



**Departamento de Medicina Física y Farmacología
Facultad de Ciencias de la Salud**

**“Estudio del papel funcional del ATP intravesicular en el
almacenamiento y la exocitosis de catecolaminas”**

Memoria de tesis para aspirar al grado de doctor por la
Universidad de La Laguna presentada por

Judith Estévez Herrera

Directores de tesis:

Dr. Ricardo Borges Jurado

Dr. José David Machado Ponce

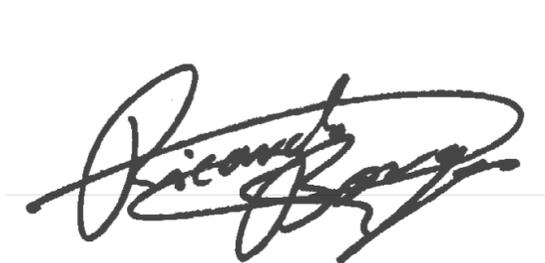
La Laguna, a 21 de julio de 2015

D. Ricardo Borges Jurado, Catedrático del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna, y D. José David Machado Ponce, investigador del Departamento de Medicina Física y Farmacología de la Universidad de La Laguna,

CERTIFICAN:

Que D. Judith Estévez Herrera ha realizado el trabajo titulado: **“Estudio del papel funcional del ATP intravesicular en el almacenamiento y la exocitosis de catecolaminas”** que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de La Laguna.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en La Laguna a 21 de julio de 2015.



Dr. Ricardo Borges Jurado
Catedrático de Farmacología



Dr. José David Machado Ponce
Investigador Ramón y Cajal

A mis padres

A mi hermana

A Josué

Agradecimientos

Gracias a mis directores de tesis, el Dr. Ricardo Borges y el Dr. José David Machado por haberme dado la oportunidad de desarrollar este trabajo bajo su dirección, por ayudarme a crecer como científica pero sobre todo como persona. Por hacer del departamento de Farmacología mi segunda casa. Por sus ganas de enseñar y de hacerme aprender siempre, por su entusiasmo en hacer ciencia, por su constante y paciente seguimiento y asistencia compartiendo su tiempo de manera generosa durante todos estos años. También por luchar por conseguir la beca que ha permitido realizar este trabajo.

A la Dra. Rosa Planells, por brindarme la oportunidad de dar mis primeros pasos en un laboratorio. Agradezco su empeño en mostrarme cómo hacer biología molecular y en convencerme de que los blancos y negros no existen, me ha servido de mucho. También a mis compañeras del Príncipe Felipe, por la acogida y el tiempo que dedicaron en enseñarme.

A la Dra. Ann Sofie Cans por adoptarme en su laboratorio en una estancia de tres meses y brindarme la oportunidad de conocer la ciencia "from botton". Por lo que Gotemburgo en este período tan corto significó en mi. Gracias a los compañeros del laboratorio de Chalmers especialmente a Hoda, Neda, Pegah y Jackie por su humildad y hacerme sentir como en casa.

Al Dr. Agustín Valenzuela por participar con su interés y apoyo durante el desarrollo de este trabajo. Por las numerosas y extendidas discusiones en los pasillos, gracias por el ánimo que ha demostrado. Al Dr. Diego Álvarez por ofrecerme su ayuda cuando me enfrenté a algunas dificultades. A la Dra. Araceli Morales por su disposición y sus deseos de que salgan los experimentos, especialmente los de microscopía confocal y al Dr. Federico Díaz y Dr. Feria por su afecto y palabras.

Quiero agradecer también al Dr. Edward Westhead, por demostrarme qué es el amor por la ciencia. También al Dr. Reinhard Jahn, al Dr. Matthijs Verhage y la Dra. María Teresa Miras por escucharme y ser grandes partícipes de las discusiones sobre este trabajo. Por hacer que crea en mí misma.

Gracias a Juan Carlos, Carlos e Isabelis y a todos los matarifes del Matadero Insular que durante el desarrollo de esta tesis han trabajado desinteresadamente en proporcionar cada semana las glándulas adrenales de vaca. Al servicio de genómica y citometría de flujo de la Universidad de La Laguna. A Basilio Hernández, por su trabajo a cambio de nada en el intento de desencriptar mi disco duro. También al Dr. Wolfhard Almers y al Dr. Zheng-Xing Wu por la cesión de los plásmidos NPY-EGFP y NPY-DsRed y al Dr. Ricardo de Pascual por el tiempo y las ganas de enseñarme a separar las células cromafines de distinto fenotipo.

A mi amiga Natalia y Dra. Domínguez. Por confiar en mi y acercarme a este laboratorio. Por su doble papel de amiga y compañera. Gracias por sus palabras, a veces hasta largas horas de la madrugada.

Gracias a Marta, por estar siempre dispuesta ayudarme en los experimentos, desde la extracción con fenol cloroformo el primer día hasta el último en la estación de gradientes. Por los buenos momentos que hemos pasado además fuera del laboratorio.

También quiero agradecer a todos mis compañeros de poyata, Dani, Ayoze, Josito, Leandro y Rebeca por las palabras, por la ayuda, el apoyo, la risa y la amistad que me han regalado. Por todo lo que me enseñaron y por el buen ambiente que han creado.

A mis compañeros de departamento, los que aún siguen en esta batalla y los que pasaron a otra: Laura y Jony, Maite, Laura, Estefi, Chus, Sole, Sara, Josué, Thomas y Serena, gracias por los momentos agradables que hemos pasado juntos.

Gracias a mis compañeras de licenciatura por entender mis inquietudes y a mis amigos por el tiempo que me escucharon sin comprender tanto.

A mi familia, por estar siempre cuidándome. Por su preocupación en mi felicidad. Por sus palabras de ánimo y tranquilidad.

Gracias a mi marido, Josué, gracias por tu infinita paciencia, por tu inagotable apoyo en los momentos más difíciles, por compartir mi vida y mis logros. A ti mil gracias, esta tesis también es tuya.

Gracias a la vida, por permitirme disfrutar de lo que hago.

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos BFU2010-15822/FPI del Ministerio de Economía y Competitividad y C2008/01000239 de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información.

La autora de este trabajo, Judith Estévez Herrera, ha disfrutado de una beca de investigación BES-2011-043994 del programa FPI del Ministerio de Economía y Competitividad.

Publicaciones

1. Balsera B, Mulet J, Fernández-Carvajal A, de la Torre-Martínez R, Ferrer-Montiel A, Hernández-Jiménez JG, **Estévez-Herrera, J.**, Borges R, Freitas AE, López MG, García-López MT, González-Muñiz R, Pérez de Vega MJ, Valor LM, Svobodová L, Sala S, Sala F, Criado M. (2014). Chalcones as positive allosteric modulators of α_7 nicotinic acetylcholine receptors: A new target for a privileged structure. *European journal of medicinal chemistry*, 86, 724-739. IF=3,447; Q1 (Medicinal chemistry).

2. Dominguez, N., **Estevez-Herrera, J.**, Borges, R., & Machado, J. D. (2014). The interaction between chromogranin A and catecholamines governs exocytosis. *The FASEB Journal*, 28(11), 4657-4667. IF=5,043; Q1 (Biochemistry & Molecular biology).

3. **Estevez-Herrera, J.**, Pardo, M. R., Dominguez, N., Pereda, D., Machado, J. D., & Borges, R. (2013). The role of chromogranins in the secretory pathway. *Biomolecular concepts*, 4(6), 605-609.

4. Belghiti, M., **Estévez-Herrera, J.**, Giménez-Garzó, C., González-Usano, A., Montoliu, C., Ferrer-Montiel, A., ... & Planells-Cases, R. (2013). Potentiation of the transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to pruritogenesis in a rat model of liver disease. *Journal of Biological Chemistry*, 288(14), 9675-9685. IF=4,6; Q1(Biochemistry & Molecular biology).

5. Borges, R., Domínguez, N., **Estévez-Herrera, J.**, Pereda, D., & Machado, J. D. (2012). Vesicular Ca^{2+} mediates granule motion and exocytosis. *Cell calcium*, 51(3), 338-341. IP=4,327; Q2 (Cell biology)

6. Domínguez, N., **Estévez-Herrera, J.**, Pardo, M. R., Pereda, D., Machado, J. D., & Borges, R. (2012). The functional role of chromogranins in exocytosis. *Journal of Molecular Neuroscience*, 48(2), 317-322. IF=2,891; Q2 (Neuroscience).

7. Laínez, S., Valente, P., Ontoria-Oviedo, I., **Estévez-Herrera, J.**, Camprubí-Robles, M., Ferrer-Montiel, A., & Planells-Cases, R. (2010). GABAA receptor associated protein (GABARAP) modulates TRPV1 expression and channel function and desensitization. *The FASEB Journal*, 24(6), 1958-1970. IF=6,515; Q1.

