chromaffin cells, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 2187–2198.



Chromaffin granule motion and fusion is influenced by SNARE cluster dynamics

Inmaculada López, Jose Antonio Ortiz, José Villanueva, Vanesa Torres, Cristina J. Torregrosa-Hetland, Maria del Mar Francés, Salvador Viniegra and Luis M. Gutiérrez*

Instituto de Neurociencias de Alicante, Universidad Miguel Hernández-Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Sant Joan d'Alacant, Alicante 03550, Spain.

* To whom correspondence should be addressed: Luis M. Gutiérrez, Instituto de Neurociencias, Universidad Miguel Hernández-CSIC, Sant Joan d'Alacant, Alicante 03550, Spain. Telephone: +34 965919562; Fax: +34 965919561; E-mail: luisguti@umh.es

Running head: SNARE cluster dynamics and exocytosis

Abbreviations: DsRed, enhanced variant of the red fluorescent protein from *Discosoma*; HSV, Herpes Simplex virus;; SNAP-25, Synaptosomal protein of 25 Kda; TIRFM; Total internal reflection fluorescent microscopy

ABSTRACT

The expression of SNAP-25 fused to green fluorescent protein (GFP) has been instrumental in demonstrating SNARE role in exocytosis. The wild type GFP-SNAP-25 and a $\Delta 9$ form, product of Botulinum Neurotoxin A activity, were employed here to study SNARE implication in vesicle mobility and fusion in cultured bovine chromaffin cells, an neuroendocrine exocytotic model. Using TIRFM, we have identified membrane microdomains of 500-600 nm diameter, that contain both SNAP-25 and syntaxin-1 and associate with synaptobrevin-II. Interestingly, while the SNAP-25 $\Delta 9$ formed similar clusters, they displayed increased mobility both laterally and in the axis perpendicular to the plasmalemma, and this correlates with the enhanced dynamics of associated chromaffin granules. SNARE cluster enhanced motion is reversed by elevation of the intracellular calcium level. Furthermore, single vesicle fusion was unlikely in the highly mobile vesicles present in the cells expressing SNAP-25 $\Delta 9$, which in addition, displayed in average slower fusion kinetics. Consequently, SNARE cluster dynamics is a new factor to consider when determining the factors contributing to the mobility of the vesicles in close vicinity to the plasma membrane and also the probability of exocytosis of this granule population.

INTRODUCTION

Exocytosis is a key event in the regulated release of neurotransmitters in neurons and neuroendocrine cells. The characterization of various proteins (SNAREs) that form the core complex involved in the specific docking and fusion of neurotransmitter-containing vesicles, has stimulated unprecedented progress towards elucidating the molecular bases of exocytosis (Bennett *et al.*, 1992; Sollner *et al.*, 1993; Bennett and Scheller, 1993; Sudhof, 2000). The assembly of plasma membrane proteins (t-SNAREs) such as syntaxin 1 (Bennett *et al.*, 1992) and SNAP-25 (Oyler *et al.*, 1989), as well as vesicle associated proteins (v-SNAREs) such as synaptobrevin II (Trimble, 1993), provides the specificity required for vesicle docking and probably, the basic machinery for membrane fusion (Weber *et al.*, 1998). In addition to the use of classical tools such Clostridial neurotoxins (Montecucco and Schiavo, 1994), the generation of engineered SNARE constructs fused to the green fluorescent protein (GFP) has proven instrumental in defining the involvement of these proteins in specific steps of exocytosis. For instance, the use of a functional GFP-SNAP-25 chimera demonstrated the importance of specific amino acids in the C-terminal domain of this protein for core complex assembly and normal vesicle fusion in chromaffin cells, an accepted model of neuroendocrine exocytosis (Criado *et al.*, 1999). Subsequently, this and other constructs were employed to define the different stages of SNARE complex formation, its interaction with other proteins or factors, and the recruitment of different vesicle reservoirs (Xu *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2000; Rettig and Neher, 2002; Gil *et al.*, 2002; Sorensen *et al.*, 2002). Together, these studies demonstrated that ternary complex formation constitutes a late stage in membrane fusion. However, the chain of interactions between SNAREs and other proteins that controls this process (involving SNAPs, synaptotagmin, munc-18, etc) essentially remains undefined. In this sense, it has recently been established that

syntaxin-1 and SNAP-25 associate to form a stable intermediate SNARE complex (Rickman *et al.*, 2004; An and Almers, 2004). Moreover, these dimers cluster at the plasma membrane, defining the active sites for exocytosis of dense granules in chromaffin cells (Lopez *et al.*, 2006).

In the present work, we have studied the existence of SNARE clusters in the plasma membrane of living chromaffin cells by over-expressing normal and altered forms of GFP and DsRed SNAP-25. Combining the use of these tools with total internal reflection fluorescent microscopy (TIRFM, Steyer *et al.*, 1997; Oheim *et al.*, 1998), a highly sensitive technique to resolve plasma membrane related events, has enabled us to produce a detailed description of how the manipulation of a SNARE protein alters the dynamic properties of the membrane patches formed by these proteins. More interestingly, the modification of the mobility of these patches is associated with the perturbation of chromaffin granule dynamics and also the probability of fusion.

MATERIALS AND METHODS

Chromaffin cell preparation and culture.

Chromaffin cells were isolated from bovine adrenal glands by collagenase digestion and they were further separated from the debris and erythrocytes by centrifugation on Percoll gradients as described elsewhere (Gutierrez *et al.*, 1997). The cells were maintained as monolayer cultures in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % fetal calf serum, 10 μ M cytosine arabinoside, 10 μ M 5-fluoro-2'-deoxyuridine, 50 IU/ml penicillin and 50 μ g/ml streptomycin. The cells were harvested at a density of 150,000 cells/cm² in 35 mm-Petri dishes (Costar), and they were used between the third and sixth day after plating.

Generation of GFP and DsRed constructs with SNAP-25 and synaptobrevin, and cell infection.

The pEGFP-C3 and pDsRed-C3 expression vectors (Clontech, Palo Alto, CA) encode a red-shifted variant of wild-type GFP and RFP respectively (Cormack *et al.*, 1996). The cDNA corresponding to the SNAP-25a isoform (Bark and Wilson, 1994) was cloned into the XhoI and BamHI sites of pEGFP-C3 and pDsRed-C3 to express this protein fused in-frame at the C-terminus to EGFP (construct EGFP-S-25) and DsRed (construct DsRed-S-25) respectively. The $\Delta 9$ deletion was generated by PCR of a fragment corresponding to the C-terminus of SNAP-25, using the EGFP-S-25 construct as template and a sense primer that corresponds to amino acids 80-86 of SNAP-25 (5'-AGATTTAGGGAAATGCTGTGG-3'). The amplified DNA carried an internal HindIII site, close to the 5'-end, and the previously mentioned BamHI site at the 3'-end. These enzymes were used to substitute the original SNAP-25 sequence by the modified one in the EGFP-SNAP-25 and DsRed-SNAP-25 vectors.

To produce an N terminal in-frame fusion of synaptobrevin with EGFP or DsRed, the coding region corresponding to synaptobrevin II was amplified by PCR with the following primers: 5'-GCCGAATTCCCGCCATGTCGGCTACC-3' (sense) and 5'-GCCGGATCCGAGC-TGAAGTA-AACGATGATG -3' (antisense). The PCR product was digested with *EcoRI* and *BamHI* and cloned into the same sites of the pEGFP-N1 and pDsRed-N1 expression vectors.

The constructs were transferred from the pEGFP-C3/N1 or pDsRed-C3/N1 vectors to the pHSVpUC vector (Geller *et al.*, 1993) and primary cultures of chromaffin cells were infected with the Herpes Simplex virus (HSV-1) amplicon containing these constructs. The packaging of the different helper viruses (HSV-1 IE2 deletion mutant

5dl 1.2) was carried out as described previously (Lim *et al.*, 1996). The viral infection efficiency was determined by fluorescent microscopy using serial dilutions of the purified virus. The dilution producing 20-40% infection efficiency (usually 20-40 μ l virus per 35 mm-plate containing 1 ml of medium) was chosen for the subsequent experiments. EGFP and DsRed fluorescence was observed one day after infection and it persisted for at least two days.

Confocal microscopy studies of the cellular distribution of SNAP-25 and syntaxin 1.

Cells expressing GFP-SNAP-25 constructs were fixed and permeabilized using a modification (Aunis *et al.*, 1980) of the method described by Lazarides (Lazarides, 1976). Briefly, cells were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffered saline solution (PBS) for 20 min. The cells were then permeabilized with 0.2 % Triton X-100 in 3.6 % formaldehyde for 10 min and washed twice for 10 min with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS. Labeling of syntaxin-1 was performed overnight in PBS + 3% BSA containing a 1:200 dilution of chicken antibodies raised against recombinant rat syntaxin1A. After extensive washes, a secondary TRICT-coupled rabbit anti-chicken antibody (1:200 dilution, Sigma, Madrid, Spain) was added and after 2 h, the unbound material was washed away with PBS. In some experiments, anti-dopamine β -hydroxylase antibodies were employed as described elsewhere (Lopez *et al.*, 2006) to determine exocytotic sites in the plasma membrane of cells expressing GFP-SNAP-25 constructs.

Fluorescence was visualized using an Olympus Fluoview FV300 confocal laser system mounted in a IX-71 inverted microscope incorporating a 100X UPlanSApo oil-immersion objective. This system allows for z axis reconstruction with theoretical z slices about 0.5 μ m thick, and sequential mode studies in double labeling experiments.

Total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM) studies of GFP and DsRed-SNAP-25 dynamics, vesicular motion and fusion.

A through-the-lens TIRFM system was configured using the Olympus IX-71 inverted microscope indicated above with a 60x PlanApo 1.45 N.A. Olympus TIRFM objective. Epifluorescence and laser illumination (488 nm argon ion 40 mW or 543 nm He/Ne 10 mW: Melles Griot, Carlsbad, CA, USA) was selected using an Olympus TIRFM IX2-RFAEVA combiner system, modifying the angle of laser incidence. Fluorescence emission was split using an Optosplit II system (Cairn Research Ltd, Faversham, UK) equipped with GFP and rhodamine filter sets. The separated images were simultaneously acquired at 20 ms per frame using an Electron Multiplier CCD cooled camera (C9100-02 model, Hamamatsu photonics, Japan) and stored in an IBM compatible PC. TIRFM calibration was performed using 100 nm fluorescent beads (Molecular Probes, Invitrogen detecting technologies, Carlsbad, CA, USA). The fluorescence intensities were determined at different vertical planes with step lengths of 50 nm using the motorized system mounted on the microscope and the image was obtained for both epifluorescence and TIRFM. The depth of penetration for the evanescent field was estimated as ~ 200 nm ($1/e$ depth of 180 ± 16 nm) mainly permitting the visualization of the static beads adhered to the coverslip. In contrast, beads in suspension undergoing random movement were infrequently seen in TIRFM and the vast majority were visualized by epifluorescence. Vesicle labeling was performed using either 1 μ M lysotracker red (Becherer *et al.*, 2003) in experiments aimed at studying the motion of granules colocalized with GFP-SNAP-25 patches or for 15 min with 2 μ M acridine orange in experiments studying vesicle fusion. In the latter, the granules were assessed by the red acridine orange fluorescence in mature acidic vesicles whereas their fusion was followed by the green flashes produced after matrix neutralization during exocytosis.

