

La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal (*)

ANTONIO RODRÍGUEZ ARTALEJO

Académico Correspondiente de la Real Academia Nacional de Farmacia

RESUMEN

La exocitosis es el mecanismo por el que las células liberan los mensajeros extracelulares (hormonas y neurotransmisores) que almacenan en compartimentos membranosos (vesículas y gránulos de secreción). Se trata de un proceso, habitualmente regulado por la concentración citosólica de Ca^{2+} , que conlleva la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática. En los últimos años, la utilización de técnicas bióficicas, genéticas y de biología molecular ha posibilitado un avance sustancial en el conocimiento de los mecanismos moleculares de la exocitosis. En el presente artículo se revisa el papel que algunas proteínas podrían jugar en la exocitosis regulada en las células cromafines de la médula adrenal, un modelo celular ampliamente utilizado en estudios sobre la neurosecreción.

Palabras clave: Exocitosis.—Célula cromafín.—SNARE.—Sinaptotagmina.—Neurosecretion.

ABSTRACT

Ca^{2+} -triggered exocytosis of neurotransmitter or hormones stored in membrane-bound organelles (secretory vesicles and granules) forms the basis of cell-to cell communication in multicellular animals. The exocytotic release of signalling molecules proceeds through the fusión of the secretory vesicle membrane with the plasma membrane. In recent years, the twinning of techniques from biophysics,

(*) Toma de Posesión como Académico Correspondiente, día 15 de abril de 2004.

genetics and molecular biology has led to a remarkable advancement in our understanding of molecular mechanisms of exocytosis. Here, I review recent studies on a simple cellular model widely used in neurosecretion research, the adrenal chromaffin cell, and discuss the specific roles in different steps of the exocytotic process that has been assigned to several synaptic proteins.

Key words: Exocytosis.—Chromaffin cell.—SNARE.—Synaptotagmin.—Neurosecretion.

EXTENSIVE ABSTRACT

Molecular determinants of exocytosis in adrenomedullary chromaffin cells

Cell to cell communication provides the basis of functional integration in multicellular organisms. This process makes use of extracellular messengers—neurotransmitters and hormones—that are released by the cells in response to a wide range of stimuli. A paradigmatic example of intercellular communication is that occurs at the synapses between two neurons. The preynaptic side of this structure is contributed by the nerve ending where the transmitter is stored in discrete amounts—known as quanta—inside membrane vesicles. Communication is mediated by the release of the transmitter into the synaptic cleft and the subsequent activation of specific receptors located on the plasma membrane of the postsynaptic cell. The mechanism by which transmitters are released is the exocytosis, which implies the fusion of the plasma membrane with the vesicle membrane and the establishment of a diffusional pathway between the vesicle interior and the extracellular space. Only a fraction of the vesicles that are in physical contact—docked—with the plasma membrane are competent—primed—for being exocytosed, a phenomenon that is triggered or accelerated by a rise in the intracellular free Ca^{2+} concentration. The purpose of this review is to describe the molecular machinery, mostly composed of proteins, involved in the last steps of the exocytotic process: vesicle docking, vesicle priming and fusion of the vesicle membrane with the plasma membrane. On each of these steps, a set of three proteins play a central role: Synaptobrevin, a vesicle-associated membrane protein—also known as VAMP—, and two plasma membrane proteins, syntaxin and SNAP25 (synaptosome-associated protein of 25 kDa). These three proteins form the so-called fusion complex, which binds to two soluble proteins, NSF (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) and α -SNAP (soluble NSF attachment protein). Since α -SNAP directly interacts with synaptobrevin, syntaxin and SNAP25, these proteins are commonly referred to as SNAP receptors or SNARES. NSF, α -SNAP and SNARES constitute a molecular apparatus that has been conserved through the evolutionary scale and is essential to any process of membrane fusion. NSF acts as an ATPase whose activity is stimulated by α -SNAP leading to fusion complex disassembly. Moreover, continuous formation and disruption of the fusion complex is an intrinsic feature to the SNARE functioning in membrane trafficking.

Chromaffin cells from the adrenal medulla are neural crest derivatives that synthesize and store catecholamines inside large dense-core granules, the chromaffin granules. Catecholamines are released into the blood stream by a typically exocytotic mechanism, with a well-characterised intracellular Ca^{2+} dependence. Similarly to other neuroendocrine cells, adrenomedullary chromaffin cells express most of the proteins that have been involved in synaptic exocytosis. Chromaffin cells are a simple cellular model widely used in neurosecretion research due to the ease of culture from normal and also from genetically modified animals, and their amenability to the employment of biophysical techniques for the study of exocytosis with millisecond resolution. These techniques include the patch-clamp, which allows the measurement of cell capacitance changes as an assay of exocytosis, and flash photolysis of caged- Ca^{2+} compounds (DM-nitrophen, nitrophenil-EGTA), which is able to instantaneously increase (< 1 ms) cytosolic Ca^{2+} in the cell in a spatially homogeneous manner. The chromaffin cell exocytotic response to photorelease of Ca^{2+} ($\sim 20 \mu\text{M}$) comprises two kinetically different components: a phasic component, occurring during the first second after intracellular Ca^{2+} elevation, and a tonic or sustained component that follows the phasic one over tens of seconds. Phasic release would result from the exocytosis of mature vesicles whereas the sustained component would reflect the maturation process (priming) and the subsequent exocytosis of vesicles as long as Ca^{2+} remains elevated. By using specific reagents (clostridial toxins, antibodies, peptides, etc.) against the proteins of the secretory machinery it is possible to interfere selectively with each of these two components, thereby relating vesicle pools in distinct functional states with certain synaptic proteins. Recent evidence involving SNAREs, Munc18-1 and synaptotagmin I in specific steps of the exocytotic process from chromaffin cells is summarised at the end of this review.

INTRODUCCIÓN

La comunicación intercelular es la base de la integración funcional en los organismos superiores. Este proceso emplea mensajeros extracelulares —hormonas y neurotransmisores— que son liberados por las células en respuesta a múltiples estímulos. Un ejemplo paradigmático de comunicación intercelular es el que acontece en el tejido nervioso. La comunicación entre sus células parenquimatosas, las neuronas, tiene lugar en regiones especializadas denominadas sinapsis, en las que la terminación nerviosa de una neurona entra en contacto con la membrana de otra. En las terminaciones nerviosas el neurotransmisor se almacena en cantidades discretas, denominadas cuantos, en el interior de vesículas membranosas desde las que accede a la hendidura sináptica mediante el mecanismo de la exoci-

tosís (1). La exocitosis implica la fusión de la membrana de la vesícula con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el espacio intersticial. El transmisor así liberado se combinará con receptores de la membrana de la neurona postsináptica, generando corrientes iónicas, excitadoras o inhibitorias, que se pueden registrar electrofisiológicamente y cuya amplitud es función lineal del número de cuantos de transmisor liberado, dependiente, a su vez, del número de vesículas que se fusionan con la membrana de la terminación nerviosa (2, 3).

La exocitosis constituye un caso particular de lo que se conoce como tráfico de membranas de las células eucarióticas que conlleva la formación y utilización de pequeñas vesículas de membrana (4, 5). Existe amplia evidencia bioquímica y morfológica de que con la exocitosis no finaliza el ciclo vital de las vesículas sinápticas sino que éstas son recicladas intracelularmente una vez que su membrana es internalizada mediante un proceso denominado endocitosis (6). Dentro de la célula, la vesícula endocítica se fusiona con un endosoma temprano desde el que, en cuestión de segundos, se forman nuevas vesículas que se cargan con el neurotransmisor y son subsiguientemente translocadas a la membrana celular (7). Algunas de estas vesículas entran en contacto físico (atraque, anclaje o «docking») con la membrana plasmática, si bien sólo una fracción de ellas experimenta un proceso de maduración («maturation» o «priming») que las faculta para ser liberadas mediante exocitosis. En el caso de la exocitosis regulada de las células excitables, la elevación de la concentración de Ca^{2+} , habitualmente como consecuencia de la entrada del mismo a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, es la señal que pone en marcha el proceso de fusión de membranas (Figura 1) (8). El objetivo de este artículo es el de describir funcionalmente la maquinaria molecular, fundamentalmente de naturaleza proteica, responsable de las tres últimas etapas del proceso secretor de neurotransmisores: el atraque de las vesículas a la membrana, la maduración vesicular para adquirir competencia secretora y la fusión de membranas o exocitosis propiamente dicha.