Otras publicaciones:

8. Dominguez, N., **Estevez-Herrera, J.**, Campos, J., Borges, R., & Machado, J. D. (2013, December). Chromogranin A in the Storage and Exocytosis of Catecholamines. In Catecholamine Research in the 21st Century: Abstracts and Graphical Abstracts, 10th International Catecholamine Symposium, 2012(p. 51). Elsevier.

9. **Estévez-Herrera, J.** ; Pardo, MR; Domínguez, N .; Jiménez-Espinosa, C.; Borges, R. y Machado, JD. The involvement of vesicular ATP in the storage and exocytosis of catecholamines of bovine chromaffin cells. In Catecholamine Research in the 21st Century: Abstracts and Graphical Abstracts, 10th International Catecholamine Symposium, 2012(p. 52).Elsevier.

Manuscritos en preparación:

10. **Estevez-Herrera, J.**, Pardo, MR., Dominguez, N., Gonzalez-Santana, A., Westhead, EW., Borges, R., Machado, JD. The interaction of ATP with adrenaline:key to have a fuller secretory vesicle.

11. Pardo, MR., **Estevez-Herrera, J.**, Borges, R., Machado, JD. Isolation of mouse chromaffin vesicles.

Índice

Abreviaturas	XI
RESUMEN	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. La neurotransmisión y el descubrimiento de su naturaleza cuantal	9
1.2. La exocitosis y su estudio	10
1.3. La médula adrenal y las células cromafines	14
1.3.1. Las células cromafines: un modelo esencial para el estudio de la exocitosis.....	16
1.3.2. La ruta de biosíntesis de las catecolaminas.....	17
1.3.3. Tipos de células cromafines.....	19
1.3.4. Los gránulos cromafines.....	19
1.3.5. Un modelo de vesícula secretora.....	22
1.4. El ciclo de vida de una vesícula secretora	23
1.4.1. Los múltiples pasos de la exocitosis.....	25
1.4.2. La endocitosis y el reciclado de las vesículas secretoras.....	30
1.5. Los grupos vesiculares	31
1.6. La maduración de la vesícula secretora: gradiente electroquímico, transmisores y transportadores	32
1.6.1. Dirigiendo el transporte: la creación de un gradiente de protones electroquímico.....	32
1.6.2. VMAT y VNUT median la entrada de transmisores a los gránulos cromafines.....	34
1.6.2.1. El transportador de monoaminas vesicular (VMAT).....	35
1.6.2.2. El transportador de nucleótidos vesicular (VNUT).....	35

1.7. La capacidad de almacenamiento de los gránulos cromafines: los factores intravesiculares.	40
1.7.1. El pH intravesicular.	41
1.7.2. El Ca ²⁺ intravesicular.	42
1.7.3. Las cromograninas.....	42
1.7.4. El ATP intravesicular.....	44
1.7.4.1. El ATP como neurotransmisor.....	44
1.7.4.2. La co-transmisión.	45
1.7.4.3. El ATP como factor intravesicular.	46
2. OBJETIVOS.....	53
3. MATERIALES Y MÉTODOS.	57
3.1. Listado de reactivos y constructos de DNA.	57
3.2. Listado de anticuerpos.	58
3.3. Obtención y aislamiento de células y orgánulos subcelulares. 59	
3.3.1. Cultivo primario de células cromafines bovinas.	59
3.3.1.1 Purificación de células cromafines empleando gradientes discontinuos de Urografín®	61
3.3.1.2. Separación de las células cromafines mediante gradientes de Percoll®	63
3.3.2. El cultivo de la línea celular HEK293T.	64
3.3.4. Aislamiento y separación de los gránulos cromafines en un gradiente de densidad isosomótica de iodixanol.	64
3.4. Obtención del vector de expresión de VNUT-EGFP.....	66
3.4.1. Diseño de oligonucleótidos de DNA para clonaje y secuenciación.	66
3.4.2. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA de cromafines bovinas.	67
3.4.3. Clonaje del VNUT bovino en pEGFP-N1.	67

3.4.4. Preparación de las bacterias competentes y su transformación.	68
3.4.5. Secuenciación de DNA y análisis de las lecturas.	69
3.5. Diseño de oligonucleótidos de siRNA.	71
3.6. La nucleofección de células.	71
3.7. Determinación de la expresión del VNUT por PCR cuantitativa (qPCR).	72
3.7.1. Diseño de oligonucleótidos de qPCR.	72
3.7.2. PCR cuantitativa.	72
3.7.3. Eficiencia de la qPCR.	72
3.8. Técnicas de detección de proteínas.	73
3.8.1. <i>Western-blot</i> .	73
3.8.1.1. Preparación de la muestra.	73
3.8.1.2. Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.	73
3.8.1.3. Transferencia de las proteínas a membrana.	74
3.8.2. <i>Dot-blot</i> .	75
3.8.3. Inmunofluorescencia.	75
3.8.4. Citometría de flujo.	76
3.9. Ensayos de secreción de las células cromafines bovinas.	77
3.9.1. Secreción a punto final.	77
3.9.2. Secreción a tiempo real.	77
3.10. Determinación de ATP secretado por luminiscencia mediada por luciferina-luciferasa.	78
3.12. La amperometría en célula única.	81
3.12.1. Elaboración de los electrodos de carbono.	81
3.12.1.1. Fabricación.	81
3.12.1.2. La calibración.	82
3.12.2. Construcción de micropipetas para aplicar sustancias.	84

3.12.3. Detección amperométrica de la exocitosis.....	84
3.12.4. Análisis de datos amperométricos.	84
3.12.5. Parámetros cinéticos de las espigas.....	85
3.12.6. Criterios de selección de espigas.	86
3.13. La microscopía de epifluorescencia y TIRF.....	87
3.13.1. Adquisición de las imágenes de microscopía.	87
3.13.2. Análisis de la co-localización.	88
3.14. Medidas de concentración de calcio intracelular.....	88
3.15. Análisis estadístico.	89
4. RESULTADOS.....	93
4.1. El transportador de nucleótidos vesicular se expresa en las células cromafines y se localiza fundamentalmente en vesículas secretoras.....	93
4.2. El VNUT-EGFP es incorporado a los gránulos de nueva síntesis en las células cromafines bovinas.....	95
4.4. El origen del ATP secretado por la estimulación nicotínica de las células cromafines es principalmente vesicular.	100
4.5. La expresión del VNUT es esencial para el almacenamiento y exocitosis del ATP.....	103
4.6. La carencia del VNUT en LDCVs disminuye selectivamente la secreción de adrenalina.....	103
4.7. Los efectos sobre la liberación de catecolaminas de la reducción del VNUT son evidentes sólo en los primeros pulsos de estimulación.....	106
4.8. La estimulación nicotínica selecciona la liberación de las LDCVs de nueva síntesis.....	108
4.9. El silenciamiento del VNUT afecta el grado de reclutamiento de vesículas.....	110

4.10. La capacidad secretora de las células VNUT-KD disminuye de forma independiente al incremento de Ca^{2+} inducido por DMPP...	112
4.11. La biogénesis de gránulos secretores no está afectada por la carencia del ATP en las LCDVs.	113
4.12. El ATP vesicular promueve una mayor acumulación y secreción de la DA de las SVs.....	114
4.13. La amperometría en célula única revela una reducción en la cantidad de catecolaminas liberadas por cada vesícula en las células con VNUT el interferido.	115
4.14. La depleción de la producción celular de ATP afecta selectivamente la exocitosis de catecolaminas en las células cromafines bovinas.	119
4.15. El tratamiento farmacológico con Evans blue, produjo un aumento de la secreción de catecolaminas.	120
4.16. Las células cromafines tratadas con EB mostraron un aumento significativo del contenido cuántico.	122
4.17. El VNUT se expresa diferencialmente en los dos fenotipos de células cromafines bovinas.	123
5. DISCUSIÓN.....	129
5.1. ¿Es factible el silenciamiento del VNUT por siRNAs en las células cromafines bovinas?	129
5.2. VNUT: una diana necesaria en la regulación del almacenamiento y secreción del ATP.....	132
5.3. ¿Es el ATP intravesicular más que un co-transmisor?	135
5.4. La eficacia cuántica de las SV carentes de ATP.	137
5.6. VNUT y la probabilidad de fusión.....	144
6. CONCLUSIONES.....	151
7. ANEXOS.....	157
ANEXO I. Soluciones de trabajo empleadas.	157

ANEXO I. Densidad de siembra de las células cromafines según la superficie empleada.	158
ANEXO II. Optimización de la eficacia de interferencia de VNUT en cultivos primarios de células cromafines bovinas.....	160
ANEXO III. El pH vesicular en células VNUT-KD.....	161
Anexo IV. Medidas de complejación entre ATP y catecolaminas..	162
I. La calorimetría isoterma de titulación (ITC).	162
II. La cronoamperometría.....	163
8. BIBLIOGRAFÍA.	169