Images were processed using the ImageJ program with Plugins for: particle centroid tracking, ROI measurements, image average, multiple channel image comparison, and co-localization analysis (Neco *et al.*, 2004). Further analysis such as the MSD determinations according to (Qian *et al.*, 1991) and z distances according to (Johns *et al.*, 2001) were performed using home made macros for Igor Pro (WaveMetrics Inc, Lake Oswego, OR, USA). For the analysis of fusion events in acridine orange labeled vesicles, the green channel images taken at 20 ms intervals that showed fusion flashes were subjected to maximal intensity determination (see Figure 7) and transferred to Igor Pro. Fusion events were analyzed using software developed for amperometric detection of exocytotic events (Quanta analysis, Mosharov and Sulzer, 2005). Kinetic parameters such the time at the half height amplitude ($t_{1/2}$) were obtained for hundreds of fusion events and they were represented as distributions. The fusion peak shape was averaged for individual cells and studied for statistical variations.

Graphics were obtained with IgorPro, Graphpad Prism (GraphPad software, San Diego, CA, USA) and Adobe Photoshop 7.0.

RESULTS

Native or altered forms of SNAP-25 fused to GFP form clusters in cultured bovine chromaffin cells.

This study was based on the expression of native and mutant SNAP-25 proteins in chromaffin cells with the aim of competing and eventually, substituting native SNAP-25 (Criado *et al.*, 1999). In addition, the SNAP-25a constructs utilized were coupled at their C-terminus to GFP to facilitate the visualization of the exogenously expressed protein (Bark and Wilson, 1994). This region of SNAP-25 was chosen for the fusion because it was less critical for protein function, permitting SNARE complex

formation (Hayashi *et al.*, 1994; Gil *et al.*, 2002). Two days after infection, bright green fluorescence could be detected in a high proportion of chromaffin cells, indicative of the expression of the GFP-SNAP-25 constructs. Inspecting the cells under TIRFM revealed the presence of round fluorescent patches, both in cells expressing the fusion protein containing the wild-type isoform (Fig. 1A) and in those expressing SNAP-25 lacking the last 9 C-terminal residues (GFP-SNAP-25 $\Delta 9$, Fig. 1B). This latter construct was designed on the basis of the cleavage of the same residues due to the inhibitory activity of BoNT A. The distribution of the size of the patches was similar with both constructs, with mean values of 0.25-0.26 μm^2 and modal values around 0.18-0.2 μm^2 . These values indicate the presence of similar circular patches for both constructs with a mean diameter of 550-600 nm and a most frequent value around 500 nm, larger than the average chromaffin vesicle diameter. Furthermore, both constructs were expressed at similar densities, around 0.12-0.14 clusters/ μm^2 . Since these measurements were similar to those obtained for syntaxin1/SNAP-25 plasma membrane microdomains in chromaffin cells (Rickman *et al.*, 2004) and in adrenal tissue (López *et al.* 2006), we assessed whether syntaxin1 was present in the cells expressing GFP-SNAP-25 constructs by immunostaining (López *et al.*, 2006). The distribution of syntaxin1 matched perfectly that of GFP-SNAP-25 in our TIRFM images (Fig. 2), reflected in the yellow color generated by superimposing the images. Moreover, there was a high degree of colocalization, as it is shown in the colocalization mask depicting the pixels displaying more than 50 % of the fluorescence intensity in both channels. When these images were visualized by confocal microscopy, 3D reconstruction depicted the patches at the periphery of the chromaffin cell spherical volume (see [video 1](#) in Supplementary Material, use the repeat option of your video viewer when playing these videos). Most of the SNAP-25 microdomains also contained synaptobrevin-2 in cells that co-

expressed GFP-synaptobrevin-2 and DsRed-SNAP-25 (Fig. 2 E to H). To demonstrate that these SNARE clusters are located indeed in the plasma membrane of the cells expressing the GFP-SNAP-25 constructs we conceived experiments labeling the exocytotic sites by antibodies against dopamine- β -hidroxylase incorporated into the plasmalemma after exocytosis. Confocal images of GFP-SNAP-25 and exocytotic sites show the disposition of both labelings in the same plane of the cell periphery (Figure 1, Supplementary Material). These experiments demonstrated that the SNAP-25 constructs form patches in the plasma membrane of cultured chromaffin cells and that these microdomains also contain syntaxin-1, as well as interacting with the GFP-synaptobrevin-2 present in chromaffin vesicles (Gil *et al.*, 2002).

SNARE microdomains formed by GFP-SNAP-25 and GFP-SNAP-25 Δ 9 display different mobility.

The morphological parameters of the microdomains formed by the wild type and the Δ 9 GFP-SNAP-25 constructs are very similar. However, time lapse studies taken at 1 s intervals during 1 min periods, revealed that they display quite different mobility (see the behavior of the microdomains depicted in Fig 3 A and B and the clearly different dynamics visualized in [video 2](#) -GFP-SNAP-25 wild type, 6 times accelerated- and [video 3](#) -GFP-SNAP-25 Δ 9- in the Supplementary Material). GFP-SNAP-25 microdomains displayed limited movement characterized by short range oscillations in the XY plane and a very stable average ROI intensity during the period of observation, indicative of restricted mobility in the Z plane in TIRFM images (Fig. 3 C and D). In contrast, patches of the truncated form moved more freely in the XY plane and displayed more pronounced oscillations, suffering less restriction to their movement in the Z axis. An analysis of microdomain mobility by tracking the centroids

corresponding to the patches observed showed the differences in the velocities between these two forms of SNAP-25 (Fig. 4 A). Wild type SNAP-25 presented a relatively narrow distribution of velocities that fits well to a Gaussian model centered on the modal value of 20 nm/s and with a mean average speed of 22 ± 1 nm/s. Alternatively, the GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ patches displayed a wider distribution centered on a modal Gaussian value of 32 nm/s and with a mean average speed of 36 ± 3 nm/s. This analysis also indicated that 25-30 % of the microdomains formed by the truncated construct were more mobile than any of the patches formed by the wild type construct. The mean square displacement (MSD) was also analyzed at different time intervals and these values were averaged to generate the MSD vs time plot (Fig. 4 B). Assuming that patch movement is governed by a single diffusion coefficient, its value can be derived from the fitted slope (slope= $4xD$: Qian *et al.*, 1991). Thus, the diffusion coefficient was calculated as $4.6 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ for GFP-SNAP-25 microdomains (n=74 patches from 29 cells), whereas the theoretical diffusion coefficient was estimated to be $12.0 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ for the GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ construct (n=99 patches from 33 cells). This value was twice that of the characteristic diffusion coefficient for the patches in cells expressing the wild type form of SNAP-25.

Further evidence of this change in the mobility of the SNARE patches was obtained from the study of their motion in the Z plane. The maximum fluorescence intensity corresponding to the pixels defining SNARE patches were studied (72 patches for both constructs during 60 s taken at 1 s intervals), and then these fluorescence intensities were transformed into z distances using the equation defining the exponential evanescent field decay. The z distances were calculated for 3 representative patches containing either construct during 1 min period (Fig. 5A). As observed the brilliant patches of GFP-SNAP-25 wild type tend to move in distances ranging from 50 to 100

nm on the glass coverslip where the evanescent field is originated. In contrast, the GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ patches moved further and were generally spread over a wider range, covering distances from 150 to 250 nm. The fraction of time individual patches spent at different distances from the origin of the evanescent field was estimated and plotted as a distribution (Fig. 5B). While the patches formed by wild type SNAP-25 presented an average oscillation with a maximum probability of finding them at the modal Gaussian value of 80 nm (average mean value of 128 ± 9 nm, $n=74$ patches), the GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ patches presented a maximal probability of being locating at about 150 nm (average mean distance of 197 ± 14 nm, $n=72$ patches). The amplitude of movement could be calculated for each individual patch (Δz) during the experimental observation time of 1 min. These Δz values could be binned (20 nm step size) and analyzed as distributions for the values corresponding to both GFP-SNAP-25 constructs. Accordingly, the magnitude of these changes are clearly greater for the $\Delta 9$ truncated construct when compared with the z increments found for the wild type patches (Fig. 5C and D). On average, the mean mobility range was found to be 107 ± 7 nm for the wild type patches versus 150 ± 9 nm for the patches formed by the truncated isoform. Taking together the results obtained regarding both XY and Z movement, it was clear that the patches formed by the truncated form of SNAP-25 are subjected to less restricted movement, oscillating in a dimension covering the radius of the average granule. Thus, they tend to be located further from the cell limits and hence, the exocytotic sites in the plasmalemma.

SNARE cluster enhanced motion in cells expressing the truncated form is abolished by high $[Ca^{2+}]_i$

Is SNARE microdomain behaviour linked to the molecular properties of SNAP-25 regarding core complex formation?. To answer this question, we conceived an experiment based in the seminal observation that in cells treated with BoNT A, high levels of intracellular calcium promotes synaptotagmin binding to the SNAP-25 forming part of the complex overcoming the toxin effects (Lynch *et al.*, 2007). Cells expressing GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ were incubated in a médium containing 10 mM calcium in the presence of the calcium ionophore ionomycin (5 μM , 5 min), time-lapse studies of cluster mobility was performed before and after cell treatment. Figure 6 shows that the mobility of the SNARE clusters characteristic of the truncated form expression were affected by this manipulation increasing intracellular calcium levels. The study performed in 79 patches from 30 cells proved for example that the average speed of 36 ± 1 nm/s and the coefficient of diffusion of $12.1 \pm 0.3 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ changed to 25 ± 1 nm/s and $4.3 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$, respectively (Fig. 6 C and D). In addition the clusters become brighter indicating the approximation to the origin of the evanescent field and ΔZ changed from 148 ± 7 nm to 74 ± 8 nm (n=73 patches). Thus, increasing $[\text{Ca}^{2+}]_i$ changes both, lateral and Z motion parameters of the patches formed by truncated SNAP-25 to values that were characteristic of the clusters containing the wild type form.

Vesicle motion is correlated with the mobility of SNARE patches.