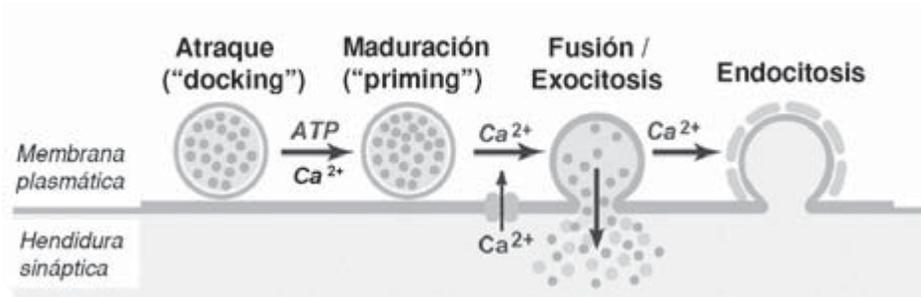


FIGURA 1. Etapas del ciclo de las vesículas sinápticas inmediatamente anteriores y posteriores a la exocitosis. El ciclo vital de las vesículas sinápticas no finaliza con la exocitosis (fusión de la membrana vesicular con la membrana plasmática; etapa 3) sino que las vesículas son recicladas intracelularmente, una vez que la membrana vesicular es internalizada mediante un proceso denominado endocitosis (etapa 4). Dentro de la célula, la vesícula endocítica se fusiona con un endosoma temprano desde el que se formarán nuevas vesículas que se cargan con el neurotransmisor y son subsiguientemente translocadas a la membrana celular. Algunas de estas vesículas entran en contacto físico («docking», etapa 1) con la membrana plasmática, si bien sólo una fracción de ellas experimenta un proceso de maduración («priming», etapa 2) que las faculta para ser liberadas mediante exocitosis. En el caso de la exocitosis regulada de las células excitables, la elevación de la concentración de Ca^{2+} , como consecuencia de la entrada del mismo a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, es la señal que pone en marcha el proceso de fusión de membranas. El proceso de maduración vesicular y la endocitosis también son regulados por los niveles intracelulares de Ca^{2+} .

LAS PROTEÍNAS DEL COMPLEJO DE FUSIÓN

La membrana vesicular alberga más de diez familias de proteínas diferentes (Tabla 1) (9). Queda fuera de los objetivos de esta revisión siquiera la mera reseña de todas ellas. Baste indicar que algunas, como la SV2, resulta esencial para el transporte de Ca^{2+} al interior de las vesículas (10); otras, como las sinapsinas, median la interacción de las vesículas con el citoesqueleto (11), lo que pudiera estar relacionado con los fenómenos de reclutamiento y translocación vesicular durante la estimulación prolongada, mientras que otras participarían en los procesos de maduración vesicular y de fusión de membranas. Entre estas últimas, deseo mencionar a la sinaptobrevina —también llamada VAMP, acrónimo de «vesicle-associated

membrane protein»—, una proteína integral de la membrana vesicular que forma parte del complejo de fusión (12), y a la sinaptotagmina, que desde hace algunos años es considerada el receptor de Ca^{2+} en la exocitosis regulada (13, 14, 15).

TABLA 1. *Proteínas de la membrana de las vesículas sinápticas y de los gránulos de secreción (28)*

| <i>Proteínas comunes</i> | <i>Proteínas específicas de los gránulos</i> | <i>Proteínas específicas de las vesículas sinápticas</i> |
|---|--|--|
| Sinaptofisinas | Amidasa de péptidos | Sinapsinas |
| Synapogirinas | Citocromo b561 | |
| Rab3A,B y C | Peptidasas (PC1, PC2, CPE, etc.) | |
| Sinaptotagmina 1y 2 | IA-2/fogrina | |
| SV2 | | |
| SVOP | | |
| SCAMPS | | |
| Sinaptobrevinas | | |
| CSP («Cysteine string protein») | | |
| Bomba de protones | | |
| Transportador de cloro | | |
| Transportador de zinc (algunas vesículas) | | |

El denominado complejo de fusión está formado por la sinaptobrevina y dos proteínas localizadas preferentemente en la membrana plasmática, la syntaxina y SNAP-25 («synaptosome-associated protein of 25 kDa») (16). Estas proteínas se asocian *in vitro* para formar un complejo ternario 7S, en relación a la velocidad con la que sedimenta al ser centrifugado. Al complejo 7S se unen dos proteínas solubles, el NSF («N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein») y α -SNAP («soluble NSF attachment protein»), originando el llamado complejo 20S (17) (Figura 2A). Dado que α -SNAP debe unirse al complejo 7S antes de que NSF pueda hacerlo, las proteínas de dicho complejo son conocidas como «SNAP receptors» o SNAREs. Además, y a tenor de su localización preferente en las distintas membranas destinadas a fusionarse, se denominan v-SNAREs («vesicle

SNAREs») a las proteínas del complejo que, como la sinaptobrevina, se sitúan en la membrana de las vesículas, mientras que aquellas que pertenecen a la membrana plasmática reciben el nombre de t-SNAREs («target SNAREs»). El NSF, las SNAPs y las SNAREs forman parte de una maquinaria molecular que se ha preservado a lo largo de la escala evolutiva y que resulta esencial para los procesos de fusión de membranas (18). El NSF es una ATPasa cuya actividad hidrolítica es estimulada por α -SNAP y resulta necesaria para el desensamblaje del complejo de fusión. Por otra parte, la continua formación y ruptura del mismo constituye una propiedad inherente al funcionamiento de las SNAREs en el tráfico de membranas (19).

Estudios de microscopía electrónica combinada con inmunofluorescencia han revelado la topología del complejo ternario 7S (20). Las tres SNAREs se asocian entre sí siguiendo una orientación en paralelo con los dominios carboxilo-terminales de anclaje a la membrana disponiéndose contiguamente en el mismo extremo del complejo. Es importante señalar que esta orientación permitiría la formación de complejos entre proteínas situadas en la misma membrana (configuración cis) sobre los que actuaría el NSF para generar monómeros de SNAREs. Las SNAREs así liberadas reconstituirían nuevos complejos también entre membranas destinadas a fusionarse entre sí (ensamblaje productivo o en configuración trans). La energía liberada en la formación del complejo serviría para aproximar las dos membranas venciendo la barrera de energía generada por las cargas negativas de los fosfolípidos. Asimismo, la estructura cristalina del complejo ternario ha podido ser establecida mediante difracción de rayos X (21). El complejo de fusión adopta la forma de un cilindro de 120 Å (1 nm = 10 Å) de longitud y diámetro transversal variable (Figura 2B). La porción central del mismo abarca cuatro segmentos homólogos de las tres proteínas, de aproximadamente 60 aminoácidos y plegamiento alfa helicoidal, que son conocidos como regiones SNARE. La syntaxina y la sinaptobrevina poseerían un solo segmento SNARE, localizado en la región adyacente al dominio transmembrana carboxilo-terminal, mientras que SNAP-25 contendría dos, separados por una región conectora que incluye una serie de residuos de cisteína palmitoilados mediante los que se asocia a la membrana. El ensamblaje comenzaría por la formación de

un complejo binario entre la sintaxina y SNAP-25 y continuaría mediante la asociación a ellas de la sinaptobrevina. La interacción se establecería inicialmente entre los dominios amino-terminales, que son los más distantes a la membrana, e iría avanzando mediante el entrecruzamiento (trenzado) de las regiones SNARE en dirección a las zonas de inserción en la membrana de la sinaptobrevina y la sintaxina.