Abreviaturas

ΔpH	Gradiente de pH
$\Delta\Psi$	Gradiente eléctrico
$\Delta\Psi\text{H}^+$	Gradiente electroquímico
A	Adrenalina
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosín difosfato
AMP	Adenosín monofosfato
AMPc	Cíclic adenosine monophosphate/ Adenosín monofosfato cíclico
APS	Persulfato amónico
ATP	Adenosine triphosphate/ Adenosín trifosfato
BSA	Bovine serum albumin / Albúmina de suero bovino
CA	Catecolaminas
CCD	Charge-coupled device / Dispositivo de carga acoplada
CCDV	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
CIC-3	Canal de cloruro vesicular 3
CgA	Cromogranina A
CgB	Cromogranina B
C_T	Threshold Cycle / Ciclo umbral
DA	Dopamina
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
DHBA	3,4-dihidroxibencilamina
DMPP	Dimetil fenil piperazinio
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
D β H	Dopamina- β -hidroxilasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Enhanced Green Fluorescence Protein / Proteína fluorescente verde mejorada
FBS	Foetal Bovine Serum / Suero fetal bovino
Fig	Figura
GABA	Ácido gamma aminobutírico
GAPDH	Gliceraldehído 3 Fosfato Deshidrogenasa
GTP	Guanosín trifosfato
HEK293	Línea celular de riñón embrionario humano
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxyetil)-1-piperazinetanosulfónico
HPLC	High Performance Liquid Chromatography / Cromatografía de alta eficacia
HS	Suero de caballo
HVA	Alto umbral de activación
I_{max}	Amplitud máxima de corriente
KD	Knock-down
KO	Knock-out
LAAD	L-aminoácido-aromático-descarboxilasa

LDCV	Large Dense Core Vesicles / Vesículas grandes de núcleo denso
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LVA	Bajo umbral de activación
NA	Noradrenalina
NANC	No Adrenérgico No Colinérgico
NO	Óxido nítrico
NGF	Factor de crecimiento neuronal
NSF	N-ethylmaleimide Sensitive Factor
OD	Densidad óptica
PA	Potencial de acción
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
PC12	Línea celular de feocromocitoma
PCA	Ácido perclórico
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PNMT	Feniletanolamina-N-metil-transferasa
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
P2	Receptor purinérgico de ATP
P2X	Receptor purinérgico ionotrópico
P2Y	Receptor purinérgico metabotrópico
Q	Carga ó contenido cuántico en catecolaminas
qPCR	PCR cuantitativa
RT-PCR	PCR con transcriptasa reversa
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RRP	Readily Releasable Pool / Grupo de vesículas listo para ser liberado
RVP	Reserve Vesicle Pool / Grupo de vesículas de reserva
siRNA	Small Interference RNA / RNA de interferencia
SDS	Dodecilsulfato sódico
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SgII	Secretogranina II
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor
SRP	Slow Releasable Pool / Grupo de liberación lenta
STD	Mezcla de estándares de HPLC
SV	Vesículas secretoras
$t_{1/2}$	Ancho de una espiga amperométrica a la mitad de la amplitud máxima
t_p	Tiempo en alcanzar la amplitud máxima de una espiga amperométrica

TEMED	Tetrametiletilendiamina
TGN	Trans-Golgi network / Red trans-Golgi
TH	Tirosina Hidroxilasa
TIRFM	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UVP	Unprimed Vesicle Pool / Grupo de vesículas inmaduras
UTP	Uridina trifosfato
VACH	Transportador de ACh vesicular
VAMP	Vesicle-associated membrane protein / Proteína asociada a la membrana vesicular
VIAAT	Transportador de aminoácidos inhibitorios vesicular
VGLUT	Transportador de glutamato vesicular
VMAT	Transportador de monoaminas vesicular
VNUT	Transportador de nucleótidos vesicular
WT	Wild type / Cepa salvaje
5-HT	5-Hidoxitriptamina / Serotonina

Resumen/Abstract

RESUMEN.

El ATP es transportado y co-almacenado junto a otros transmisores a altas concentraciones en probablemente todas las vesículas secretoras conocidas (Borges, 2013). En los gránulos cromafines, organelas similares a las vesículas grandes de núcleo denso (LDCV) presentes en neuronas y otras células neuroendocrinas, podría encontrarse en el orden de ≈ 120 mM (Kopell et al., 1982) frente a los ≈ 4 mM citosólicos, representando alrededor de un 75% de la cantidad total celular (Corcoran et al., 1986). Al margen de su papel en la transmisión purinérgica, este nucleótido posee unas propiedades físico-químicas que lo hacen especial en el interior de las LCDVs y es la formación de complejos intravesiculares entre los tres componentes principales del gránulo: las catecolaminas (CA), las proteínas y el ATP (Kopell et al., 1982). Tales interacciones han sido postuladas durante muchos años para rendir cuenta a las altísimas concentraciones de las CA contenidas, entre 0,8-1 M (Montesinos et al., 2008; Albillos et al., 1997), y la estabilidad osmótica de los gránulos (Berneis, 1972; Weder and Wiegand, 1973).

Todas las estrategias desarrolladas para la depleción del contenido intravesicular de nucleótidos sobre células vivas han resultado ser ineficaces. A diferencia de las CAs, cuyo contenido cuántico es fácilmente alterable por la concentración citosólica de dopamina, por ejemplo por la incubación de L-DOPA (Mosharov et al., 2003; Sombers et al., 2005; Omiatek et al., 2013; Diaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008), el ATP posee una baja tasa de recambio del ATP en las LDCVs (Corcoran et al., 1986) de forma que el contenido en purinas se opone a los cambios citosólicos que puedan ser inducidos por inhibidores del metabolismo energético, dificultando así el estudio de la falta de este componente intravesicular sobre la exocitosis, además de la vida de la célula.

En este trabajo hemos empleado la interferencia de la expresión génica mediante siRNAs específicos del transportador de nucleótidos vesicular (VNUT) para explorar la repercusión sobre la acumulación y la exocitosis de CAs de las células cromafines bovinas. Las células interferidas con VNUT (VNUT-KD) exhibieron una reducción de más del 50% de la expresión del transportador, que se tradujo en una disminución

de aproximadamente un 40% de ATP y adrenalina secretadas por vía exocitótica sin cambios en las CAs totales celulares ni en los incrementos de Ca^{2+} intracelular. El estudio de la liberación de CAs y el neuropéptido Y asociado a EGFP, expresado de forma heteróloga en un sistema a tiempo real, permitió atribuir esta disminución de la secreción a las vesículas de nueva síntesis afectadas por la carencia del VNUT, siendo las primeras en ser liberadas ante una estimulación nicotínica. Además, la incubación de las células con L-DOPA, produjo una secreción de dopamina mayor en las células control que en las VNUT-KD, datos que sugieren que los mecanismos de acumulación vesicular de CAs en células VNUT-KD son deficientes. Los registros amperométricos de las células VNUT-KD mostraron una reducción en más de dos veces la liberación de CAs en comparación con las células control. Esta diferencia no fue debida solamente a una reducción de más del 50% del contenido cuántico de CA sino que además contribuyó a un menor grado de reclutamiento de los gránulos afectados por la carencia de ATP, dada la disminución de frecuencia de eventos exocitóticos.

Con estos datos llegamos a la conclusión de que el ATP intravesicular posee un papel regulador en la transmisión dada su implicación en la acumulación y la exocitosis de CAs.

ABSTRACT.

ATP is transported and co-stored along with other transmitters at high concentrations, probably in all secretory vesicles (Borges, 2013). In the chromaffin granule, a similar organelle of large dense core vesicles (LDCVs) present in neurons and neuroendocrine cells, ATP concentration has been estimated to be ≈ 120 mM (Kopell et al., 1982) vs cytosolic ≈ 4 mM, being the 75% of the total cell content (Corcoran et al., 1986).

Besides of its well-established role as energy source and as a neurotransmitter, this nucleotide possesses intrinsic chemical features that make it relevant for facilitating the accumulation of soluble species inside secretory vesicles. Thus ATP seems to promote the formation of intravesicular complexes between the three major constituents: catecholamines (CA), proteins and ATP (Kopell et al., 1982), although it is like that these complexes also involve H^+ and Ca^{2+} . Such interactions have been postulated for years to account for the huge amount of CA stored in these vesicles, (ranging 0.8-1 M) (Montesinos et al., 2008; Albillos et al., 1997) that largely exceed the theoretical osmotic limits (Berneis, 1972; Weder and Wiegand, 1973).