To address how the behavior of SNARE microdomains influences vesicle motion, we labeled chromaffin granules with the acidophilic dye lysotracker red in cells expressing the GFP-SNAP-25 constructs (Becherer *et al.*, 2003). TIRFM was used to first visualize the position of the GFP-SNAP-25 microdomains (Figure 7A), and then the laser and critical angle was changed to visualize the vesicles (Figure 7B) and to

analyze the motion of the vesicles that colocalized with the SNARE patches (Figure 7C and D). Accordingly, we ensured that the vesicles studied were associated with SNARE clusters where the exogenous GFP-SNAP-25 was present. The velocity distribution histogram and the analysis of MSD vs interval time plots revealed a strict relationship between the movement of the SNARE cluster and the mobility of the associated granules. Granules associated with the wild type SNAP-25 isoform moved with an average speed of 23 ± 1 nm/s and the apparent coefficient of diffusion was estimated as $3.7 \pm 0.2 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (n= 64 vesicles from 10 cells), approaching the values obtained for the movement of SNARE microdomains. More interestingly, the vesicles associated with SNARE clusters comprised of the truncated $\Delta 9$ form of SNAP-25 (Figure 7E to H) displayed more rapid lateral motion, reaching an average speed of 30 ± 1 nm/s and a diffusion coefficient of $15.0 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (n=57 granules from 10 cells). Furthermore, the vesicles associated with the SNARE microdomains containing truncated SNAP-25 were preferentially localized further away from the plasma membrane in the z plane (Fig. 7K), displaying a significantly enhanced amplitude of z movement (Fig 7, L). Thus, considering the parameters obtained for lateral movement and that in the z plane, as well as the shape of the corresponding distributions, the mobility of the chromaffin vesicles in the proximity of the plasma membrane was strictly related to the dynamic characteristics of the SNARE clusters associated with the granules. These conclusions were obtained from independent measurements of SNARE cluster and vesicle dynamics, and since different laser wavelengths were used there can not be influenced by fluorescence cross-talk. Furthermore, the colocalization of DsRed-SNAP-25 and lysotracker green vesicles labeling over time in experiments performed using single laser illumination under TIRFM and with simultaneous acquisition further

supported the conclusions, particularly given that the critical TIRFM angle is fixed (see Supplementary Material Figure 2).

Highly mobile granules in cells expressing SNAP-25 Δ 9 display a low probability of exocytosis.

In order to study the impact of the changes observed in SNARE and vesicle movement on the secretory process, TIRFM was performed to correlate vesicle motion with the fusion process. Such experiments required the expression of DsRed-SNAP-25 constructs and incubation with 2 μ M acridine orange, a dye that accumulates in the granule matrix and produces an increase in green fluorescence upon neutralization during exocytosis. It is important to note that acridine orange accumulated in acidic matured granules also produces an emission of red fluorescence that could also be used to visualize the vesicle population. Both, DsRed and acridine orange are excited with the same 488 nm laser and therefore, we can simultaneously assess the presence of vesicles/SNARE (red fluorescence, left side of images and videos) and exocytotic fusion (flashes of green fluorescence, right side) using an emission splitter (as seen in Fig. 8 and the corresponding video 4 and video 5 of Supplementary material).

The cells expressing strong red fluorescence of DsRed-SNAP-25 expression (Fig. 8A) were subjected to depolarizing stimuli (KCl 59 mM) for 1 min and the number of fusing granules were calculated from the accumulative average images of the green emission channel (Fig. 8C). The percentage of fused vesicles was estimated and in cells expressing wild type DsRed-SNAP-25, 76 ± 4 % of the vesicles visualized in TIRFM fused during a 1 min stimulus (Fig. 8E, 515 fusions observed from the 700 vesicles studied). The red emission images (see video 4) demonstrated that these granules presented very limited movement, characteristic of the wild type form of

SNAP-25. When the cells expressed the $\Delta 9$ truncated SNAP-25, granule movement evidently increased (see video 5) but fewer vesicles fused during the prolonged 1 min depolarization (Fig. 8B and D, 434 fusions of the 1029 vesicles studied in 19 cells). While these experiments represented the average of many cells, they resulted in an estimated 42 ± 6 % of fusion during a 1 min stimulation, almost half of that estimated for control cells expressing the wild type form (Fig. 8 E). Moreover, even in cells infected with the amplicons expressing the truncated form of SNAP-25, most of the granules that fuse present relatively little movement compared with the granules that display higher mobility and that rarely exocytose. In fact, we have estimated that 19 % of the vesicles present high mobility, moving more than 2 vesicle diameters in 20 s (191 vesicles from 1029 studied) and only an 8 % of these vesicles fused (Fig. 8 F). In the same cells expressing the truncated $\Delta 9$ form of SNAP-25, the rest of the vesicles (81 %) present low mobility and higher probability of fusion (50 ± 5 %, n=19 cells). Thus, the probability of fusion of the vesicles presenting high mobility is significantly lower ($p < 0.0001$) than the corresponding to the relatively immobile vesicles (Fig. 8 F)

The images of granule fusions at 20 ms intervals could be used to study the overall level of secretion, and the maximal fluorescence in the green channel could be plotted versus time to produce a secretory profile with individual exocytotic events as spikes (Fig. 8G). A simple inspection of the two profiles revealed the diminished probability of fusion found for the cells expressing the truncated isoform of SNAP-25.

Vesicle fusion is slower in chromaffin cells expressing more mobile SNARE microdomains.

Interestingly, well resolved optical spikes that resemble amperometric fusion events could be used to analyze the individual fusion kinetics. Indeed, the time course

of the green flashes were parallel to vesicle disappearance by exocytotic fusion (visualized in the red channel), as can be observed for the granules of control and truncated SNAP-25 expressing cells (Fig. 9A and B). These fusion spikes could then be analyzed in order to obtain the kinetic properties of such fusion events, obtaining parameters such the time at the half height ($t_{1/2}$) that revealed the speed of release. When hundreds of such events were studied in cells expressing the wild type form of SNAP-25, it was evident that the fusion characteristics were relatively homogeneous, with $t_{1/2}$ distributions centered on a modal value of around 120 ms and an average value of 178 ± 7 ms. (n=370 vesicles from 22 cells, Fig. 9G). Thus, the most frequent spike in cells expressing the wild type form of SNAP-25 is relatively narrow (see Fig. 9E), indicating that the release of the acridine orange from the granules in less than 500 ms in this optical measurement (see the average spike in Fig. 9F). When the fusion spikes of the cells expressing GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ were analyzed, the distribution revealed a $t_{1/2}$ modal value of 160 ms with a mean value of 218 ± 9 ms (n=342 fusions from 29 cells), representing a relatively small but statistically significant increase of 22 % from the control values ($p < 0.001$, Fig. 9H). Thus, the most frequent and average fusion spikes from cells expressing the truncated form revealed slower kinetics than the control fusion events obtained in cells expressing the wild type isoform (Fig. 9F). Moreover, even in cells infected with the amplicons expressing the truncated form of SNAP-25, most of the granules that fuse present relatively little movement compared with the granules that display higher mobility and that rarely exocytose. In fact, we only detected 4 fusions in the more mobile granules from the 342 vesicle fusions analyzed. These granules displayed oscillations in fluorescence considered as high mobility in the Z axis prior to fusion (as observed in Fig. 9E).

DISCUSSION

Present data indicate that the mobility of the SNARE complexes is a new parameter to consider influencing the movement of the associated vesicles located in the proximity of the plasmalemma. We found also that the formation of highly mobile patches on the expression of the $\Delta 9$ truncated form of SNAP-25 reduces the probability of vesicle fusion. This is in keeping with the effects of Botulinum Neurotoxin A which cleaves SNAP-25 and yields a product identical to $\Delta 9$ construct. Therefore, SNARE cluster dynamics largely determine not only the mobility of the vesicles in close vicinity to the plasma membrane but also the probability of exocytosis.

SNAREs form dynamic microdomains when expressed in neuroendocrine chromaffin cells

We found that GFP-SNAP-25 forms round clusters that are associated with syntaxin-1 and that also interact with GFP-synaptobrevin II. These clusters are present at the cell contour in equatorial confocal images and they have an average diameter of 500-600 nm, in agreement with the size of SNARE microdomains in cultured chromaffin cells (Rickman *et al.*, 2004) and intact adrenal tissue (López *et al.*, 2006). The relatively high fluorescence intensity and the absence of decay catastrophe (all or non decay of fluorescence) seem to be incompatible with these being individual SNARE molecules. Membrane associated clusters of SNAREs have also been reported in other secretory systems such PC12 (Lang *et al.*, 2001) and MIN6 beta cells (Ohara-Imaizumi *et al.*, 2004). Furthermore, TIRFM imaging reveals that the dynamics of such clusters correspond to relatively immobile patches when considering the wild-type GFP-or DsRed SNAP-25. Indeed, the modal speed of 20 nm/s corresponded to the

linear displacement of one patch diameter in 30 s. Since the movement reverses direction continuously, the “normal” patch rarely moves further than one diameter during the experimental period of minutes. This restricted movement changes significantly when considering the truncated $\Delta 9$ SNAP-25 isoform, increasing the average speed by about 50 % and by two-fold the apparent diffusion coefficient. This enhancement of SNARE cluster kinetics could be appreciated in the accelerated videos provided here. Moreover, the narrow evanescent field of excitation in TIRFM (around 200 nm) is particularly sensitive to the movement in the Z plane of such clusters. While the wild-type clusters moved over distances of around 80-100 nm, the modal value for GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ clusters was around 150 nm. Interestingly, the range of Z movement (ΔZ) displayed a significant increase in the amplitude of Z motion for the truncated isoform of SNAP-25. Interestingly, intracellular calcium elevation changes the motion of these highly mobile patches to the more restricted motion characteristic of the microdomains formed by the wild-type form of SNAP-25. Since, it has been proven that high calcium promotes synaptotagmin binding to the C-terminus of SNAP-25 forming part of SNARE complexes in cells treated with BoNT A (Lynch *et al.*, 2007). These experiments along with the prior demonstration of the formation of ternary SNARE complexes with diminished thermostability by SNAP-25 $\Delta 9$ (Gil *et al.*, 2002), support the notion that this truncated isoform contributes to labile SNARE complexes with an open conformation (Xu *et al.*, 1999). Such a conformation would favour a wider amplitude of movement as detected in our TIRFM experiments, but elevated calcium will drive the formation of productive tight complexes with its characteristic cluster low motion, in any case SNARE patches have a restricted z movement oscillating in a range covering 1/3 to 1/2 of the average granule diameter .