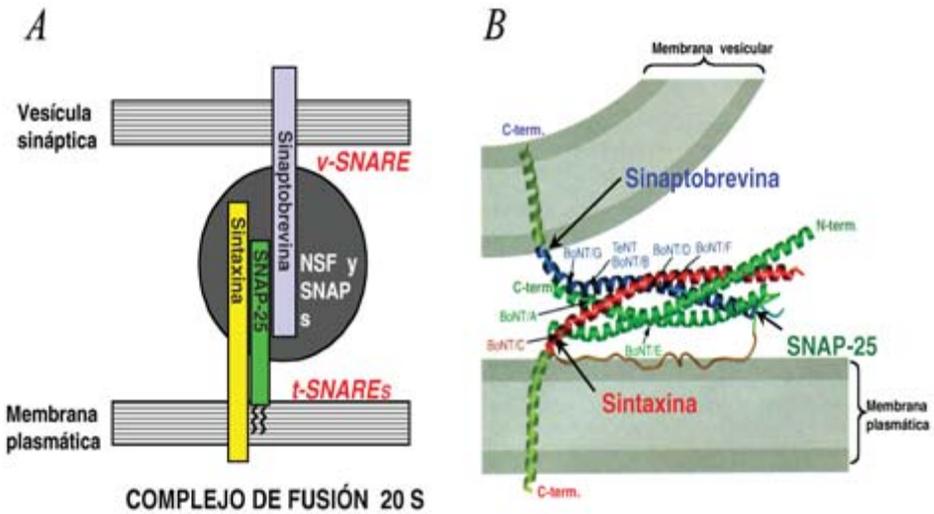


FIGURA 2. El complejo proteico de fusión de membranas. A) Representación esquemática del complejo de fusión. El complejo está formado por la proteína vesicular sinaptobrevina y dos proteínas localizadas preferentemente en la membrana plasmática, la sintaxina y SNAP-25 («synaptosome associated protein of 25 kDa»). Estas proteínas se asocian in vitro formando un complejo ternario 7S al que se unen dos proteínas solubles, el NSF («N-ethylmaleimide sensitive fusion protein») y α -SNAP («soluble NSF attachment protein»), originando el llamado complejo 20S. B) Estructura tridimensional del complejo de fusión obtenida mediante análisis de difracción de rayos X (21). El complejo adopta la forma de un cilindro de 120 Å (1 nm = 10 Å) de longitud y diámetro transversal variable. La porción central del mismo abarca cuatro segmentos homólogos de las tres proteínas, de aproximadamente 60 aminoácidos y plegamiento alfa helicoidal, que son conocidos como regiones SNAREs. La sintaxina y la sinaptobrevina poseen un solo segmento SNARE, localizado en la región adyacente al dominio transmembrana carboxilo-terminal, mientras que SNAP-25 contiene dos, separados por una región conectora que incluye una serie de residuos de cisteína palmitoilados mediante los que se asocia a la membrana. Se muestran también los lugares de actuación de las toxinas clostridiales: tetánica (TeNT) y botulínicas (BoNT) A, B, C, D, E, F y G.

LA CÉLULA CROMAFÍN DE LA MÉDULA ADRENAL COMO MODELO EXPERIMENTAL EN ESTUDIOS SOBRE LA NEUROSECRECIÓN

La médula adrenal constituye la porción central de la glándula adrenal de los mamíferos, siendo una estructura neuroendocrina que funcionalmente se integra dentro del sistema nervioso autónomo y que puede considerarse como un ganglio simpático modificado. El parénquima de la médula adrenal lo forman las células cromafines que almacenan catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) en el interior de gránulos citoplásmicos denominados cromafines por su afinidad por las sales de cromo, que les confieren una coloración amarillo parduzca al microscopio óptico. Las catecolaminas son liberadas al torrente circulatorio en situaciones de estrés por un mecanismo típicamente excitósico (22, 23). A este respecto, cabe señalar que en las células cromafines —al igual que en otras células neuroendocrinas— se ha descrito la presencia de la gran mayoría de las proteínas que han sido identificadas en las terminaciones sinápticas (Tabla 1) (24, 25, 26, 27, 28). El acoplamiento excitación-secreción se inicia cuando las moléculas de acetilcolina procedentes de las terminaciones de las fibras preganglionares del nervio esplácnico se combinan con receptores nicotínicos o muscarínicos de la membrana celular. La activación de los primeros da lugar a una despolarización de la membrana celular que se sigue de la descarga de potenciales de acción debidos tanto a la apertura de canales de Na^+ como de Ca^{2+} dependientes de voltaje, con la consiguiente elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} que es la señal que desencadena la exocitosis (29).

La preparación de médula adrenal habitualmente empleada en los estudios de neurosecreción son las células cromafines aisladas. Las células cromafines son fácilmente obtenibles por digestión enzimática, adoptando una morfología esférica en cultivo, lo que facilita enormemente la aplicación de técnicas biofísicas capaces de medir la exocitosis en la escala de tiempo de los milisegundos, que es en la que este fenómeno se produce en los seres vivos. Entre estas técnicas destaca la electrofisiológica del «patch-clamp», que en su configuración de célula completa permite fijar el potencial de membrana y, eventualmente, registrar las corrientes eléctricas generadas por el flujo de iones a través de los canales de la práctica totalidad de la membrana celular (30). Esta configuración posibilita también el con-

trol de la composición del citoplasma celular y la adición al mismo, vía diálisis desde la pipeta de registro, de sondas fluorescentes como el fura-2, el fura-4, el furaptra y otras varias que permitirán la monitorización de la concentración citosólica de Ca^{2+} (31). La técnica del «patch-clamp» permite también el estudio de la exocitosis de forma directa mediante la medida de los cambios de la capacitancia celular (32). Como ya ha sido mencionado, la exocitosis consiste en la fusión de la membrana vesicular con la plasmática, lo que conlleva, aunque sólo sea de manera transitoria, el incremento de la superficie de esta última. Las membranas biológicas están constituidas por una bicapa lipídica cuyas caras están en contacto con soluciones salinas. Ello determina que se comporten eléctricamente como condensadores en los que la capacitancia o capacidad es directamente proporcional al área de la superficie conductora. Por consiguiente, la exocitosis se traducirá en un incremento de la capacitancia de la célula, cuyos cambios pueden medirse con exquisita sensibilidad —puede detectarse la fusión de dos o tres gránulos cromafines— y resolución temporal —del orden de 1 ms— empleando esta técnica. Esta técnica, capaz de medir la respuesta secretora con tan elevada precisión, debe ser complementada con procedimientos que consigan elevar rápidamente la concentración de Ca^{2+} intracelular. Este objetivo se logra mediante la fotoliberación de Ca^{2+} desde compuestos como el DM-nitrofenil y el nitrofenil-EGTA (33). A diferencia de la señal de Ca^{2+} citosólica generada por la despolarización de la membrana celular, la fotoliberación de Ca^{2+} origina un incremento instantáneo (<1 ms) y espacialmente homogéneo de la concentración de calcio intracelular, posibilitando además la monitorización continua de la respuesta exocitótica a través de los cambios de la capacitancia celular (Figura 3A) (34). En la respuesta secretora de las células cromafines a la fotoliberación de Ca^{2+} es posible distinguir dos componentes cinéticos: el componente fásico, que tiene lugar durante el segundo siguiente al incremento de la concentración de Ca^{2+} , y el tónico o sostenido que sucede al anterior (Figura 3B). De acuerdo con el modelo lineal del proceso secretor ya presentado, la respuesta fásica sería el resultado de la liberación de un contingente de vesículas maduras o dotadas de competencia secretora, mientras que el componente tónico reflejaría el proceso de maduración de las vesículas y la subsiguiente exocitosis de las mismas en tanto que permanezca elevada la concentración de Ca^{2+} intracelular. Los datos a los que haré