All the strategies addressed to the depletion of intravesicular nucleotide content on living cells have proved unsuccessful. Unlike CAs, whose quantal size can be easily modified by the changing cytosolic concentration of dopamine, e.g. by the incubation with L-DOPA (Mosharov et al., 2003; Sombers et al., 2005; Montesinos et al., 2008; Diaz-Vera et al., 2010; Diaz-Vera et al., 2012; Omiatek et al., 2013), ATP seems to possessed a low turnover rate in LDCVs (Corcoran et al., 1986). However, the purine content of secretory vesicles can be selectively manipulated without affect the cytosolic concentration, like those induced by metabolic inhibitors that strongly affect exocytosis and even the cell life.

In this work, we have used the gene silencing strategy using specific siRNAs against the vesicular nucleotide transporter (VNUT) of bovine chromaffin cells. We have explored its impact in the accumulation and in the exocytosis of CAs. The VNUT knock-down cells (VNUT-KD) exhibited a reduction of more than 50% of transporter expression, which resulted in a decrease of about 40% of ATP and adrenaline secreted by exocytosis

without changes in total CAs levels or intracellular Ca^{2+} . The study of the release of CAs and the heterologous expressed neuropeptide Y fused to EGFP, in a real time system, allowed us to attribute this decrease in secretion to the newly synthesized vesicles, affected by the lack of VNUT, being these vesicles the first to be released by a nicotinic stimulation. Moreover, the incubation of cells with L-DOPA yields a dopamine secretion higher in control than in VNUT-KD cells. Our data suggest that the mechanisms of accumulation of vesicular CAs in VNUT-KD cells are deficient. The amperometric recordings of VNUT-KD cells showed a reduction over a half of CAs secretion compared with control cells. This difference was not due only to a reduction of the quantal size (more than 50%), but also by a reduction in the frequency of secretory events, indicating a lower degree of recruitment of granules affected by the lack of ATP.

With these data we conclude that the ATP given their involvement in the accumulation and exocytosis of CAs plays a crucial regulatory role in transmission.

Introducción

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. La neurotransmisión y el descubrimiento de su naturaleza cuantal.

La aceptación de la sinapsis como entidad física en la que ocurre la transmisión nerviosa ha tenido una larga trayectoria en la historia de la ciencia. Hasta finales de siglo XIX, muchos fisiólogos consideraban que existía una continuidad física entre los nervios a través de los cuales se producía la transmisión del impulso nervioso. Sin embargo, numerosos científicos, entre ellos Ramón y Cajal, demostraron la individualidad histológica y funcional de la célula nerviosa describiendo cómo transcurría la corriente por la célula y cómo se comunicaban entre sí: por contigüidad, y no por continuidad. Con esta teoría neuronal se descubría la sinapsis.

Tras una larga disputa sobre la naturaleza química de la transmisión sináptica, ésta fue convincentemente demostrada por Otto Loewi en 1921 (Loewi, 1921). Loewi realizó un experimento crítico que consistió básicamente en la perfusión de un corazón de rana donador, estimulado eléctricamente a través del nervio vago, con una solución que tras ser emanada del corazón se hizo pasar por otro corazón de rana receptor. Dicha estimulación del primer corazón produce usualmente un enlentecimiento de la frecuencia cardíaca. Si la transmisión de tal impulso fuera de naturaleza eléctrica, la estimulación vagal habría parado el latido del corazón donador pero no el del receptor, pero no ocurrió así. La frecuencia cardíaca del segundo corazón disminuyó, lo que le llevó a dar con la clave de la transmisión del impulso nervioso: la neurotransmisión química. El líquido que había llamado "vasgusstoff", es decir, sustancia enlentecedora del corazón de origen vagal, fue más tarde identificado como la acetilcolina (ACh).

A partir del hallazgo de Loewi, en los años 30 comenzaron a identificarse más preparaciones biológicas en las que la naturaleza colinérgica era un factor común, tales como la inervación simpática de la médula adrenal por Feldberg y Minz (Feldberg et al., 1934), la unión neuromuscular por Henry Dale (Dale et al., 1936), o los nervios que inervan la electroplaca de la raya o del torpedo.

De forma paralela a estos estudios, Hodgkin y Huxley proponían el modelo en 1952 para explicar los mecanismos iónicos que subyacían a la iniciación y propagación de los potenciales de acción el axón gigante del calamar.

En este escenario, tras ser aceptada finalmente la naturaleza química de la mayoría de las sinapsis y conocidos los mecanismos iónicos que generaban los potenciales postsinápticos, la atención se centró en los mecanismos por los cuales se liberaba el neurotransmisor.

La hipótesis cuantal, aportada por Katz y sus colegas (Del Castillo y Katz, 1954) fue y ha sido el fundamento que explica la forma de secreción de los transmisores. Empleando preparaciones de terminales nerviosos sobre la placa motora definió que el neurotransmisor ACh que se almacenaba en paquetes submicroscópicos dentro de la célula era liberado desde la terminación axonal en paquetes discretos a los que denominaron cuantos, en un mecanismo del todo o nada.

La secreción cuantal y la identificación de las vesículas secretoras (SVs) como el compartimento de almacenamiento de los transmisores establecieron finalmente la teoría hoy en día ampliamente aceptada de la neurotransmisión química.

1.2. La exocitosis y su estudio.

La exocitosis es el proceso por el cual ocurre la fusión de una SV citoplasmática con la membrana celular para permitir la liberación de moléculas contenidas de forma unidireccional hacia el espacio extracelular. Este procedimiento complejo es esencial para la vida de la célula y es el empleado para la liberación cuántica de la mayoría de los neurotransmisores.

Se han descrito dos tipos de exocitosis principales en las células eucariotas: la *constitutiva*, no dependiente de Ca^{2+} y la *no constitutiva* o *regulada* y dependiente de Ca^{2+} . La *exocitosis constitutiva* está presente en todos los tipos celulares y permite renovar los componentes de la membrana plasmática y secretar moléculas extracelulares como proteínas del plasma, componentes de la matriz extracelular o para incorporar proteínas nuevas a la membrana plasmática (Burgess and Kelly, 1987).

Las sustancias químicas son secretadas constantemente y las reacciones que conducen a ella no están reguladas por señales intracelulares dependientes de estímulo, generalmente despolarizante. Además, en muchos tipos celulares, se da otra vía de exocitosis que está regulada por el Ca^{2+} y ocurre ante un determinado estímulo. Esta es la *exocitosis no constitutiva* o *regulada* que es, por definición, un proceso dependiente de Ca^{2+} . Esta vía permite la liberación controlada del contenido de las vesículas y/o la inserción de componentes de la membrana en respuesta a una señal fisiológica.

La aprobación de la exocitosis como mecanismo fundamental que explica la transmisión sináptica y el conocimiento de los mecanismos moleculares que subyacen en este proceso han venido de la mano del desarrollo de la técnicas que han permitido su observación y/o detección. Así, haciendo uso de métodos que permitieron permeabilizar la membrana plasmática por medio de descargas eléctricas (Baker and Knight, 1978) se demostró por primera vez que un aumento en el Ca^{2+} citosólico ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) era un requerimiento esencial para que tuviese lugar la exocitosis. Douglas acuñó la expresión “acoplamiento excitación-secreción” o “*stimulus-secretion coupling*” mediante el cual se produce la secreción de neurotransmisores y hormonas, siendo el Ca^{2+} el agente que conecta el estímulo o excitación y la respuesta secretora (Douglas, 1968). La contribución de Holz, utilizando células cromafines permeabilizadas con digitonina (Dunn and Holz, 1983), permitió además comprender el papel de diferentes proteínas quinasas o de los nucleótidos en la exocitosis.

Adicionalmente, el uso de la microscopía electrónica de las sinapsis reveló el alto número de SVs en terminales sinápticos, su estrecha relación con la membrana plasmática e incluso se describió la presencia de intermediarios de fusión -vesícula en omega- (Heuser and Reese, 1973). También se observó con la microscopía electrónica que la 5-hidroxi-dopamina, un análogo osmiofílico de la dopamina, se acumula en el interior de las vesículas sinápticas. Otros experimentos usando la marca soluble HRP (peroxidasa del rábano picante), que podía ser absorbida por el reciclado de las vesículas sinápticas, proporcionaron otra evidencia de que la liberación cuántica se basa en ciclos de exocitosis-endocitosis de compartimentos membranosos.