The motion of chromaffin granules is correlated with SNARE microdomain dynamics

An important consequence of the formation of SNARE complexes with different biochemical and dynamic properties is the alteration of the movement of vesicles in the immediate vicinity of the plasma membrane. This was evident through the analysis of the movement of the vesicles that colocalize with SNARE patches in the XY and Z planes. This is the first direct demonstration of how a labile GFP-SNARE construct affects the movement of the docked or tethered vesicles located close to the membrane. This observation accounts for the change in the rate and range of lateral movement of granules in chromaffin cells treated with Botulinum Neurotoxin A (Tsuboi *et al.*, 2001). It also clarifies the shorter residence time of the vesicles closely apposed to the plasmalemma in cells expressing the neurotoxin (Johns *et al.*, 2001). Our results support the idea that t-SNAREs strongly influence the tethered state of the vesicles, initially identified in mouse embryonic chromaffin cells lacking the syntaxin-1 binding modulator Munc18-1 (Toonen *et al.*, 2006). Two models of tethering have been proposed on the basis of these data. While the first implies the possibility of an initial docking to a Munc-18/syntaxin 1 platform and a posterior interaction with SNAP-25, the second model implies the formation of syntaxin 1/SNAP-25 dimers in which Munc-18 facilitates posterior binding to v-SNAREs. Our results favour the latter model, since syntaxin-1 is present in the dynamic SNAP-25 clusters and these microdomains pre-exist and define the sites for vesicle fusion (López *et al.*, 2006). In addition our results are in agreement with the recent demonstration that the primed and docked states could be distinguished by the mobility of the vesicles (Nofal *et al.*, 2007), while we move further by proving the direct implication of SNAREs through the change in the mobility of their clusters linking the vesicles with the plasma membrane.

Exocytosis is impaired in highly mobile SNARE microdomains comprised of SNAP-25 Δ 9.

Our experimental approach using TIRFM allowed us to analyze also how the change in the dynamic properties of SNARE clusters influences fusion kinetics. In doing so, we also developed a new approach to analyze fusion kinetics based on the increase of green fluorescence after acridine orange neutralization during exocytosis, a methodology that is an optical simile of the amperometrical detection of catecholamines. The most striking finding was the low probability of fusion observed for highly mobile vesicles that constitute 33% of the granules present in the cells expressing the truncated SNAP-25 construct. When we analyzed the total fusion of vesicles with different mobility's, the probability of fusion in a cell expressing the truncated form was a half that in cells expressing the wild type form. Indeed, fusion of a highly mobile vesicle was a rare event, and we only found 4 fusions from 342 analyzed events in cells expressing SNAP-25 Δ 9. Therefore even in the cells presenting an elevated number of highly mobile vesicles, the probability of fusion of these vesicles was estimated to be around 3-4 %, and most of the fusion observed came from relatively "normal" immobile vesicles. However, this truncation had a relatively minor effect on the fusion kinetics, which was only slightly slower than those in control cells. This effect is relevant since SNAP-25 is thought to participate in the modulation of fusion pore kinetics. This is important to define the exact role of SNAREs as part of the fusion machinery (Weber *et al.*, 1998). However, this issue is controversial since this role is supported by some studies based on amperometric measurements (Criado *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 2002), while no relevant changes in fusion kinetics were found in others (Xu *et al.*, 1998; Graham *et al.*, 2002). To solve this question further study of the fusion

pore behaviour in cells where the native protein is absent will be instrumental. Nevertheless, the present work clearly establishes that altered forms of SNAREs give rise to the formation of clusters with differential kinetic properties, altering the coupling of vesicles to the plasma membrane and therefore, the mobility of the docked or tethered vesicles. Accordingly, this significantly affects the probability of fusion of these highly mobile granules. The possibility of visualizing SNARE clusters, associated vesicles and the fusion process itself represents an opportunity to study not only the associated dynamics of the elements constituting the secretory machinery, but also the interaction of these elements with other factors, such as docking and tethering proteins that comprise the active sites for exocytosis (i.e., cytoskeleton).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Lerma and Davletov for the critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Education and Culture (MEC, Fondos FEDER: BFU2005-02154), and the Generalitat Valenciana (GRUPOS 03/040 and ACOMP06/036). IL was recipient of a fellowship from the MEC of Spain.

REFERENCES

- An,S.J. and Almers,W. (2004). Tracking SNARE complex formation in live endocrine cells. *Science* 306, 1042-1046.
- Aunis,D., Guerold,B., Bader,M.F., and Cieselski-Treska,J. (1980). Immunocytochemical and biochemical demonstration of contractile proteins in chromaffin cells in culture. *Neuroscience* 5, 2261-2277.
- Bark,I.C. and Wilson,M.C. (1994). Human cDNA clones encoding two different isoforms of the nerve terminal protein SNAP-25. *Gene* 139, 291-292.
- Becherer,U., Moser,T., Stuhmer,W., and Oheim,M. (2003a). Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles. *Nat. Neurosci.* 6, 846-853.

Bennett,M.K., Calakos,N., Kreiner,T., and Scheller,R.H. (1992). Synaptic vesicle membrane proteins interact to form a multimeric complex. *J. Cell Biol.* *116*, 761-775.

Bennett,M.K. and Scheller,R.H. (1993). The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 2559-2563.

Cormack,B.P., Valdivia,R.H., and Falkow,S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* *173*, 33-38.

Criado,M., Gil,A., Viniestra,S., and 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. U. S. A* *96*, 7256-7261.

Geller,A.I., Doring,M.J., Haycock,J.W., Freese,A., and Neve,R. (1993). Long-term increases in neurotransmitter release from neuronal cells expressing a constitutively active adenylate cyclase from a herpes simplex virus type 1 vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *90*, 7603-7607.

Gil,A., Gutiérrez,L.M., Carrasco-Serrano,C., Alonso,M.T., Viniestra,S., and 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.

Graham,M.E., Washbourne,P., Wilson,M.C., and Burgoyne,R.D. (2002). Molecular analysis of SNAP-25 function in exocytosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *971*, 210-221.

Gutiérrez,L.M., Viniestra,S., Rueda,J., Ferrer-Montiel,A.V., Canaves,J.M., and Montal,M. (1997). A peptide that mimics the C-terminal sequence of SNAP-25 inhibits secretory vesicle docking in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 2634-2639.

Hayashi,T., McMahon,H., Yamasaki,S., Binz,T., Hata,Y., Sudhof,T.C., and Niemann,H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* *13*, 5051-5061.

Johns,L.M., Levitan,E.S., Shelden,E.A., Holz,R.W., and Axelrod,D. (2001). Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J. Cell Biol.* *153*, 177-190.

Lang,T., Bruns,D., Wenzel,D., Riedel,D., Holroyd,P., Thiele,C., and Jahn,R. (2001). SNAREs are concentrated in cholesterol-dependent clusters that define docking and fusion sites for exocytosis. *EMBO J.* *20*, 2202-2213.

Lazarides,E. (1976). Actin, alpha-actinin, and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in nonmuscle cells. *J. Cell Biol.* *68*, 202-219.

Lim,F., Hartley,D., Starr,P., Lang,P., Song,S., Yu,L., Wang,Y., and Geller,A.I. (1996). Generation of high-titer defective HSV-1 vectors using an IE 2 deletion mutant and quantitative study of expression in cultured cortical cells. *Biotechniques* *20*, 460-469.

Lopez,I., Giner,D., Ruiz-Nuno,A., Fuentealba,J., Viniestra,S., Garcia,A.G., Davletov,B., and Gutierrez,L.M. (2006). Tight coupling of the t-SNARE and calcium channel

microdomains in adrenomedullary slices and not in cultured chromaffin cells. *Cell Calcium*.

Lynch, K.L., Gerona, R.R., Larsen, E.C., Marcia, R.F., Mitchell, J.C., and Martin, T.F. (2007). Synaptotagmin C2A loop 2 mediates Ca²⁺-dependent SNARE interactions essential for Ca²⁺-triggered vesicle exocytosis. *Mol. Biol. Cell* 18, 4957-4968.

Montecucco, C. and Schiavo, G. (1994). Mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Mol. Microbiol.* 13, 1-8.

Mosharov, E.V. and Sulzer, D. (2005). Analysis of exocytotic events recorded by amperometry. *Nat. Methods* 2, 651-658.

Neco, P., Giner, D., Viniegra, S., Borges, R., Villarroel, A., and Gutiérrez, L.M. (2004). New roles of myosin II during vesicle transport and fusion in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 279, 27450-27457.

Nofal, S., Becherer, U., Hof, D., Matti, U., and Rettig, J. (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J. Neurosci.* 27, 1386-1395.

Ohara-Imaizumi, M., Nishiwaki, C., Kikuta, T., Kumakura, K., Nakamichi, Y., and Nagamatsu, S. (2004). Site of docking and fusion of insulin secretory granules in live MIN6 beta cells analyzed by TAT-conjugated anti-syntaxin 1 antibody and total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Biol. Chem.* 279, 8403-8408.

Oheim, M., Loerke, D., Stuhmer, W., and Chow, R.H. (1998). The last few milliseconds in the life of a secretory granule. Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM). *Eur. Biophys. J.* 27, 83-98.

Oyler, G.A., Higgins, G.A., Hart, R.A., Battenberg, E., Billingsley, M., Bloom, F.E., and 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.

Qian, H., Sheetz, M.P., and Elson, E.L. (1991). Single particle tracking. Analysis of diffusion and flow in two-dimensional systems. *Biophys. J.* 60, 910-921.

Rettig, J. and Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298, 781-785.

Rickman, C., Meunier, F.A., Binz, T., and Davletov, B. (2004). High affinity interaction of syntaxin and SNAP-25 on the plasma membrane is abolished by botulinum toxin E. *J. Biol. Chem.* 279, 644-651.

Sollner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and 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, 409-418.

Sorensen, J.B., Matti, U., Wei, S.H., Nehring, R.B., Voets, T., Ashery, U., Binz, T., Neher, E., and Rettig, J. (2002). The SNARE protein SNAP-25 is linked to fast calcium triggering of exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 1627-1632.

Steyer, J.A., Horstmann, H., and Almers, W. (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* 388, 474-478.

Sudhof, T.C. (2000). The synaptic vesicle cycle revisited. *Neuron* 28, 317-320.

Toonen, R.F., Kochubey, O., de, W.H., Gulyas-Kovacs, A., Konijnenburg, B., Sorensen, J.B., Klingauf, J., and Verhage, M. (2006). Dissecting docking and tethering of secretory vesicles at the target membrane. *EMBO J.* 25, 3725-3737.

Trimble, W.S. (1993). Analysis of the structure and expression of the VAMP family of synaptic vesicle proteins. *J. Physiol Paris* 87, 107-115.

Tsuboi, T., Kikuta, T., Warashina, A., and Terakawa, S. (2001). Protein kinase C-dependent supply of secretory granules to the plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282, 621-628.

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H., and Rothman, J.E. (1998). SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92, 759-772.

Wei, S., Xu, T., Ashery, U., Kollwe, A., Matti, U., Antonin, W., Rettig, J., and Neher, E. (2000). Exocytotic mechanism studied by truncated and zero layer mutants of the C-terminus of SNAP-25. *EMBO J.* 19, 1279-1289.

Xu, T., Binz, T., Niemann, H., and Neher, E. (1998). Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nat. Neurosci.* 1, 192-200.

Xu, T., Rammner, B., Margittai, M., Artalejo, A.R., Neher, E., and Jahn, R. (1999). Inhibition of SNARE complex assembly differentially affects kinetic components of exocytosis. *Cell* 99, 713-722.