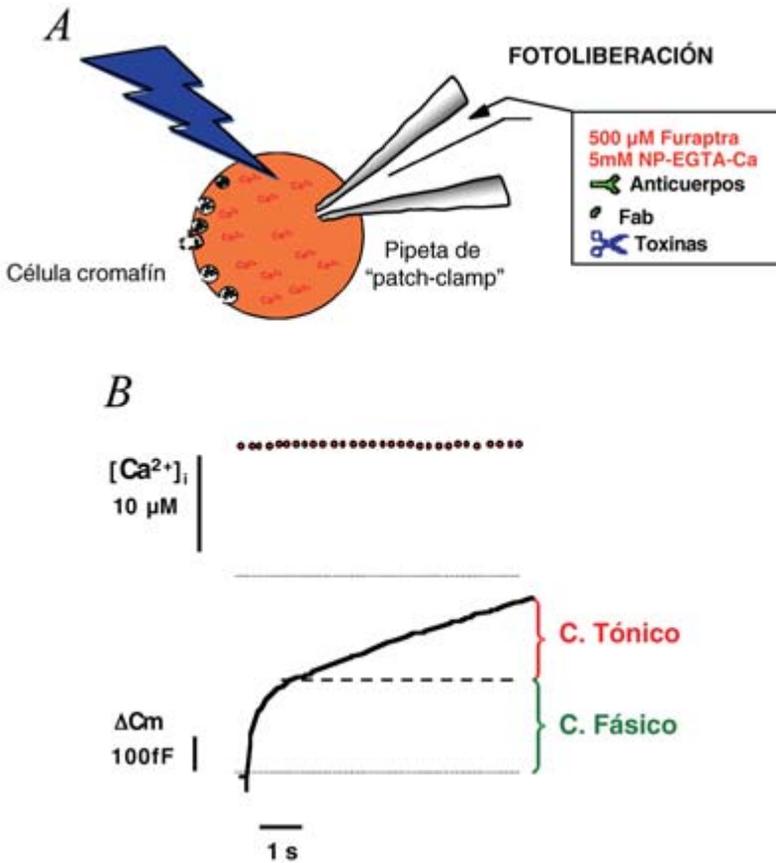


FIGURA 3. Esquema del abordaje experimental empleado para el estudio de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. A) Se muestra una célula cromafín en la configuración de célula entera de la técnica de «patch-clamp». En esta configuración, la pipeta de registro posibilita la introducción en el interior celular de indicadores fluorescentes de la concentración citosólica de Ca^{2+} (Fura-2, Fura2), quelantes de Ca^{2+} fotosensibles (NP-EGTA) y reactivos específicos (anticuerpos, toxinas clostridiales, péptidos, etc.) para las distintas proteínas sinápticas. La fotoliberación de Ca^{2+} da lugar a un aumento homogéneo en la concentración citosólica de dicho catión. B) Cambio en la capacitancia de la membrana de una célula cromafín (panel inferior) en respuesta a la fotoliberación de Ca^{2+} que eleva la concentración citosólica del mismo hasta 10-20 μM (panel superior). Es posible distinguir dos componentes cinéticos en la respuesta de capacitancia: el componente fásico, que tiene lugar durante el segundo siguiente al incremento de la concentración de Ca^{2+} , y el tónico o sostenido, que sucede al anterior. Véase el texto para hallar una explicación sobre el significado funcional de ambos componentes.

referencia a continuación ilustran los esfuerzos que se están llevando a cabo actualmente en distintos laboratorios, y en particular en el del Profesor E. Neher en Gotinga, para esclarecer el significado funcional en la exocitosis de distintas proteínas sinápticas. Este tipo de estudios se vale de la introducción en las células desde la pipeta de «patch-clamp», juntamente con indicadores fluorescentes de baja afinidad para el Ca^{2+} (furaptra), de reactivos que específicamente interactuarán con dichas proteínas y se basa en el análisis de los cambios que se producen el patrón de la respuesta de capacitancia ya descrito. El propósito último de estos trabajos es el de relacionar los distintos componentes cinéticos de la respuesta excitotóxica, indicativos de la existencia de poblaciones de vesículas en estados funcionales distintos, con entidades o complejos moleculares de la maquinaria secretora (35).

LA MAQUINARIA MOLECULAR DE LA EXOCITOSIS EN LAS CELULAS CROMAFINES

El primer aspecto al que me referiré versa sobre un elemento clave de la hipótesis SNARE que postula la intervención generalizada de α SNAP y NSF en los procesos de fusión intracelular de membranas. En su formulación inicial, la hipótesis SNARE consideraba que el ensamblaje del complejo ternario inducido por NSF era el desencadenante último —proveía la energía necesaria— del proceso de fusión de membranas. Sin embargo, la diálisis intracelular de α SNAP da lugar a un incremento de los componentes fásico y tónico de la respuesta excitotóxica inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} en las células cromafines, sin modificar la cinética del componente fásico. Ello sugiere que α -SNAP interviene en las etapas iniciales del proceso secretor. En consonancia con estos resultados, la N-etilmaleimida (NEM), un agente que bloquea la actividad ATPásica del NSF al impedir su unión al complejo ternario, produce una reducción selectiva del componente tónico de la respuesta excitotóxica (36, 37).

El segundo elemento fundamental de la hipótesis SNARE hace referencia a las proteínas integrantes del complejo de fusión. Las toxinas clostridiales son neurotoxinas paralizantes producidas por distintas cepas del género clostridium. Se comportan como protea-

sas que hidrolizan enlaces específicos de las distintas SNAREs. A este respecto, conviene mencionar que la identificación de estas proteínas como las dianas de las toxinas clostridiales constituyó la primera evidencia que asoció a las SNAREs con la exocitosis (38, 39, 40, 41). Los enlaces peptídicos hidrolizados por las toxinas se encuentran entre los extremos carboxilo-terminales (de inserción de la sinaptobrevina y la syntaxina a la membrana) de las SNAREs y la porción media del complejo de fusión (Figura 2B). Sólo los monómeros de SNAREs o el complejo ternario parcialmente ensamblado («loose complex»; SRP, ver más adelante), en el que las hélices alfa próximas a los extremos carboxilo-terminales se encuentran separadas, son susceptibles a la acción de las toxinas (42). Tanto la toxina tetánica como las botulínicas B, D, F y G, que actúan sobre la sinaptobrevina, como la botulínica C que hidroliza la syntaxina, ocasionan la separación de la membrana vesicular o plasmática, respectivamente, del complejo de fusión, impidiendo así que sirva de puente que aproxime las dos membranas. Por su parte, las toxinas botulínicas A y E actúan sobre el extremo carboxilo-terminal de SNAP-25, que no interviene en el anclaje de esta proteína a la membrana. Por ello, su efecto se atribuye a la desestabilización del complejo de fusión en su región carboxilo-terminal (43). Estas sustancias eliminan completamente la respuesta tónica inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} , produciendo inicialmente un efecto mucho menor sobre la respuesta fásica. Su efecto se explicaría tanto porque las toxinas actúan sobre las formas monoméricas de las SNAREs impidiendo su participación en la formación de complejos de fusión (supresión del componente tónico), como porque el estado parcialmente ensamblado de éstos sería también sensible a la acción de las toxinas (reducción del componente fásico). El efecto de la toxina botulínica A difiere de este patrón, ya que al eliminar sólo los últimos nueve aminoácidos del extremo carboxilo-terminal de SNAP-25 —que tampoco forman parte del dominio SNARE de esa proteína— esta toxina ocasionaría la desestabilización del complejo completamente ensamblado, lo que conllevaría exclusivamente la pérdida del componente rápido de la respuesta fásica («tight complex»; RRP, ver más adelante) (44).