Desde la década de los años 90 se han dirigido los esfuerzos en identificar todas las proteínas que forman parte de la maquinaria que gobierna la exocitosis. El uso de herramientas farmacológicas en este sentido ha sido clave para la descripción del proceso. Por ejemplo, el uso de neurotoxinas de origen bacteriano, como la botulínica, que clivan proteínas necesarias para la fusión de las SVs con la membrana plasmática, las proteínas SNARE; *Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptors*, abolieron la neurotransmisión mediante el bloqueo de la fusión (Schiavo et al., 2000). Esta consecuencia sólo era compatible con el almacenamiento cuantal del neurotransmisor en SVs. Más Las funciones de dichas proteínas del complejo SNARE, las sinaptotagminas, las complexinas, la Munc18 y la Munc13 se establecieron en las distintas fases de la exocitosis, qué proteínas están implicadas, cómo interaccionan entre ellas y su dependencia del Ca^{2+} y del ATP (Jahn and Fasshauer, 2012; Sudhof and Rizo, 2011). También se ha profundizado en el estudio de la regulación de los últimos pasos de la exocitosis y se han descrito diversos mecanismos que modifican la cinética de la liberación y la cantidad del contenido secretado como el NO y el AMPc (Machado et al., 2001; Machado et al., 2000).

La comprensión de la transmisión neuronal fue además facilitada en gran parte por medio de la posibilidad de aislar SV de gran pureza a partir de cerebros empleando fraccionamiento subcelular (Huttner et al., 1983). Por medio de este método se cuantificó el contenido en neurotransmisores de las SVs, observándose unos niveles muy superiores de estas sustancias a las que se encuentran en el citosol. Un ejemplo de ello fue la cuantificación de las CAs en los gránulos cromafines a altísimas concentraciones, próximas al rango molar (Winkler and Westhead., 1980). Además, esta aproximación no sólo permitió la identificación de proteínas clave localizadas en la vesícula sináptica (Sudhof et al., 1987) y necesarias para su función sino que también facilitó la investigación sobre los mecanismos de carga y la especificidad de los transmisores (Takamori et al., 2006). Gracias a los amplios avances en biología molecular y bioquímica de los últimos años, como el uso de la espectrometría de masas para estudios de proteómica, se han realizado modelos de la composición proteica de gránulos cromafines bovinos (Wegrzyn et al., 2007), de vesículas secretoras humanas provenientes de feocromocitoma

(Gupta et al., 2010), de vesículas sinápticas (Takamori et al., 2006) o de gránulos cromafines de ratón (Díaz-Vera et al., 2012). Uno de estos avances recientes es el descubrimiento del transportador vesicular de nucleótidos (VNUT) (Sawada et al., 2008).

Con el desarrollo de las técnicas electrofisiológicas pudo ser detectada la adición de la membrana de la vesícula por las medidas de capacidad de la membrana celular (Neher and Marty, 1982). Pero no fue hasta a partir de los años 90 cuando el avance tecnológico permitió realizar las mediciones directas y a tiempo real de la liberación química de la exocitosis de la forma cuantal que Bernard Katz había descrito 40 años atrás. Empleando células cromafines pudo ser detectada la secreción de las CA de una única SV (Leszczyszyn et al., 1990; 1991). La exocitosis además podía ser registrada tras la estimulación con un secretagogo (Wightman et al., 1991).

Adicionalmente, la combinación de técnicas de patch-clamp y amperométricas demostraron de forma indiscutible, por la detección combinada de la fusión de SVs por medidas de capacidad y de corriente amperométrica, la hipótesis de liberación por exocitosis (Álvarez de Toledo et al., 1993). Más recientemente se han logrado realizar mediciones amperométricas en regiones discretas de membrana, aisladas por una pipeta de patch-clamp, registrando simultáneamente el mismo evento excitotóxico: la fusión de la vesícula y la liberación de neurotransmisor (Albillos et al., 1997). Otra técnica electrofisiológica, la voltametría cíclica, permitió por medio de la aplicación de rampas de voltaje por un microelectrodo colocado sobre una célula, la identificación de los transmisores a modo de “huellas dactilares” por su comportamiento a la oxidación-reducción. Esto permitió medir la concentración de las moléculas secretadas (Pihel et al., 1996). De forma paralela se han ido desarrollando nuevas aplicaciones amperométricas como la de pulso diferencial (Faulkner, 2000) o la cronoamperometría (Nowinski et al., 1989).

Durante los últimos años, se ha tratado de responder a una multitud de preguntas fundamentales para poder comprender la exocitosis, entre ellas, ¿Cómo ocurre la biogénesis de las SVs?, ¿De qué manera está controlado el relleno de neurotransmisores?, ¿De qué forma ocurre el transporte de las SVs hacia las zonas de la membrana plasmática donde

van a ser fusionadas?, ¿Cómo ocurre el mecanismo de fusión entre membranas plasmática y vesicular?, ¿De dónde proviene el Ca^{2+} que induce de la fusión de membranas?, o ¿Cómo las SV adquieren la competencia para ser liberadas?.

La aplicación de los métodos descritos junto con las aproximaciones moleculares han permitido definir un esquema del ciclo de una vesícula secretora y de los mecanismos que gobiernan su biogénesis, el relleno con neurotransmisores hasta la fusión con la membrana celular y su reciclado (Jahn and Fasshauer, 2013), permitiendo así responder a muchas de la preguntas, planteadas incluso desde los tiempos de Katz.

1.3. La médula adrenal y las células cromafines.

La glándula adrenal es un órgano par que se localiza anatómicamente encima de los riñones y que a su vez está constituido por dos órganos que co-existen espacialmente pero con grandes diferencias tanto a nivel funcional como de origen embriológico: la corteza y la médula adrenal. En la médula adrenal se encuentran primordialmente las células cromafines, que producen y secretan CA, esencialmente la adrenalina (A) y la noradrenalina (NA). En una situación de estrés agudo o miedo, durante el ejercicio físico violento o ante una amenaza, las células cromafines, a través de la inervación por fibras preganglionares simpáticas, principalmente de nervios espláncnicos colinérgicos, liberan estos transmisores por exocitosis a la circulación sanguínea. La acción de estas moléculas sobre los receptores específicos produce efectos importantes como el aumento de la aceleración del ritmo cardíaco, vasoconstricción, broncodilatación y/o cambios metabólicos que están conducidos a suplir las demandas de oxígeno o la correcta perfusión de los tejidos corporales permitiendo reaccionar al cuerpo ante una situación de *lucha o huida*.

Por otro lado, la corteza de la adrenal se compone de varios tipos celulares que se encargan de la fabricación de esteroides que, secretados al torrente sanguíneo cumplen diversos efectos endocrinos. No obstante, también cumplen una función paracrina sobre la médula adrenal (Bornstein et al., 1997). Su función sobre las células cromafines está involucrada en la secreción, promoviendo la producción de CAs y evitando la diferenciación morfológica de estas células ya que se ha demostrado que las células

cromafines en cultivo, eventualmente generan procesos con características similares a las neuritas que son inhibidos por la adición de esteroides al medio de cultivo celular (Trifaró et al., 1980).

Las células cromafines de la médula adrenal comparten un origen embriológico con el sistema nervioso simpático, ya que al igual que éste proviene del neuroectodermo. Algunos de los progenitores neuronales provenientes de la cresta neural originan el sistema simpático, mientras que otros migran e invaden la corteza suprarrenal dando lugar a la médula. Más tarde, como consecuencia de la actividad de diversos factores de crecimiento, las células se diferencian formando un tejido endocrino que sintetiza CAs. Por su origen y su ubicación se le considera un ganglio simpático modificado (Díaz-Flores et al., 2008) y las células cromafines que lo componen, neuronas modificadas que no poseen axones y liberan sus productos de secreción directamente al torrente sanguíneo actuando como neurohormonas.

Al igual que en los ganglios simpáticos, las células cromafines son estimuladas por terminales colinérgicas preganglionares del sistema simpático, en concreto por el nervio esplácnico. Las células se organizan en racimos pericapilares a los que liberan los productos de secreción (Díaz-Flores et al., 2008). Los terminales axónicos del esplácnico liberan ACh sobre las células cromafines, las cuales poseen receptores colinérgicos a los que se une con alta afinidad. Estos receptores son de dos tipos principales: nicotínicos y muscarínicos. Los primeros son receptores de tipo ionotrópico y los que más frecuentemente estimulan la secreción en las células cromafines. No obstante, los receptores muscarínicos, son de tipo metabotrópico y están acoplados a proteínas G también contribuyen a la secreción de las CAs.

Cuando el receptor nicotínico es activado por la ACh, liberada desde las terminales neuronales, este canal aumenta su permeabilidad a cationes, principalmente Na^+ , originando una despolarización en la membrana que conlleva al disparo de potenciales de acción (PA). Como consecuencia, se activan canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCDV) en la membrana plasmática y se produce la entrada de Ca^{2+} que desemboca en la exocitosis de las vesículas secretoras que contienen las CAs y otras sustancias activas.

1.3.1. Las células cromafines: un modelo esencial para el estudio de la exocitosis.

Debido a que la liberación de CAs es un proceso dependiente de Ca^{2+} , a que además tienen un origen común con las neuronas simpáticas y a su fácil aislamiento y mantenimiento en cultivo (Livett; 1984), las células cromafines se han usado ampliamente en la investigación del acoplamiento de la estimulación-secreción, que son las bases de la neurosecreción. Al ser células excitables, disparan PA que abren los canales de Ca^{2+} de la membrana y permiten la entrada de iones hacia el interior celular, obteniendo como resultado la estimulación o disparo de la exocitosis (García et al., 2006) generando la posterior liberación del contenido vesicular (Augustine and Neher, 1992).