FIGURE LEGENTS

Fig. 1. GFP-SNAP-25 constructs form membrane clusters as visualized by TIRFM in cultured bovine chromaffin cells.

Cultured chromaffin cells were infected with the expression vectors for GFP-SNAP-25 and GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ and after 2 days, fluorescence was studied using TIRFM. Panels A and B show representative images of the round clusters formed by the wild type and truncated $\Delta 9$ GFP-SNAP-25, respectively. Microdomains formed by both constructs were

similar in area as demonstrated in the distribution size analysis of panel C. The mean average size correspond to 0.26 ± 0.02 and $0.25 \pm 0.02 \pm 0.02 \mu\text{m}^2$ for GFP-SNAP-25 and the $\Delta 9$ constructs, respectively. Bars represent $5 \mu\text{m}$.

Fig. 2. GFP-SNAP-25 clusters colocalize with syntaxin-1 and synaptobrevin 2.

Chromaffin cells expressing GFP-SNAP-25 were fixed and permeabilized as indicate in the Methods. The cells were then incubated with a chicken anti-syntaxin 1 antibody which was visualized with a rhodamine coupled secondary antibody. A TIRFM image of the GFP-SNAP-25 microdomains is shown (A), as well as syntaxin-1 immunolocalization (B) and a superposition of the images from both channels showing the colocalized pixels in yellow (C). The colocalization mask displays the pixels with more than 50 % of the intensity in both channels (D). In other experiments cells were co-infected with amplicons containing GFP-synaptobrevin (E) and DsRed-SNAP-25 (F) vectors and the cellular fluorescence was visualized by TIRFM. Colocalization was seen in the merged images (G) and in the corresponding colocalization mask (H). Bars represent $2 \mu\text{m}$.

Fig. 3. SNARE microdomain movement is enhanced in cells expressing the truncated GFP-SNAP-25 $\Delta 9$.

The dynamics of the microdomains formed by GFP-SNAP-25 constructs were studied in time-lapse images taken at 1 s intervals. Panels A and B show images separated by 7 seconds intervals of several clusters in cells expressing GFP-SNAP-25 (A) and GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ (B). The microdomains marked with the cross display lateral mobility in the XY plane which was studied by measuring the centroid coordinates (C), the pathways corresponding to the movements over 30 s showed the restricted movement characteristic of the cells expressing the wild type isoform, as well as the enhancement of XY mobility

for the clusters containing the truncated form (C). The variations in the intensity of fluorescence indicate the different mobility in the Z plane for the same patches (panel D).

Fig. 4. Lateral cluster movement is altered in cells expressing the truncated GFP-SNAP-25 $\Delta 9$.

The displacement of the centroids corresponding to 80 microdomains from at least 10 cells was studied in cells expressing wild type and $\Delta 9$ GFP-SNAP-25 over 20 s periods. The calculated speeds were binned at 2 nm/s intervals and plotted as a distribution (panel A). The average speed was 22 ± 1 and 36 ± 2 nm/s for microdomains in cells expressing the wild type and $\Delta 9$ constructs, respectively. In a different analysis, the centroid coordinates were used to calculate the mean square displacement (MSD) at different time intervals (panel B). From the slope of the curves, the value of the apparent diffusion coefficient was derived (slope= $4 \cdot D$, 29), corresponding to the mobility of GFP-SNAP-25 ($4.6 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$, n=74), and GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ patches ($10.2 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$, n=99).

Fig. 5. SNARE cluster movement perpendicular to the plasma membrane increases in cells expressing GFP-SNAP-25 $\Delta 9$.

The motion of the GFP-SNAP-25 microdomains in the Z plane was investigated following the time course of fluorescence intensity. The intensity of the maximal fluorescence corrected for background intensity was obtained for individual clusters and transformed into Z distances using the exponential decay characteristic of the evanescent field. The distances obtained were plotted against experimental time. **A** Examples of z distance calculations for representative clusters formed by both wild type and $\Delta 9$ constructs are shown. **B**. The calculation of the fraction of time spent by GFP-SNAP-25

(4514 z distances from 74 patches, mean distance 128 ± 9 nm), and GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ patches (4392 z distances from 72 clusters, mean distance 198 ± 14 nm) at different distances from the evanescent field origin and binned at 20 nm intervals. C. Distribution of the range of distances (Δz) covered during in 60 s observation periods by the SNARE microdomains analyzed above. D. The mean Δz value obtained for GFP-SNAP-25 (107 ± 7 nm, n=74) and GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ (150 ± 9 nm, n=72) were statistically different ($p < 0.005$ using the student t-test).

Fig. 6. High intracellular calcium reduces SNARE cluster motion in cells expressing GFP-SNAP-25 $\Delta 9$.

Cluster motion was studied in cells expressing GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ before and after incubation of the cells with K/H containing 10 mM CaCl_2 and 5 μM ionomycin during 5 min. Depicted are frames separated by 10 s intervals showing the motion of different microdomains before (A) and after (B) the elevation of intracellular calcium. In A and B a cross was used to better appreciation of cluster movements. The displacement of the centroids corresponding to 79 microdomains from 30 cells was studied over 20 s periods before and after the treatment. The calculated speeds were binned at 2 nm/s intervals and plotted as a distribution (C). The average speed was 36 ± 1 (before) and 25 ± 1 nm/s (after) . Panel D depicts the mean square displacement (MSD) at different time intervals in both experimental conditions. From the slope of the curves, the value of the apparent diffusion coefficient was calculated to be $12.1 \pm 0.3 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (before), and $4.3 \pm 0.1 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$ (after high Ca^{2+} and ionomycin addition). Bars represent 1 μm .

Fig. 7. The movement of the vesicles colocalizing with SNARE patches correlates with the dynamics of the clusters.

Vesicle movement was studied in cells expressing GFP-SNAP-25 constructs using lysotracker red labeling as indicated in the Methods. TIRFM experiments commenced by visualizing the SNARE patches (A panel for wild type and E panel for the truncated $\Delta 9$ form) and vesicles (B and F) to assess the colocalization through image merging (C and G) and to calculate the 50 % intensity colocalization mask (D and H). Bars represent 2 μm . **I.** The distribution of speeds in vesicles colocalizing with GFP-SNAP-25 (mean speed of 23 ± 1 nm/s, n=73 vesicles) or GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ patches (mean of 30 ± 1 nm/s, n=57 vesicles). **J.** Mean square displacement vs time for the vesicles colocalizing with the wild type (coefficient of diffusion of $3.7 \pm 0.2 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$), or $\Delta 9$ form of SNAP-25 (coefficient of diffusion of $15.0 \pm 0.3 \times 10^{-5} \mu\text{m}^2/\text{s}$). **K.** Distribution of the Z distances corresponding to the vesicles colocalizing with GFP-SNAP-25 (mean distance of 122 ± 9 nm, n=73 vesicles) or the $\Delta 9$ patches (mean distance of 199 ± 13 nm, n=57 vesicles). **L.** Calculation of the mean range of z displacement (ΔZ) obtained for vesicles colocalizing with GFP-SNAP-25 (mean value of 84 ± 6 nm), and GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ microdomains (mean of 104 ± 8 nm/s).

Fig. 8. Low fusion probability of vesicles associated with high mobility SNAP-25 $\Delta 9$ clusters.

Cells expressing DsRed-SNAP-25 constructs were incubated with acridine orange as indicated in the methods and then stimulated with a high potassium solution (59 mM KCl) for 1 min. During stimulation, TIRFM images of the red channel showed SNARE clusters and vesicles (DsRed and the red component of acridine orange) and the green channel showed fusion events (green fluorescence of acridine orange when the vesicle interior is

neutralized during exocytosis), acquired simultaneously at 20 ms intervals using an image splitter with the appropriate filters. Panels A and B depict four images of both channels taken at 10 s intervals from cells expressing the wild type form of SNAP-25 (A) or the truncated form SNAP-25 $\Delta 9$ (B) in a representative experiment. Panels C and D, show the accumulative sum of the images from both experiments, depicting vesicles and SNAREs as red spots and fusion events as green flashes. These images demonstrate the higher probability of vesicle fusion in cells expressing the wild type form of SNAP-25 (C) when compared with the vesicles in cells where the truncated form is expressed (D). These accumulative images were used to estimate the probability of fusion during a 60 s depolarization (E). F. In cells expressing SNAP-25 $\Delta 9$, the probability of fusion was estimated for vesicles presenting low motion (less than 2 diameters motion in 20 s, immobile vesicles) and highly mobile vesicles (mobile vesicles). G. The maximum fluorescence in the green channel images taken at 20 ms intervals was used to obtain the secretory activity profiles of these cells expressing SNAP-25 isoforms. Bars represent 2 μm .

Fig. 9. Fusion events are slower in cells expressing highly mobile SNARE clusters.

Fusion kinetics was analyzed in the experiments described in the previous figure. Exocytosis was simultaneously detected as the disappearance of vesicles in the red channel (panel A for SNAP-25 wild type expressing cells and C for cells expressing the $\Delta 9$ form) or the generation of a green flash product of acridine orange neutralization during fusion (panels B and D, respectively). E. The plots of the maximal fluorescence of the green channels vs time depict the kinetics of the fusion events as spikes for the examples in the previous panels. The analysis of events in cells expressing full length SNAP-25 and cells expressing the truncated form gave average spikes representative of

the individual cells presented in panel F. Panel G shows the distribution of $t_{1/2}$ values corresponding to 370 events in 22 SNAP-25 expressing cells and 342 fusions in 29 cells expressing SNAP-25 $\Delta 9$. Average $t_{1/2}$ values of 178 ± 7 ms and 218 ± 9 were obtained for these cells, respectively.