Como resultado de este tipo de experimentos es posible concluir que α -SNAP y NSF intervienen en etapas tempranas del proceso

secretor, deshaciendo los complejos de fusión en configuración cis (más estables termodinámicamente) que se forman entre proteínas situadas en la misma membrana (Figura 4). La rotura de dichos complejos catalizada por la hidrólisis del ATP rinde monómeros de SNAREs altamente energizados que se asociarán entre sí para formar complejos ternarios en configuración trans. Se considera que la energía almacenada en la distorsión de las SNAREs en las zonas próximas a su inserción en las membranas constituye un elemento esencial para promover la fusión. Por ello, son las vesículas que incorporan complejos en esta configuración las que presentan competencia secretora, que se alcanzará en función de la disponibilidad de monómeros de SNAREs, lo que a su vez está condicionado por la indemnidad de los mismos —se da en circunstancias normales de ausencia de toxinas clostridiales— y por la actividad de α -SNAP y NSF. Ambos factores, disponibilidad de monómeros de SNAREs y actividad de α -SNAP y NSF determinarán la velocidad del componente tónico o sostenido de la respuesta excitósica (45).

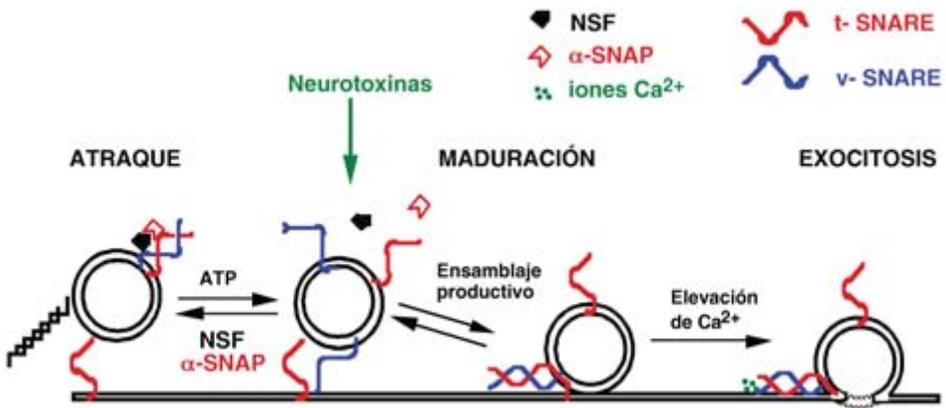


FIGURA 4. Lugar de acción de α -SNAP y NSF en el ciclo vesicular. El proceso de maduración vesicular para la adquisición de competencia secretora implica la formación de complejos ternarios entre SNAREs situadas en membranas destinadas a fusionarse (configuración trans; ensamblaje productivo). α -SNAP y NSF intervienen en etapas tempranas de la exocitosis deshaciendo los complejos en configuración cis, que se forman entre SNAREs situadas en la misma membrana. Las toxinas clostridiales actúan sobre formas libres de las SNAREs.

La formación del complejo de fusión no constituye un requisito para el atraque («docking») de las vesículas a la membrana plasmática, ya que éste se sigue produciendo —en base a valoraciones morfológicas mediante microscopía electrónica— en células procedentes de ratones «knock-out» para el gen de SNAP-25 (46). En esta función de conectar físicamente las vesículas de secreción a la membrana plasmática parece participar la proteína Munc18-1 (47). Se trata de una proteína citosólica que posee una elevada afinidad para unirse a la syntaxina cuando se haya en forma libre, no formando parte del complejo de fusión. Las células cromafines obtenidas de ratones deficientes en Munc18-1 presentan una reducción de la amplitud de la respuesta secretora debida a la disminución del número de gránulos cromafines situados en contacto con la membrana celular. Por el contrario, la sobreexpresión de Munc18-1 en estas mismas células se asocia a un aumento tanto en el componente fásico como tónico de la respuesta secretora inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} . Estos resultados sugieren que Munc18-1 promueve el atraque de las vesículas a la membrana celular previamente a la formación del complejo de fusión (48).

Si bien las toxinas clostridiales han sido herramientas farmacológicas de altísimo valor en el estudio de la exocitosis, presentan el inconveniente de su toxicidad potencial para el investigador y, sobre todo, el de actuar sobre un número relativamente reducido de localizaciones intramoleculares. Por ello, el empleo de anticuerpos —y de sus fragmentos Fab— dirigidos contra epítomos seleccionados por el investigador puede ofrecer importantes ventajas en la caracterización de los dominios funcionalmente relevantes de las proteínas SNARE. La cinética de unión de algunos anticuerpos a su dianas puede ser lenta, precisándose un tiempo de contacto entre ambos relativamente prolongado (> 30 min) y, en todo caso, superior al que puede mantenerse una célula en la configuración de célula completa de la técnica de «patch-clamp». En circunstancias como ésta en las que sea necesario evaluar los efectos de moléculas que actúan lentamente sobre la exocitosis, es preferible recurrir a un abordaje experimental diferente al descrito (Figura 5). En este caso, tanto la molécula en cuestión como algún indicador fluorescente de Ca^{2+} son también introducidos en la célula cromafín vía una pipeta de «patch-clamp» en la configuración de célula completa, si bien posterior-

mente se retira la pipeta y se inicia la estimulación de la célula mediante la aplicación de pulsos de 500 ms de acetilcolina, que se administra iontoforéticamente. Durante la estimulación se procede al registro de la señal citosólica de Ca^{2+} y de la actividad secretora medida por amperometría. La posibilidad de aplicar esta técnica constituye otra de las ventajas que el empleo de células cromafines aporta al estudio de la neurosecreción. Mediante la amperometría se mide la corriente eléctrica generada por la oxidación de las cateco-

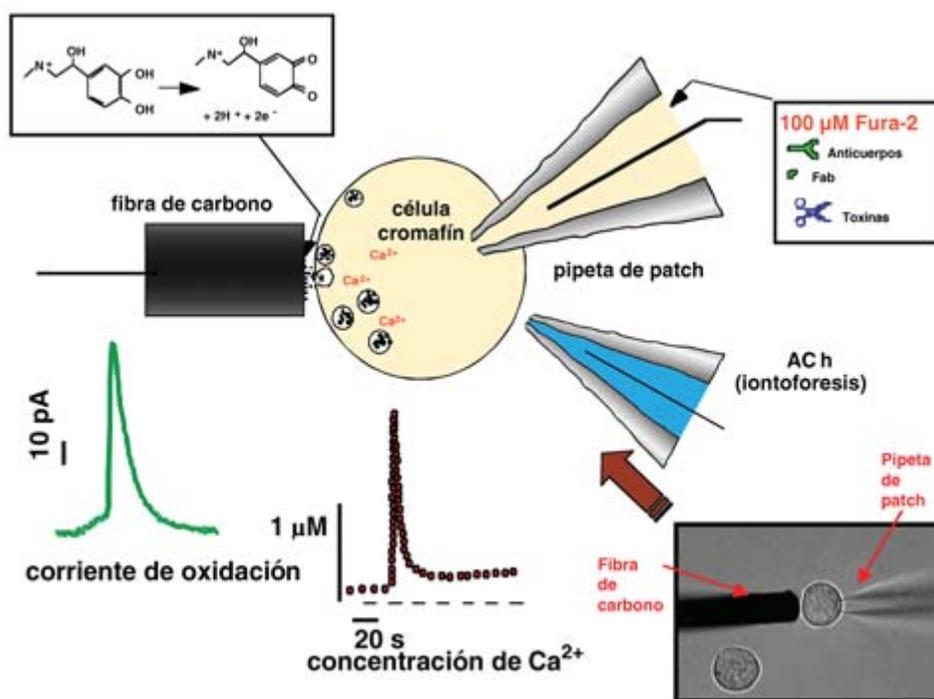


FIGURA 5. Abordaje experimental alternativo para el estudio de la exocitosis en las células cromafines. Se muestra una micrografía y el correspondiente esquema de una célula cromafín en la configuración de célula completa de la técnica de «patch-clamp». La pipeta de «patch-clamp» se emplea para inyectar indicadores fluorescentes y reactivos específicos en el interior de la célula (recuadro superior derecho). En este caso, se recurre a la administración iontoforética de acetilcolina (ACh) para elevar la concentración citosólica de Ca^{2+} , y la respuesta secretora se mide mediante amperometría. Esta técnica detecta la corriente eléctrica generada por la oxidación de las catecolaminas en la superficie de un microelectrodo que se sitúa en contacto con la membrana celular (recuadro superior izquierdo).

laminas en la superficie de un microelectrodo de fibra de carbono que se coloca en contacto con la superficie celular, pudiendo llegar a detectarse las catecolaminas liberadas por gránulos cromafines individuales (49, 50).