En cuanto a la maquinaria excitotóxica, en las células cromafines se ha descrito la presencia de la gran mayoría de las proteínas involucradas en la secreción que se identificaron en zonas activas de las terminales sinápticas (Roth and Burgoyne RD, 1994; Hodel et al., 1994; Morgan and Burgoyne, 1995; Gerber and Sudhof, 2002; Burgoyne RD and Morgan, 2003; Sørensen et al., 2006).

Respecto a las diferencias entre las neuronas y las células cromafines, una muy importante es grado de acoplamiento entre el estímulo y la secreción. Mientras que en las neuronas los canales de Ca^{2+} y las vesículas están altamente acoplados en zonas activas, permitiendo una rápida y eficiente liberación de los neurotransmisores, la secreción de hormonas desde las células cromafines se vierte directamente al torrente sanguíneo, lo cual actúa como paso limitante en el proceso de señalización. De hecho, mayoritariamente, la secreción desde las células cromafines ocurre mucho más lenta que en las terminales nerviosas (Chow et al., 1992; Chow et al., 1994; Seward et al., 1995). De cualquier modo, frente a una situación de estrés, estas células liberan las CAs en pocos segundos, por lo que el acople estímulo-secreción en estas células puede considerarse una situación intermedia entre neuronas y otras células endocrinas (García et al., 2006).

Las CAs tienen funciones como hormonas y como neurotransmisores y son sintetizadas en las células cromafines de la médula adrenal, en las

neuronas simpáticas postganglionares, en el sistema nervioso simpático y en el sistema catecolaminérgico del sistema nervioso central (Kvetnansky et al., 2009). En los gránulos cromafines se han descrito la adrenalina, la noradrenalina y la dopamina, y deben su nombre al grupo catecol (3,4-dihidroxifenilo) y al grupo amina común a todas ellas. Así, estudios fundamentales sobre la síntesis de catecolaminas, almacenamiento y liberación de las mismas llevados a cabo en estas células, pueden extrapolarse como mecanismos básicos de neurotransmisión en el Sistema Nervioso Central (SNC) y Sistema Nervioso Periférico (SNP).

Además, los cultivos de células cromafines bovinas son altamente eficientes generando grandes cantidades de células bastante homogéneas. El tamaño de estas células es mayor que la mayoría de las neuronas y adoptan una geometría esférica en cultivo que permiten la fácil aplicación de técnicas electrofisiológicas como el patch clamp (Neher y Marty., 1982), las medidas de capacidad (Gillis, 1995) o la amperometría (Wightman et al., 1991).

Entre los numerosos ejemplos de cómo las células cromafines han servido como modelo neurobiológico está el primer aislamiento de organelas secretoras (Blaschko et al., 1953), el descubrimiento de la dependencia de la actividad v-ATPasa de las SVs (Njus and Radda., 1978), o el conocimiento de la existencia de grupos vesiculares (Neher y Zucker., 1993; Rettig y Neher., 2002; Sørensen et al., 2004). Otra aportación de la mano de las cromafines fue la evidencia de la fusión de forma simultánea a la detección del transmisor (Albillos et al., 1997) y la identificación y descripción de los componentes de la maquinaria excitotóxica.

Por todos estos motivos, las células cromafines han sido y siguen siendo un modelo celular apropiado para comprender los mecanismos que permiten y regulan la excitación.

1.3.2. La ruta de biosíntesis de las catecolaminas.

Las CAs son sintetizadas a partir del aminoácido precursor L-tirosina. La enzima citoplasmática tirosina hidroxilasa (TH) convierte la L-tirosina en L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) hidroxilando el anillo fenólico de la L-

tirosina. Se trata de un aminoácido hidroxilasa que requiere de los siguientes cofactores: O_2 , Fe^{2+} y tetrahidrobiopterina. En condiciones fisiológicas normales esta reacción es el paso limitante de la ruta biosintética (Levitt et al., 1965) ya que la actividad de esta enzima es de unas 100 a 1000 veces inferior al resto de las enzimas de la ruta. La TH está muy regulada tanto a corto como a largo plazo. A corto plazo es inhibida por los catecoles (retroalimentación negativa), es activada por diversos efectores como los glucocorticoides, el AMPc, la nicotina y las hormonas esteroideas y también puede ser fosforilada por diversas kinasas (Daubner et al., 2011). A largo plazo puede ser regulada a nivel transcripcional, post-traduccional y epigenético (Lenartowski and Goc, 2011).

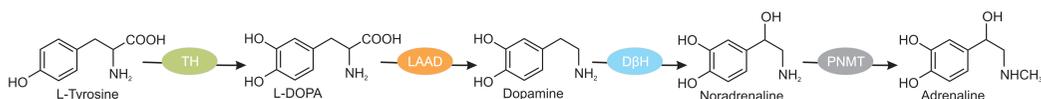


Figura 1.1. Ruta biosintética de las catecolaminas.

El paso siguiente es catalizado por la DOPA descarboxilasa o L-aminoácido-aromático-descarboxilasa (LAAD) que mediante la descarboxilación de la L-DOPA sintetiza la DA también en el citoplasma. El cofactor imprescindible de esta enzima es el fosfato de pirodoxal cuyos niveles influyen directamente en la actividad de dicha enzima. Esta enzima no es específica de tejido catecolaminérgico, ya que interviene en la síntesis de otros neurotransmisores como la 5-hidroxitriptamina o serotonina (5-HT).

La DA es introducida en el interior de las vesículas por medio de los transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs) (fig. 1.7). Si la célula es dopaminérgica, la síntesis se interrumpe aquí. En las células adrenérgicas y noradrenérgicas el tercer paso de la ruta ocurre el interior del gránulo, mediado por la dopamina-β-hidroxilasa (DβH), que tiene una forma soluble y otra forma anclada a la membrana del gránulo, esta enzima cataliza la hidroxilación de la dopamina en posición β, dando lugar a la NA.

Sólo en las células que sintetizan A se expresa la feniletanolamina-N-metil-transferasa (PNMT), enzima que cataliza la conversión de la NA en A

mediante la adición de un grupo metilo. Esta enzima se encuentra en el citoplasma con lo que la NA debe salir de los gránulos para ser metilada y convertida en A. Esta última será de nuevo transportada al interior de los gránulos para su almacenamiento y posterior liberación (Kvetnansky et al., 2009).

1.3.3. Tipos de células cromafines.

No siempre co-existen las cuatro enzimas en la misma célula, la ruta estará completa en las células que sintetizan A. Las que carezcan de PNMT sintetizarán NA y las que carezcan de D β H y PNMT serán células dopaminérgicas. Así, en las médulas adrenales de los mamíferos, las células cromafines se distribuyen en grupos homotípicos de acuerdo con su fenotipo y la proporción relativa de ambos subtipos celulares depende de la especie animal: en el hámster prácticamente no existen células adrenérgicas, en la vaca o el hombre hasta un 60-80% son de fenotipo adrenérgico, mientras que en el gato existen ambos tipos celulares en una proporción similar.

Al margen de las diferencias en las CA que almacenan en sus SV, la expresión de receptores sobre la superficie celular varía entre células adrenérgicas y noradrenérgicas. Así, los receptores muscarínicos o de angiotensina II se expresan preferencialmente en las células adrenérgicas o los subtipos de receptores opioides se expresan de forma diferencial (Aunis and Langley K., 1999). Otros trabajos también demuestran que las isoformas del transportador de monoaminas VMAT-1 y VMAT-2 aparecen separados en las células que acumulan A o NA (Tillinger et al., 2010). Asimismo, los trabajos del Dr. Enrique Castro mostraron una distribución diferencial funcional de los receptores P2 entre las células adrenérgicas y noradrenérgicas (Tomé AR et al., 2007). Por tanto, estas evidencias sugieren que las diferencias entre los dos fenotipos celulares están lejos de ser explicados por la presencia o no de una enzima citosólica que media la conversión de NA a A.

1.3.4. Los gránulos cromafines.

Las CAs producidas en las células cromafines son acumuladas dentro de estructuras membranosas denominadas gránulos o vesículas

cromafines. Éstos son orgánulos secretores especializados, que también se denominan vesículas de núcleo denso grande (LDCV) debido a la matriz muy electrodensa que se observa por microscopía electrónica.