Figure 1

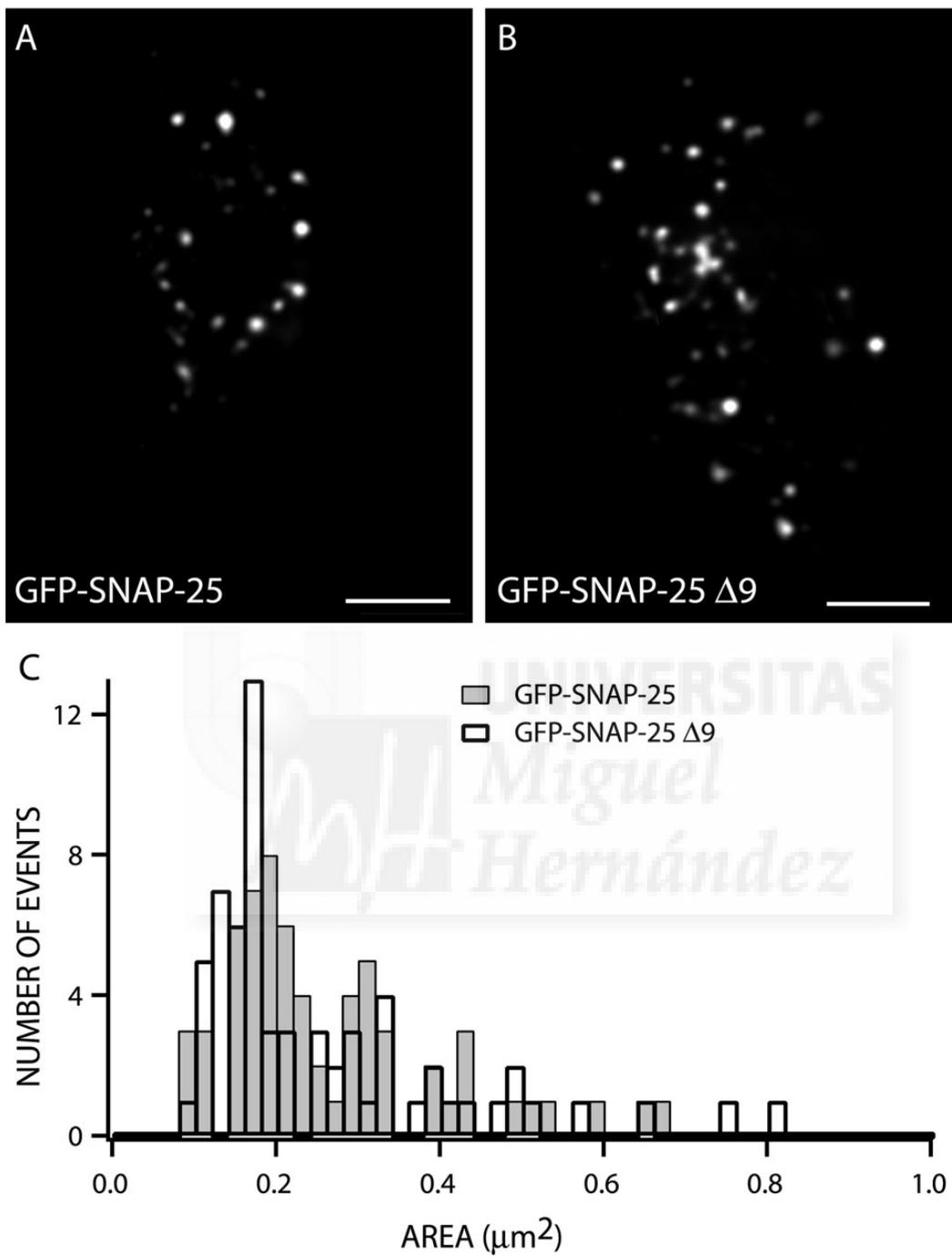


Figure 2

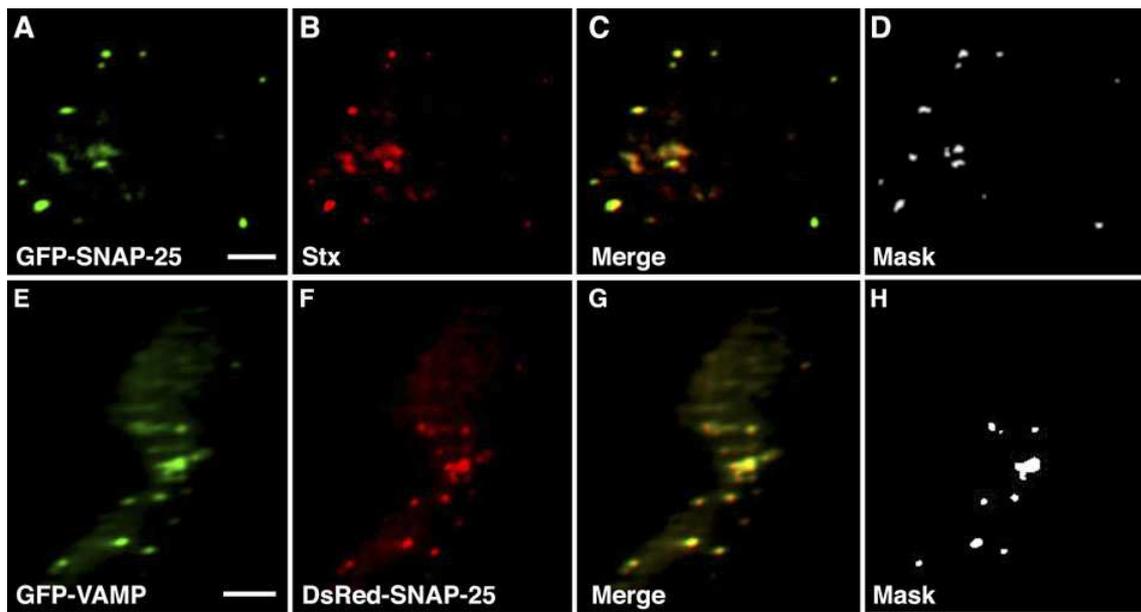


Figure 3.

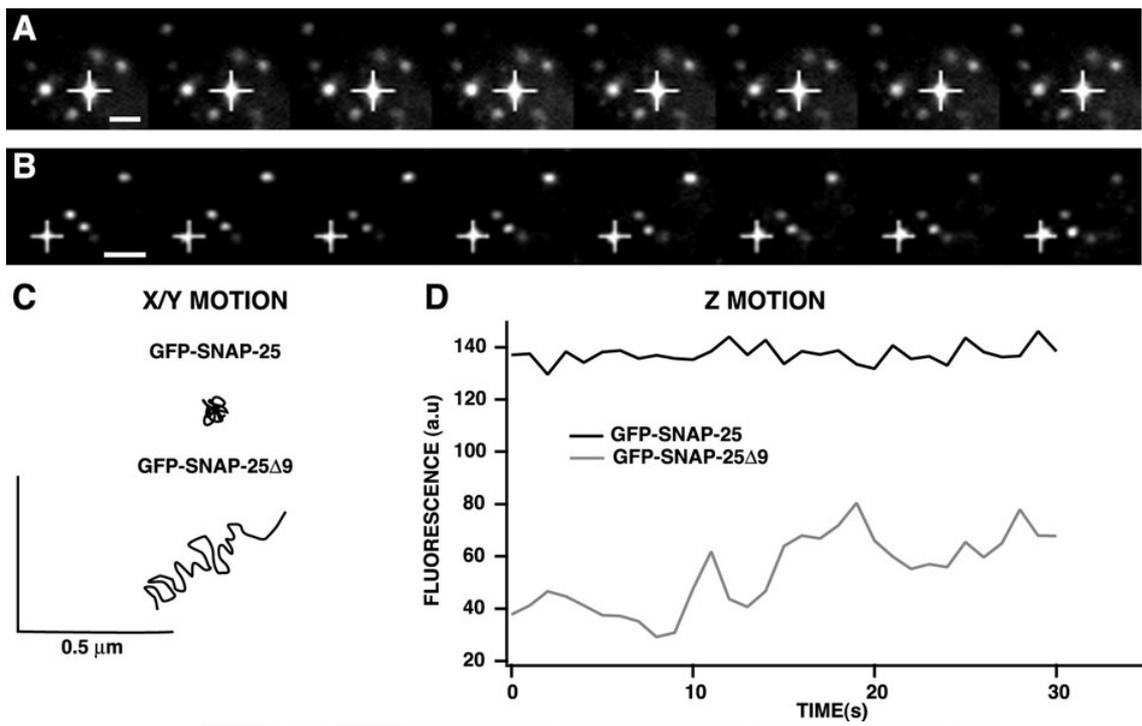


Figure 4.

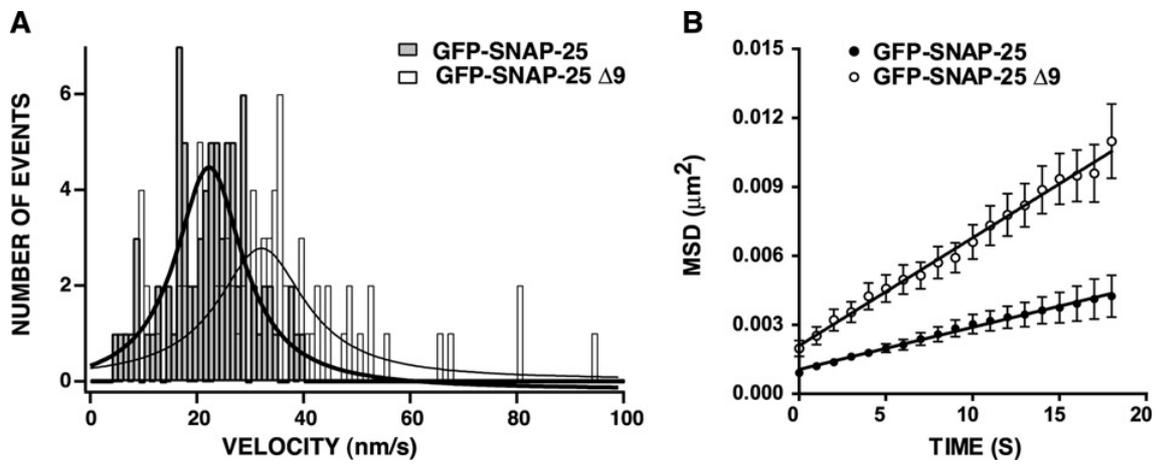


Figure 5.