Este abordaje experimental, que permite el registro durante períodos prolongados de tiempo (~1 hora) de la actividad secretora de una célula cromafín, fue el empleado para evaluar los efectos del anticuerpo Cl69.1, que reconoce los últimos 17 aminoácidos del extremo amino-terminal de la sinaptobrevina (51). Esta región no forma parte del dominio SNARE de la proteína, por lo que dicho anticuerpo no interfiere con la formación *in vitro* del complejo ternario ni modifica su susceptibilidad a la destrucción por NSF —de hecho el anticuerpo se une tanto a la forma libre de la sinaptobrevina como a la incluida en el complejo ternario—. De forma congruente con estos datos, la introducción de los fragmentos Fab del anticuerpo Cl69.1 no modifica la respuesta secretora inducida por la administración iontoforética de acetilcolina y medida mediante amperometría. No obstante, cuando se introduce el anticuerpo completo se observa una lenta pero total inhibición de la respuesta secretora, posiblemente como consecuencia de impedimentos estéricos generados por la macromolécula (52).

El segundo anticuerpo al que me referiré es el Cl71.1, que reacciona con una región correspondiente a los aminoácidos 20 a 40 del extremo amino-terminal de SNAP-25 que forman parte del dominio SNARE de la proteína, por lo que impide la formación *in vitro* del complejo ternario, aunque no su desensamblaje (53). Una vez introducido en el interior de una célula cromafín, el anticuerpo Cl71.1 reduce sustancialmente tanto el componente fásico como el tónico de la respuesta secretora. Mientras que el efecto sobre el componente tónico es probablemente debido a la capacidad del anticuerpo para impedir la formación del complejo de fusión, la interpretación del efecto sobre el componente fásico precisa de información adicional sobre las características de este componente. En la mayoría de las células cromafines, un análisis cinético detallado de la respuesta fásica en condiciones control permite resolver, a su vez, dos componentes en la misma: uno rápido que, cuando la concentración de Ca^{2+} intracelular alcanza los 20-30 μM , discurre con una constante de tiempo de 30 ms, y otro más lento que presenta una constante

de tiempo de 300 ms para esa misma concentración de Ca^{2+} . Estos componentes permitirían la identificación de dos conjuntos o contingentes de vesículas con distinta probabilidad de ser liberadas y que se han denominado como rápida (RRP, «readily releasable pool of vesicles») y lentamente (SRP, «slowly releasable pool of vesicles») liberables. Es particularmente interesante el hecho de que el anticuerpo Cl71.1 elimine en el 90 por 100 de las células el componente rápido sin afectar a la amplitud o la cinética del componente

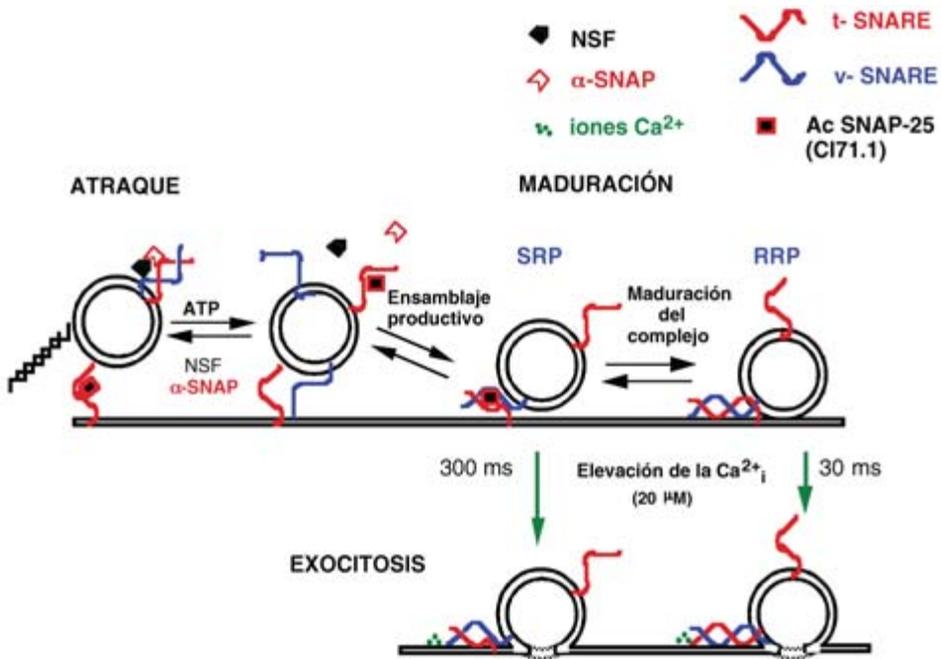


FIGURA 6. En la célula cromafín existen dos poblaciones de vesículas con distinta probabilidad de ser liberadas. Un análisis cinético detallado de la respuesta secretora inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} permite identificar una población vesicular de liberación rápida (τ : 30 ms; RRP, «readily releasable pool of vesicles») y otra de liberación lenta (τ : 300ms; SRP, «slowly releasable pool of vesicles»). El anticuerpo Cl71.1, que reconocen el dominio SNARE de SNAP-25, bloquea la respuesta secretora dependiente de la fusión de las vesículas del contingente RRP sin afectar a la liberación de las del SRP. El esquema muestra que el complejo de fusión puede encontrarse en dos estados, laxo y tenso, en función del grado de ensamblaje (parcial y completo), que estarían en equilibrio entre sí y que serían distinguidos por el anticuerpo Cl71.1. Véase el texto para una explicación más detallada.

lento (52). Estos resultados sugieren que posiblemente el complejo ternario se encuentre en dos estados que denominamos laxo y tenso («loose» y «tight») en función del nivel de ensamblaje (parcial o completo) —lo que determinaría el grado de yuxtaposición de los dominios más próximos a las membranas y, consiguientemente, de las dos membranas—, que se encontrarían en equilibrio entre sí y que serían distinguidos por este anticuerpo en virtud de su capacidad para unirse al complejo parcialmente ensamblado y, además, impedir que el ensamblaje del mismo se complete. Asimismo, ambos estados serían molecularmente responsables de la existencia de dos contingentes de vesículas con cinéticas de liberación diferentes (RRP y SRP) (Figura 6).

La existencia de dos contingentes vesiculares con distinta probabilidad de ser liberados dota a la célula cromafín —al igual que a las neuronas— (54, 55) de la capacidad de adaptar su respuesta secretora al patrón de estimulación. Así, las breves elevaciones de la concentración de Ca^{2+} intracelular (« Ca^{2+} spikes») producidas por la descarga de un tren de potenciales de acción movilizarán preferentemente a las vesículas del contingente RRP, mientras que una elevación sostenida aunque relativamente importante ($10 \mu\text{M}$) de dicha concentración —inducida por la fotoliberación de Ca^{2+} y probablemente también por potenciales de acción que desencadenen el fenómeno de liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR) o en los que la entrada de Ca^{2+} se vea incrementada por la fosforilación de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de tipo L— ocasionará la fusión de las vesículas del contingente SRP (45). Además, siempre que la elevación de la concentración citosólica de Ca^{2+} se prolongue suficientemente —por ejemplo, en respuesta a agentes que liberen Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares dependientes de inositol trifosfato— se estimulará el proceso de maduración vesicular (el componente tónico de la respuesta) que posibilitará la reposición de los contingentes RRP y SRP (56).