Cada célula cromafín contiene entre 10.000-20.000 gránulos, lo que supone, aproximadamente, del 13 al 30% del volumen del citoplasma (Crivellato et al., 2008). Sin embargo, la cantidad total de vesículas secretoras liberables estimada por medio de técnicas fisiológicas no coincide con el número total de vesículas determinado por estudios morfológicos (Vitale et al., 1995). Las SVs realmente liberables sólo comprenden entre 2.000 a 6.000 vesículas (Phillips et al., 1983; Heinemann et al., 1993; Carmichael and Winkler, 1985).

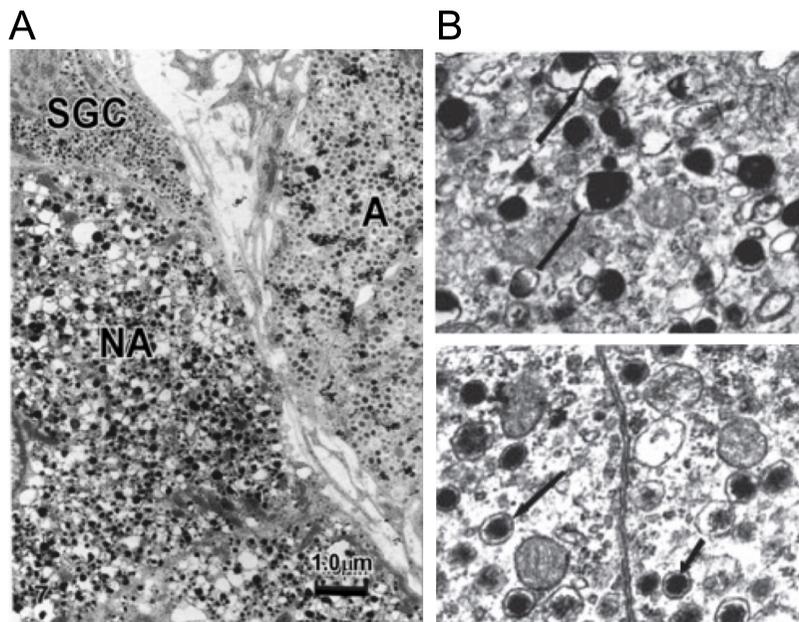


Figura 1.2. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión con los tipos de células y gránulos cromafines. A. (Tomado de Kobayashi 1993). “NA” indica una célula noradrenérgica, “A” una célula adrenérgica y “SGC” una célula cromafín de gránulos pequeños. B. Micrografías electrónicas de gránulos noradrenérgicos y adrenérgicos. En el *panel superior*, las flechas indican gránulos típicamente noradrenérgicos con el núcleo muy electrodenso y excéntrico y el halo amplio. En el *panel inferior*, las flechas indican gránulos típicos adrenérgicos, de menor tamaño, matriz menos electrodensa y halo reducido (Tomado de Díaz-Flores 2008).

La microscopía electrónica ha mostrado que hay diversidad de tamaño, forma y densidad en los gránulos cromafines (Diaz-Flores et al., 2008). Su aspecto tras la fijación con glutaraldehído y postfijación con tetraóxido de osmio es dependiente de su contenido en aminas. Los gránulos que contienen adrenalina aparecen menos electrodensos ya que la adrenalina difunde por acción del fijador, mientras que la noradrenalina precipita proporcionando una apariencia más electrodensa a los gránulos que la contienen (Coupland and Hopwood, 1966).

Se estimó que el número de SVs que contienen A es ≈ 17.000 , que corresponde al 71% de vesículas secretoras y cuyo diámetro varía entre 170 a 350 nm y presentan morfología circular, electrodensidad moderada con un contenido interior granulado y un halo que suele ser reducido y uniforme (fig. 1.2; B, *panel inferior*). Mientras, las que contienen NA son ≈ 7.000 (Vitale et al., 1995), tienen un diámetro mayor, entre 185 y 495 nm, poseen morfología irregular, forma ovalada o elíptica, un núcleo denso excéntrico y un halo amplio (Diaz-Flores et al., 2008), (fig. 1.2; B, *panel superior*). No obstante, estas características dependen de la especie, ya que han sido descritas variaciones.

La composición y contenido de estos orgánulos ha sido objeto de estudio desde que se descubriera su existencia a mediados del siglo pasado. A partir de aquel momento se realizaron trabajos describiendo su contenido (Apps, 1997; Winkler, 1993), que de forma añadida a las cantidades enormes de CAs estimadas (Kopell and Westhead, 1982), se complementaban con altas concentraciones de ATP, proteínas como la cromogranina (Cg) (Helle et al., 1965; O'Connor y Frigon, 1984), y péptidos menores como el neuropéptido Y y las encefalinas (Lewis et al., 1979; Viveros et al., 1979).

Recientemente, haciendo uso de técnicas de proteómica se ha determinado el contenido proteico de los gránulos cromafines (Hook et al., 2010; Wegrzyn et al., 2007). Dichas proteínas se han agrupado según su función en: prohormonas, proteasas, ATPasas, proteínas estructurales, proteínas involucradas en reacciones redox, regulación del Ca^{2+} , componentes de señalización, proteínas que participan en los mecanismos que conducen a la exocitosis y proteínas transportadoras de los

transmisores. Sin embargo, otras muchas proteínas descritas como componentes de las SV aún tienen funciones que se desconocen.

1.3.5. Un modelo de vesícula secretora.

Para comprender la esencia de la neurotransmisión, es fundamental imaginarnos la organela clave en este proceso, la vesícula secretora y los elementos que la componen. La imagen que ilustra una vesícula promedio y que más compartida ha sido por los científicos en los últimos años es un modelo molecular que publicó el Dr. Shigeo Takamori en el año 2006 (Takamori et al., 2006) en el que se puede observar la complejidad de la composición de las SVs. A pesar de que este modelo representa los componentes de las vesículas sinápticas, podríamos tomarlo como similar al de los gránulos cromafines, ya que la maquinaria excitotóxica de estos últimos ha sido comúnmente identificada en las terminales sinápticas (Roth and Burgoyne, 1994; Sørensen et al., 2006). La imagen que se muestra en la figura 1.3 representa una vesícula secretora promedio en la que los componentes proteicos pueden ser divididos en 3 grupos funcionales fundamentales y que iremos describiendo a lo largo de esta intriducción:

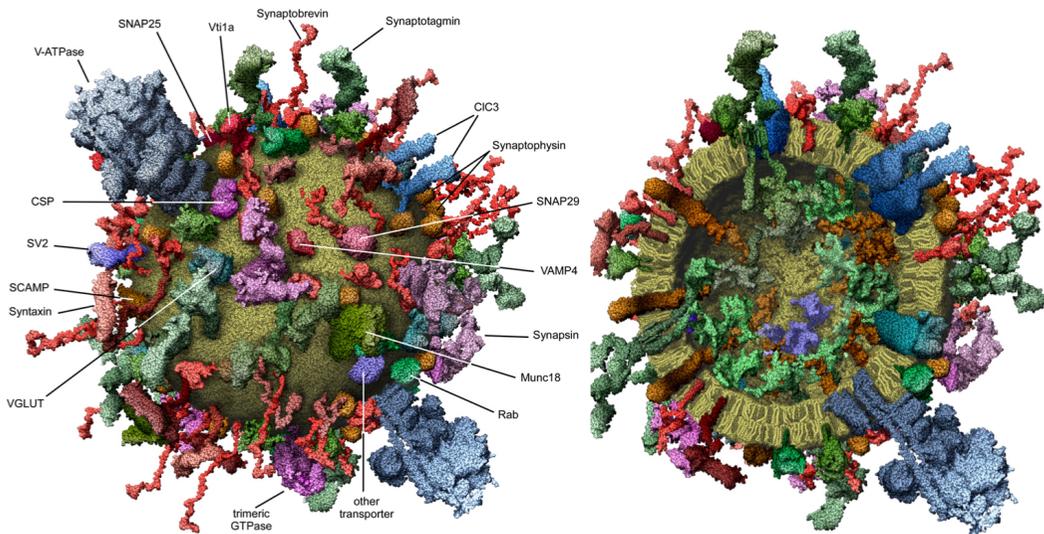


Figura 1.3. Modelo molecular de una vesícula sináptica media. Vista desde fuera y de una sección media (Tomado de Takamori et al. 2006).

Primero, las vesículas están equipadas con componentes de tráfico que aseguran la localización apropiada para la fusión y el reciclaje. Entre ellas están las Rabs, las sinapsinas y las SNAREs.

El segundo grupo es el involucrado en la fusión de la SV con la membrana plasmática ante una señal de disparo de Ca^{2+} . Se estiman ≈ 70 moléculas de sinaptobrevina formando el complejo con las proteínas SNARE de la membrana plasmática SNAP-25 y syntaxina-1. La otra proteína importante en este contexto es la sinaptotagmina, la proteína sensora de Ca^{2+} para la liberación sincrónica de los transmisores (Fernandez-Chacon et al., 2001). La sinaptotagmina contiene dos dominios de unión de Ca^{2+} que permiten la interacción con bicapa lipídica por medio de las cabezas fosfolipídicas. Esta interacción permite el acercamiento de las membranas opuestas produciendo la fusión definitiva de las membranas.