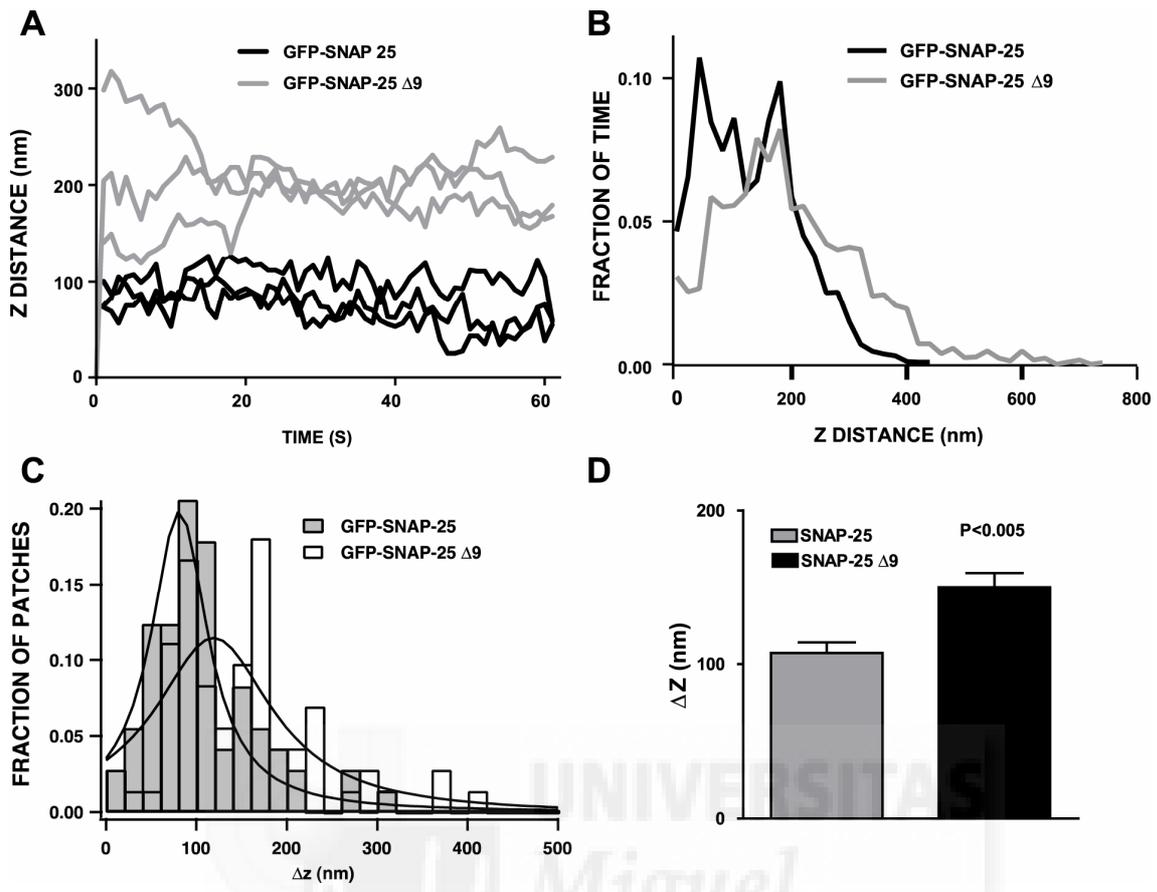
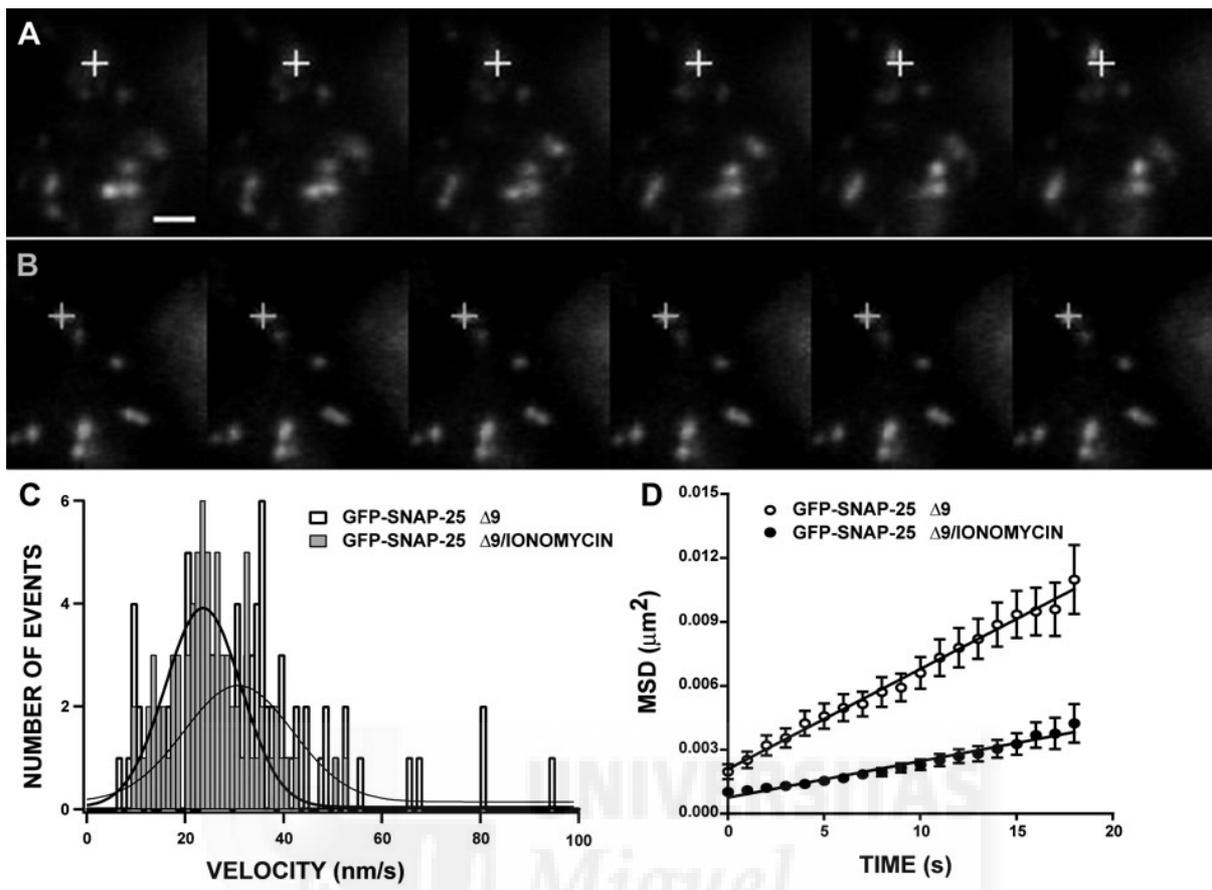


Figure 6.



Miguel
Hernández

Figure 7.

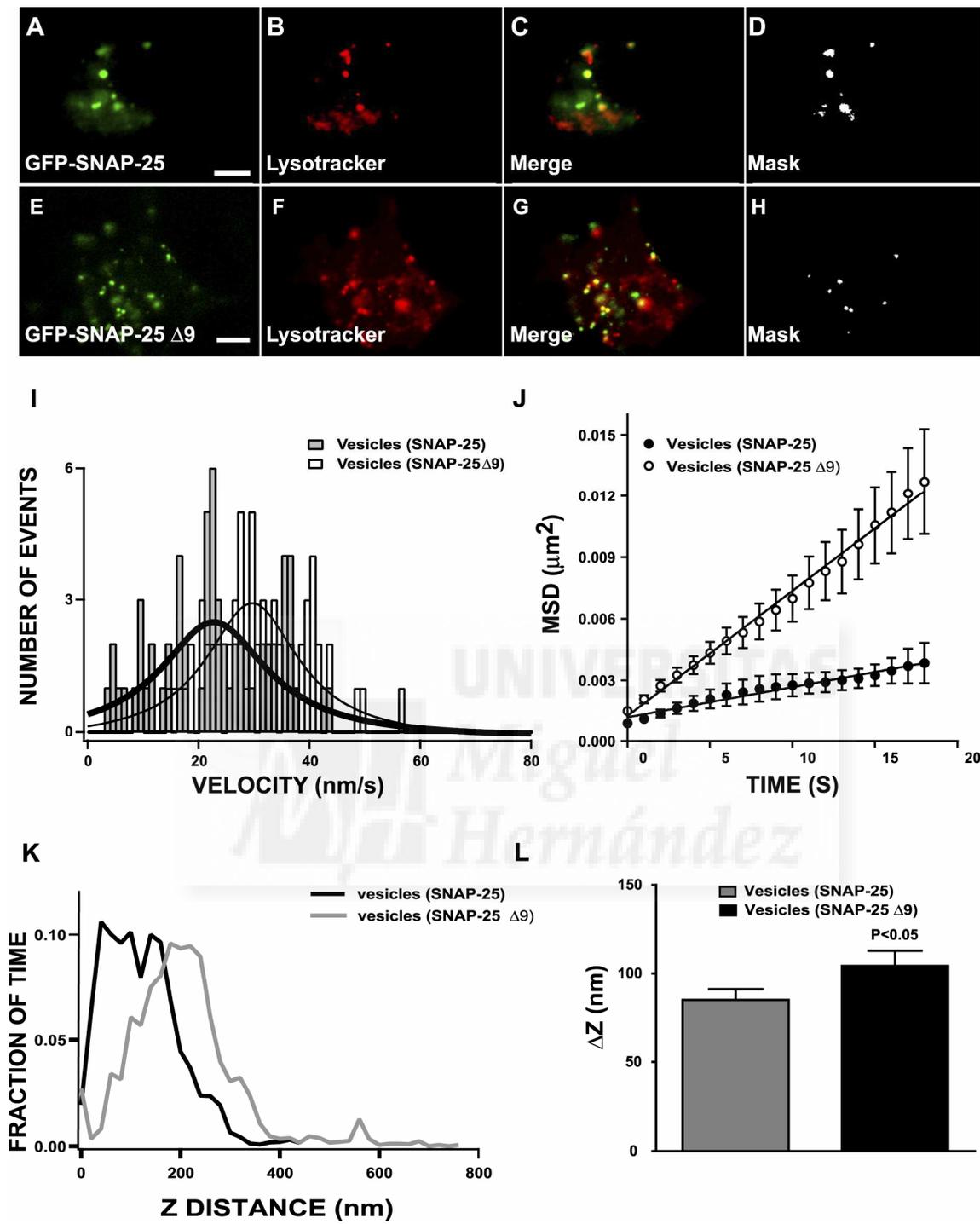


Figure 8.