Las sinaptotagminas son una familia de proteínas vesiculares que presentan dos dominios C2, C2A y C2B, con capacidad de unirse de forma dependiente de Ca^{2+} a los fosfolípidos de membrana y a algunos de los componentes del complejo de fusión (SNAP-25 y sintaxina). El dominio C2B participa también en procesos de multimerización dependientes de Ca^{2+} y en la unión a fosfoinosítidos, a proteínas

implicadas en la endocitosis y a canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (13). La sinaptotagmina I es una isoforma de la sinaptotagmina particularmente abundante en neuronas y que presenta una K_D de 3-6 μM para el Ca^{2+} (57) —curiosamente el receptor de Ca^{2+} implicado en la fusión de las vesículas del contingente RRP de la célula cromafín tendría una K_D de 10 μM , a tenor de los modelos matemáticos desarrollados por el grupo de E. Neher—. Por ello, desde hace algunos años se viene considerando a esta proteína como el receptor de Ca^{2+} de la exocitosis regulada (15, 57, 58). En células cromafines procedentes de ratones «knock-out» para el gen de la sinaptotagmina I se observa una marcada disminución de la respuesta fásica a la fotoliberación de Ca^{2+} sin compromiso aparente de la respuesta tónica. Este efecto se asocia a un incremento de la latencia —período de tiempo entre la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico y el inicio de la exocitosis— de la respuesta fásica

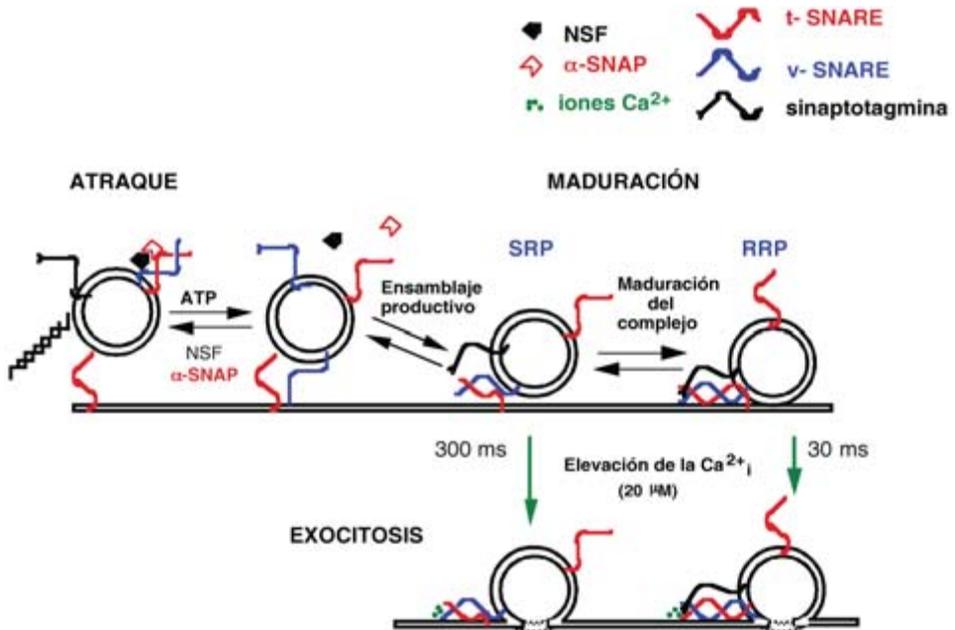


FIGURA 7. La sinaptotagmina I puede ser el receptor de Ca^{2+} específico del contingente de vesículas rápidamente liberables (RRP). En ratones carentes («knock-out») del gen de la sinaptotagmina I se produce la desaparición del contingente de vesículas RRP. Véase el texto para una explicación más detallada.

residual que, además, transcurre más lentamente. Este enlentecimiento se produce a costa de la desaparición del componente rápido de la respuesta fásica (RRP) y se observa en un rango de concentraciones de Ca^{2+} intracelular muy amplio (8-100 μM). Ello supondría la pérdida en estos animales de una respuesta exocitótica rápida y sincrónica con la entrada de Ca^{2+} (59). En el contexto del esquema secuencial de la exocitosis, los resultados que acabo de describir podrían interpretarse en el sentido de que la sinaptotagmina I regularía el equilibrio entre los estados parcial y totalmente ensamblado—cuya estabilidad estaría muy disminuida en ausencia de dicha proteína— del complejo de fusión o, alternativamente, serviría como receptor de Ca^{2+} del contingente de vesículas de liberación rápida (RRP) (Figura 7).

Un estudio reciente, llevado a cabo también en células cromafines, ha posibilitado la distinción entre ambas posibilidades (60). En dicho estudio se emplearon células procedentes de ratones «knock-in» portadores de una mutación (R2333Q) en el dominio C2A de la sinaptotagmina I, que disminuye su afinidad para unirse de forma dependiente de Ca^{2+} a los fosfolípidos de membrana sin modificar su capacidad para unirse a la syntaxina (61). En estos animales se mantuvo el tamaño relativo de los contingentes RRP y SRP, aunque se observó un desplazamiento hacia la derecha de la curva que relaciona la velocidad de liberación del contingente RRP con la concentración citosólica de Ca^{2+} y un incremento de la concentración de Ca^{2+} necesaria para activar dicha liberación. Estos resultados son compatibles con un aumento de la K_D del receptor de Ca^{2+} que controla la fusión de las vesículas del contingente RRP, y sugieren que la reacción que dispara la exocitosis rápida es la unión de la sinaptotagmina I a los fosfolípidos de la membrana celular.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) KATZ, A. (1969). The release of neural transmitter substances. The Sherrington Lectures X. Liverpool University Press.
- (2) ELMQVIST, D. y QUASTEL, D. M. (1965). A quantitative study of end-plate potentials in isolated human muscle. *J Physiol.* 178: 505-529.
- (3) HEUSER, J. E.; REESE, T. S.; DENNIS, M. J.; JAN, Y. y JAN, L. (1979). Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. *J. Cell Biol.* 81: 725-730.

- (4) SÜDHOF, T. C. (1995). The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 375: 645-653.
- (5) SÜDHOF, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 27: 509-547.
- (6) PALFREY, H. C. y ARTALEJO, C. R. (1998). Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. *Neuroscience* 83: 969-989, 1998.
- (7) KLINGAUF, J.; KAVALALI, E. T. y TSIEN, R. W. (1998). Kinetics and regulation of fast endocytosis at hippocampal synapses. *Nature*. 394: 581-585.
- (8) JAHN, R.; LANG, T. y SÜDHOF, T. C. (2003). Membrane fusion. *Cell* 112: 519-533.
- (9) FERNÁNDEZ-CHACÓN, R. y SÜDHOF, T. C. (1999). Genetics of synaptic vesicle function: Toward the complete functional anatomy of an organelle. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 753-776.
- (10) JANZ, R. y SÜDHOF, T. C. (1999). SV2C is a synaptic vesicle protein with an unusually restricted localization: anatomy of a synaptic vesicle protein family. *Neuroscience* 94: 1279-1290.
- (11) HILFIKER, S.; PIERIBONE, V. A.; CZERNIK, A. J.; KAO, H. T.; AUGUSTINE, G. J. y GREENGARD, P. (1999). Synapsins as regulators of neurotransmitter release. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354: 269-279.
- (12) 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.
- (13) BROSE, N.; PETRENKO, A. G.; SUDHOF, T. C. y JAHN, R. (1992). Synaptotagmin: a calcium sensor on the synaptic vesicle surface. *Science* 256: 1021-1025.
- (14) SUDHOF, T. C. (2002). Synaptotagmins: why so many? *J. Biol. Chem.* 277: 7629-7632.
- (15) YOSHIHARA, M.; ADOLFSEN, B. y LITTLETON, J. T. (2003). Is synaptotagmin the calcium sensor? *Curr. Opin. Neurobiol.* 13: 315-323.
- (16) SÖLLNER, T.; WHITEHEART, S. W.; BRUNNER, M.; ERDJUMENT-BROMAGE, H.; GEROMANOS, S.; TEMPST, P. y ROTHMAN, J. E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* 362: 318-324.
- (17) SÖLLNER, T.; BENNETT, M. K.; WHITEHEART, S. W.; SHELLER, R. H. y ROTHMAN, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion. *Cell* 75: 409-418.
- (18) 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.
- (19) ROTHMAN, J. E. (2002). The machinery and principles of vesicle transport in the cell. *Nat. Med.* 8: 1059-1062.
- (20) HANSON, P. I.; ROTH, R.; MORISAKI, H.; JAHN, R. y HEUSER, J. E. (1997). Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. *Cell* 90: 523-535.

- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) AUNIS, D. y LANGLEY, K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol. Scand.* 167: 89-97.
- (24) HODEL, A.; SCHÄFER, T.; GEROSA, D. y BURGER, M. (1994). In chromaffin cells, the mammalian Sec1p homologue is a syntaxin 1A-binding protein associated with chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* 269: 8623-8626.
- (25) ROTH, D. y BURGOYNE, R. D. (1994). SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett.* 351: 207-210.
- (26) MORGAN, A. y BURGOYNE, R. D. (1995). A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. *EMBO J.* 14: 232-239.
- (27) GERBER, S. H. y SÜDHOF, T. C. (2002). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes* 51: Suppl 1: S3-11.
- (28) BURGOYNE, R. D. y MORGAN, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiol. Rev.* 83: 581-632.
- (29) ARTALEJO, A. R. (1995). Electrical properties of adrenal chromaffin cells. En: «The electrophysiology of neuroendocrine cells». Schreübl, H. & Hescheler J. (eds.) CRC Press, Boca Raton, FL. págs. 259-299.
- (30) 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.
- (31) TSIEN, R. Y. (1989). Fluorescent indicators of ion concentrations. *Methods Cell Biol.* 30: 127-156.
- (32) NEHER, E. y MARTY, A. (1982). Discrete changes in cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 6712-6716.
- (33) KAPLAN, J. H. y ELLIS-DAVIES, G. C. (1988). Photolabile chelators for the rapid photorelease of divalent cations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6571-6575.
- (34) NEHER, E. y ZUCKER, R. (1993). Multiple Ca-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron* 10: 21-30.
- (35) RETTIG, J. y NEHER, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science* 298: 781-785.
- (36) KIBBLE, A. V.; BARNARD, R. J. y BURGOYNE, R. D. (1996). Patch-clamp capacitance analysis of the effects of alpha-SNAP on exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J. Cell Sci.* 109: 2417-2422.
- (37) ASHERY, U.; BURGOYNE, R. D. y NEHER, E. (1999). Early requirement for alpha-SNAP and NSF in the secretory cascade in chromaffin cells. *EMBO J.* 18: 3293-3304.
- (38) SCHIAVO, G.; BENFENATI, F.; POULAIN, B.; ROSETTO POLVERINO DE LAURETO, P.; DASGUPTA, B. R. y MONTECUCCO, C. (1992). Tetanus and botulinum-B neuro-

- toxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* 359: 832-835.
- (39) BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; YAMASAKI, S.; BINZ, T.; NIEMANN, H. y JAHN, R. (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J.* 12: 4821-4828.
- (40) BLASI, J.; CHAPMAN, E. R.; LINK, E.; BINZ, T.; YAMASAKI, S.; DE CAMILLI, P.; SÜDHOF, T. C.; NIEMANN, H. y JAHN, R. (1993). Botulinum neurotoxin A selectively cleaves the synaptic protein SNAP-25. *Nature* 365: 5160-5163.
- (41) NIEMANN, H.; BLASI, J. y JAHN, R. (1994). Clostridial neurotoxins: new tools for dissecting exocytosis. *Trends Cell Biol.* 4: 179-185.
- (42) HAYASHI, T.; McMAHON, H.; YAMASAKI, S.; BINZ, T.; HATA, Y.; SUDHOF, T. C. y NIEMANN, H. (1994). Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. *EMBO J.* 13: 5051-5061.
- (43) 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.
- (44) XU, T.; BINZ, T.; NIEMANN, H. y NEHER, E. (1998). Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nat. Neurosci.* 1: 192-200.
- (45) SØRENSEN, J. B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Arch.* 448: 347-362.
- (46) SØRENSEN, 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.
- (47) WEIMER, R. M.; RICHMOND, J. E.; DAVIS, W. S.; HADWIGER, G.; NONET, M. L. y JORGENSEN, E. M. (2003). Defects in synaptic vesicle docking in unc-18 mutants. *Nat. Neurosci.* 6: 1023-1030.
- (48) VOETS, T.; TOONEN, R. F.; BRIAN, E. C.; DE WIT, H.; MOSER, T.; RETTIG, J.; SUDHOF, T. C.; NEHER, E. y VERHAGE, M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron* 31: 581-591.
- (49) WIGHTMAN, R. M.; JANKOWSKI, J. A.; KENNEDY, R. T.; KAWAGOE, K. T.; SCHROEDER, T. J.; LESZCZYNSZYN, D. J.; NEAR, J. A.; DILIBERTO, E. J. JR. y VIVEROS, O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10754-10758.
- (50) CHOW, R. H.; VON RUDEN, L. y NEHER, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* 356: 60-63.
- (51) EDELMANN, L.; HANSON, P. I.; CHAPMAN, E. R. y JAHN, R. (1995). Synaptobrevin binding to synaptophysin: a potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO J.* 14: 224-231.
- (52) XU, T.; RAMMNER, B.; MARGITTAL, 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.
- (53) BRUNS, D.; ENGBERG, S.; YANG, C.; OSSIG, R.; JEROMIN, A. y JAHN, R. (1997). Inhibition of transmitter release correlates with the proteolytic activity of

- tetanus toxin and botulinus toxin A in individual cultured synapses of *Hirudo medicinalis*. *J. Neurosci.* 17: 1898-1910.
- (54) SCHNEGGENBURGER, R.; SAKABA, T. y NEHER, E. (2002). Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends Neurosci.* 25: 206-212.
- (55) STEVENS, C. F. (2003). Neurotransmitter release at central synapses. *Neuron* 40: 381-388.
- (56) VON RUDEN, L. y NEHER, E. (1993). A Ca-dependent early step in the release of catecholamines from adrenal chromaffin cells. *Science* 262: 1061-1065.
- (57) GEPPERT, M.; GODA, Y.; HAMMER, R. E.; LI, C.; ROSAL, T. W.; STEVENS, C. F. y SUDHOF, T. C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca^{2+} sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 79: 717-727.
- (58) LITTLETON, J. T.; STERN, M.; SCHULZE, K.; PERIN, M. y BELLEN, H. J. (1993). Mutational analysis of *Drosophila* synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca^{2+} -activated neurotransmitter release. *Cell* 74: 1125-1134.
- (59) VOETS, T.; MOSER, T.; LUND, P. E.; CHOW, R. H.; GEPPERT, M.; SUDHOF, T. C. y NEHER, E. (2001). Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11680-11685.
- (60) SØRENSEN, J. B.; FERNÁNDEZ-CHACÓN, R.; SUDHOF, T. C. y NEHER, E. (2003). Examining synaptotagmin I function in dense core vesicle exocytosis under direct control of Ca^{2+} . *J. Gen. Physiol.* 122: 265-276.
- (61) FERNÁNDEZ-CHACÓN, R.; KONIGSTORFER, A.; GERBER, S. H.; GARCÍA, J.; MATOS, M. F.; STEVENS, C. F.; BROSE, N.; RIZO, J.; ROSENMUND, C. y SUDHOF, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 410: 41-49.