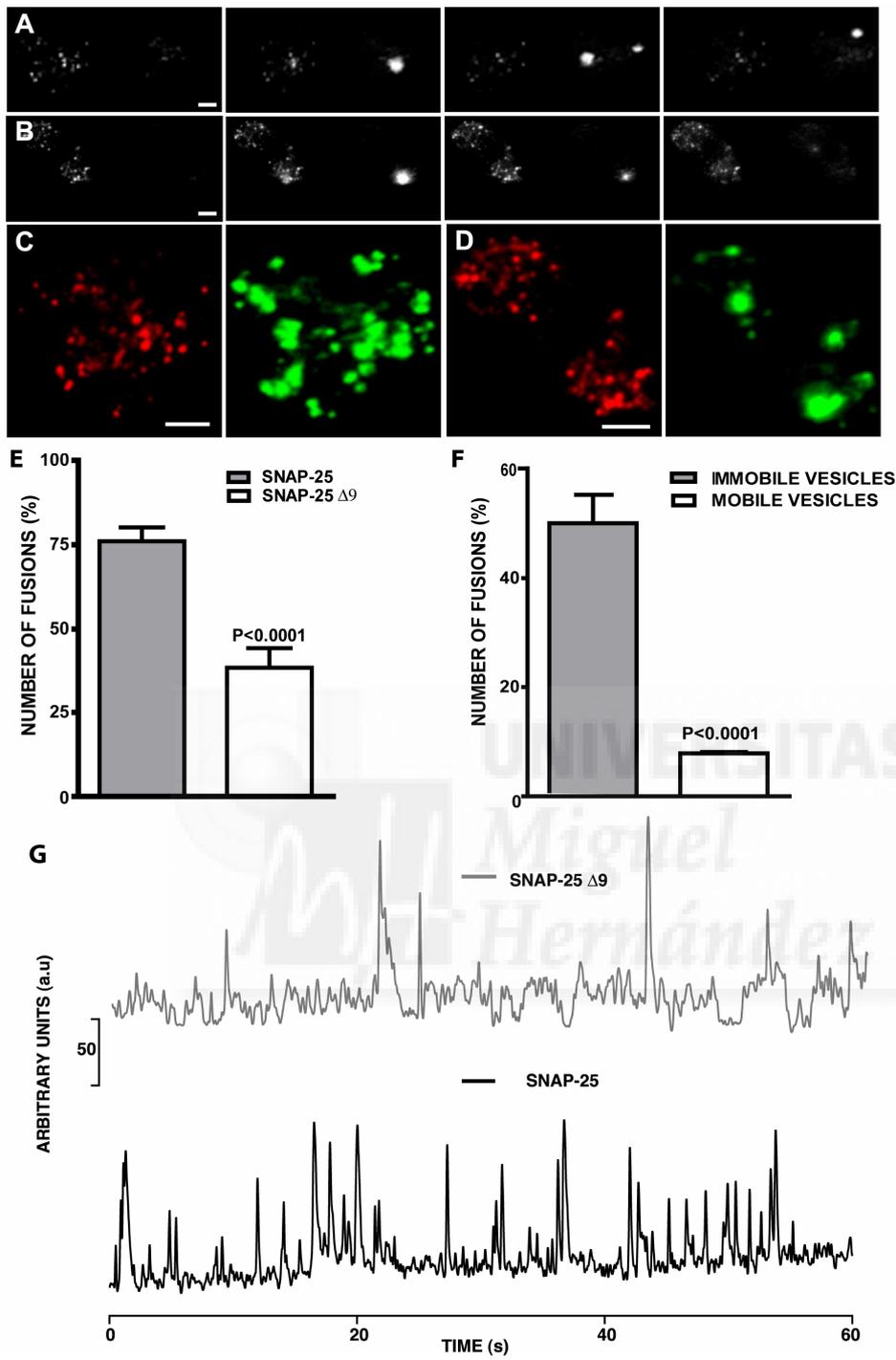
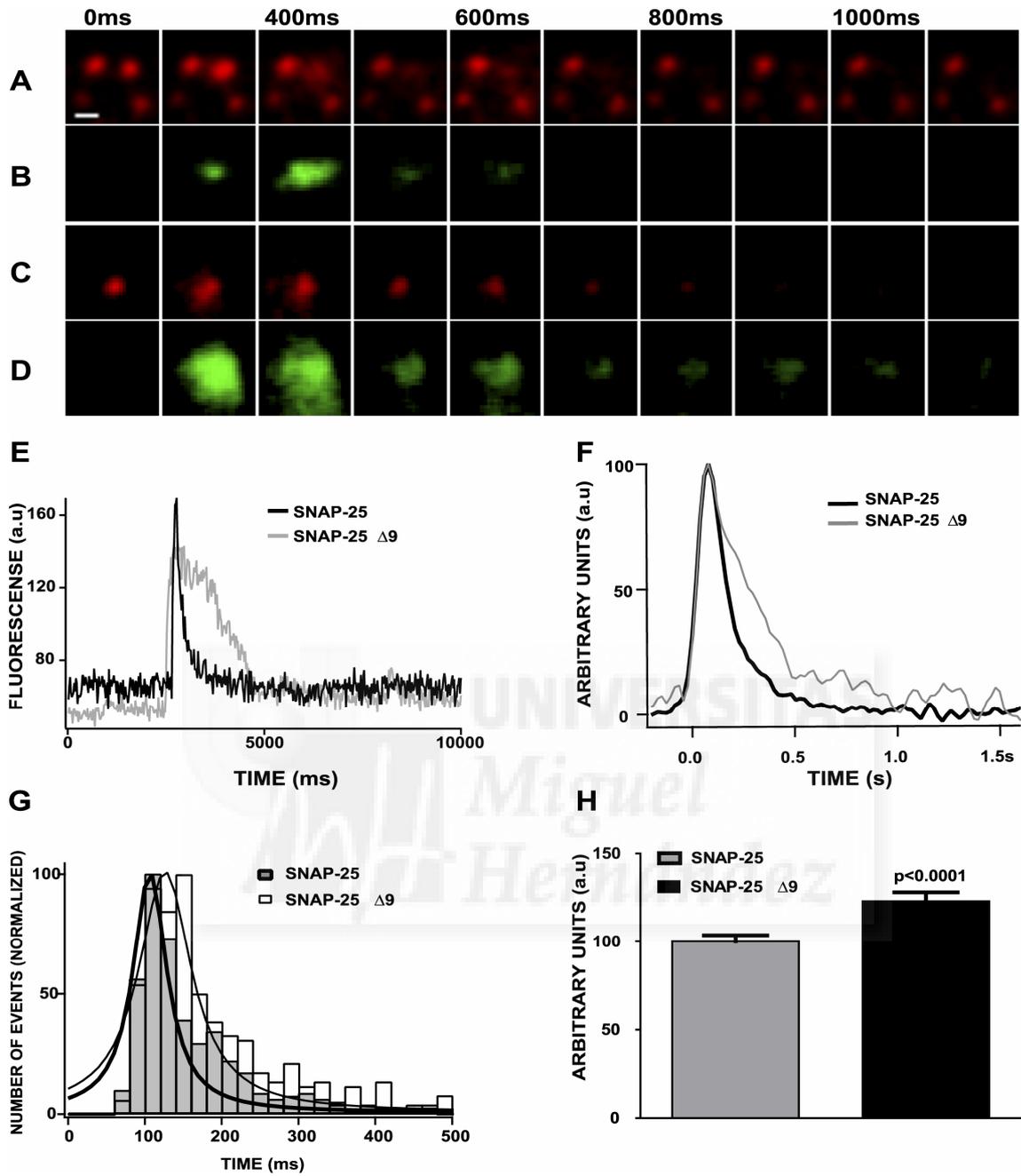
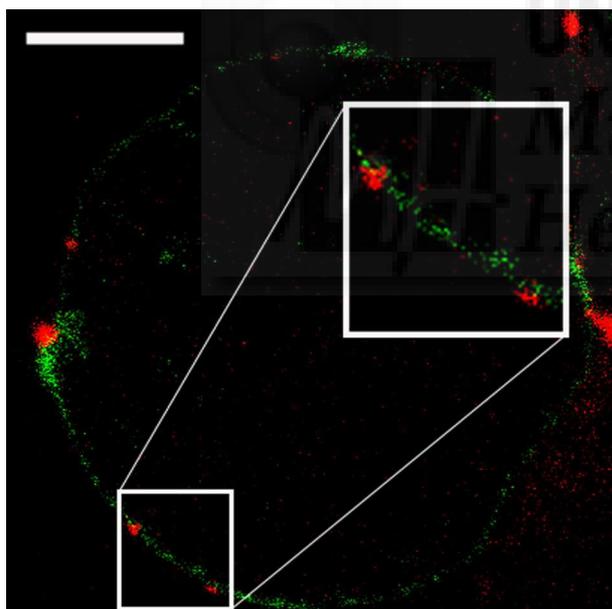


Figure 9.



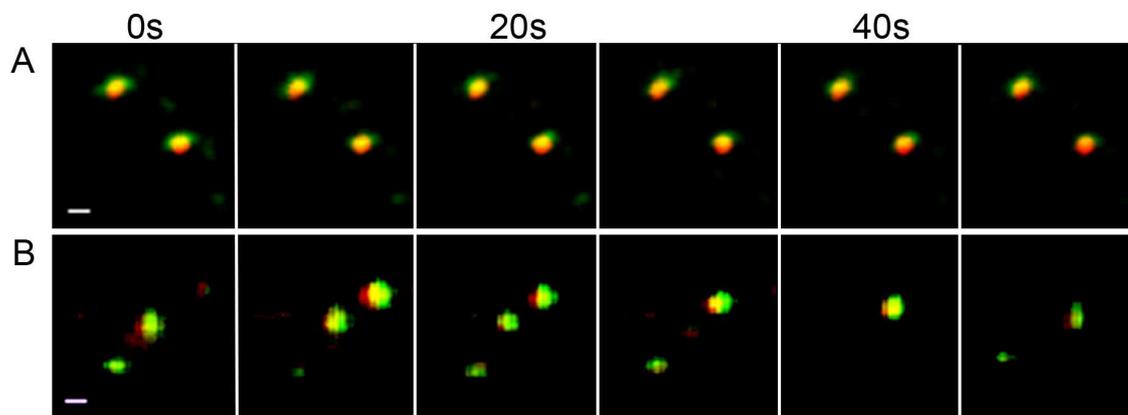
SUPPLEMENTARY MATERIAL.

Supplementary Figure 1. GFP-SNAP-25 clusters are present in the plasma membrane of chromaffin cells. Cells infected with amplicons containing GFP-SNAP-25 sequence were stimulated by a KCl 59 mM K/H buffer and subjected to the labeling of exocytotic sites using anti-dopamine β -hydroxylase antibodies. Depicted is the green labeling of the expressed GFP-SNAP-25 protein and in red the spotted appearance of the exocytosed granule membrane stained with the antibodies coupled to rhodamine. The close location of both labelings in the periphery of the visualized cell is best observed in the insert. Bar represents 5 μ m.



Supplementary Figure 2. Colocalization of Ds-red SNAP-25 clusters with lysotracker green labeled vesicles. Cells infected with amplicons containing the DsRed-SNAP-25 (A) and DsRed-SNAP-25 Δ 9 sequence (B) were stained with lysotracker green and visualized using TIRFM. The sequences of images separated by 10 s intervals show the dynamic colocalization of green labeled granules with the

relatively immobile SNARE clusters formed by wild type SNAP-25 (A) and the highly mobile microdomains formed by the truncated $\Delta 9$ form (B). Bars represent 1 μm .



Supplementary video 1. 3D reconstruction of SNARE microdomains in a bovine chromaffin cell visualized by fluorescence confocal microscopy. Images were taken using a 100x objective and corresponded to the expression of GFP-SNAP-25 and the rodamine immunolabeling of syntaxin-1.

Supplementary video 2. Video of GFP-SNAP-25 microdomain dynamics visualized by TIRFM. Images were taken at 1 s intervals and corresponded to a 1 min sequence (6x times accelerated). For better appreciation of the dynamism use the repeat option of your video viewer in this and the following videos.

Supplementary video 3. Video of GFP-SNAP-25 $\Delta 9$ cluster dynamics as visualized by TIRFM. Images were taken at 1 s intervals and corresponded to a 1 min sequence (6x times accelerated).

Supplementary video 4. Exocytosis in a cell expressing DsRed-SNAP-25. Images were taken at 20 ms intervals during a 1 min cell depolarization with KCl (59 mM). The red channel (DsRed and red fluorescence from acridine orange, left side) and the green channel (right side) are visualized side by side where vesicle fusion is observed as flashes upon acridine orange neutralization during exocytosis. The video is accelerated 6x.

Supplementary video 5. Vesicle fusion in a cell expressing DsRed-SNAP-25 $\Delta 9$. Images were obtained as indicated in the previous video.