El tercer grupo de proteínas residentes en las SVs y en el que haremos especial atención para el desarrollo de esta tesis, es el responsable de la carga de los neurotransmisores del que haremos especial atención en el apartado 1.6.

1.4. El ciclo de vida de una vesícula secretora.

El ciclo de una vesícula secretora puede ser dividido en 3 eventos principales (fig.1.4): La carga de las SVs con los neurotransmisores, la fusión con la membrana plasmática o exocitosis y el reciclado y cierre del ciclo mediado por la endocitosis. Sin embargo, son muchas más las etapas que ocurren desde la formación de una vesícula hasta su fusión con la membrana plasmática y posterior reciclado. A continuación haremos un repaso de estos eventos, haciendo referencia a los hallazgos más importantes que han dado luz a los pasos claves que definen la vida de una vesícula secretora. Para describir los mecanismos que permiten el relleno de transmisores en las SVs dedicaremos un apartado que se desarrollará más adelante.

La formación de las vesículas ocurre en el retículo endoplasmático rugoso (RER), donde las proteínas que van a formar parte de las SVs son sintetizadas en los ribosomas que lo tapizan. Las vesículas derivadas del

RE viajan a través del aparato de Golgi hasta llegar a la red trans-Golgi (TGN) donde ocurre la biogénesis de los gránulos secretores o **granulogénesis** (Huttner and Natori, 1995). Para que las vesículas sintetizadas *de novo* sean clasificadas como organelas de la secreción regulada ocurren mecanismos que las separan de las de la vía constitutiva. Se han propuesto dos procesos principales que barajan la posibilidad de una clasificación o *sorting* desde la TGN (modelo de *sorting for entry*; fig 1.4; A), mediada por receptores desde la membrana del aparato de Golgi capaces de unirse a proteínas de secreción regulada, como las cromograninas (Mahapatra et al., 2005; Dominguez et al., 2014), o desde el gránulo inmaduro (modelo de *sorting by retention*; fig. 1.4; B), en el que las vesículas secretoras de diferente naturaleza se forman por la distribución y retención de su contenido hasta su escisión posterior (Arvan and Castle, 1998; Bartolomucci et al., 2011).

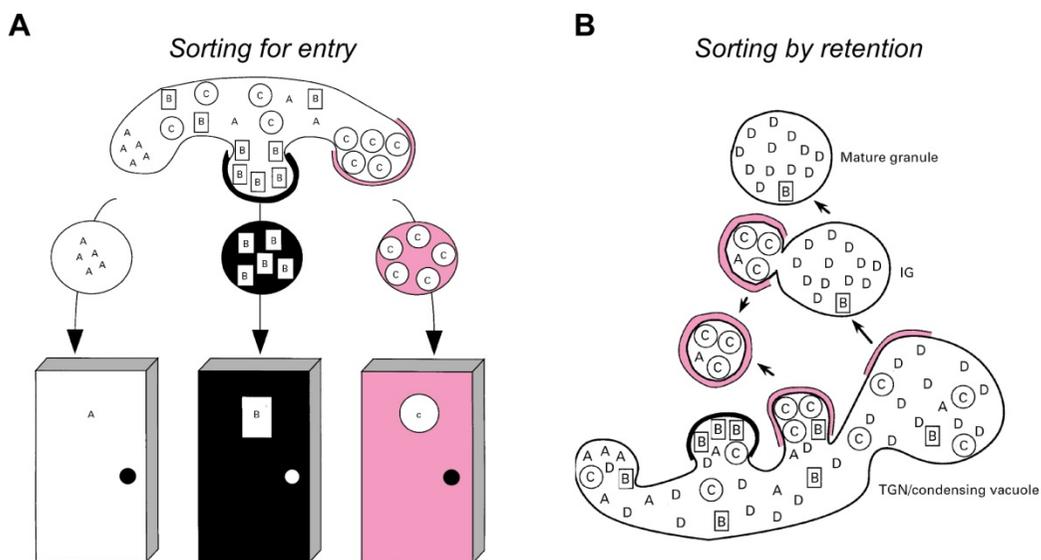


Figura 1.4: Esquema de los dos modelos del proceso de granulogénesis y clasificación de gránulos. A. En el modelo de *sorting for entry*, las proteínas son clasificadas y empaquetadas en cada tipo de gránulo en un mecanismo mediado por receptor. **B.** En el modelo de *sorting by retention* el contenido definitivo del gránulo maduro depende de la capacidad de retención/condensación de las proteínas involucradas, aquellas que no son retenidas se excluyen por escisión de vesículas pequeñas (Tomado de Arvan, 1998).

1.4.1. Los múltiples pasos de la exocitosis.

Con la granulogénesis, se generan SV inmaduras que van a atravesar un proceso de **acidificación**. La acción de una bomba de protones V-ATPasa (fig. 1.5, paso 1) dependiente del ATP citosólico, permite el establecimiento de un gradiente electroquímico que utilizan los transportadores vesiculares para el **rellenado con los transmisores** al interior granular, en contra del gradiente de concentración (fig. 1.5, paso 2).

Al transporte de las vesículas secretoras a la membrana plasmática se le conoce como la etapa de **reclutamiento o translocación** de vesículas (fig. 1.5, paso 3). Este proceso requiere la reorganización del citoesqueleto para movilizar los gránulos hacia las zonas cercanas a la membrana plasmática (Trifaro et al., 2008) y depende de las concentraciones citosólicas de ATP y de Ca^{2+} . Los trabajos más recientes demuestran la existencia de maquinarias glicolíticas de producción de energía “a bordo” de las vesículas sinápticas de manera que puedan ser reclutadas a través de los largos axones de forma independiente a los niveles de ATP citosólico (Ikemoto et al., 2003; Zala et al., 2013). Para los gránulos secretores esta teoría no está, bajo nuestro conocimiento, explorada.

Posteriormente ocurre el **anclaje** a la membrana plasmática que es el paso que se debe cumplir para que una vesícula pueda fusionarse y en el cual las vesículas se aproximan a la membrana plasmática estableciendo contacto con ésta (fig.1.5, paso 4). La definición de este proceso presenta contradicciones en la literatura, ya que algunos autores aplican definiciones morfológicas, y otros definiciones moleculares. Las primeras se basan en estudios de microscopía electrónica y se refieren a las vesículas que se encuentran próximas a la membrana plasmática, a una distancia inferior a 200 nm (Ashery et al., 2000).

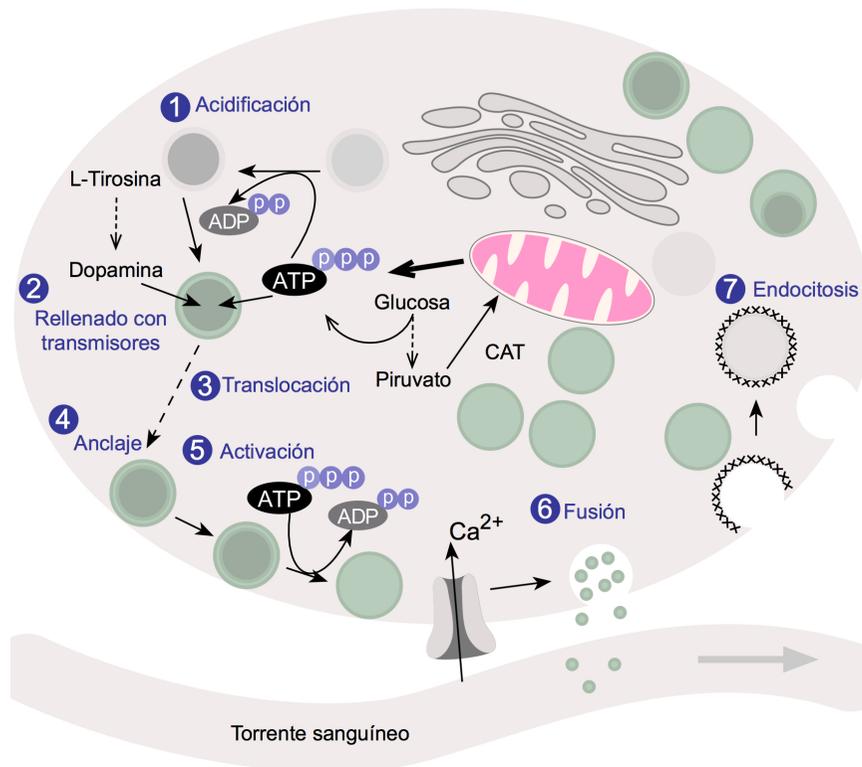


Figura 1.5. Esquema de las etapas de la exocitosis. Las vesículas inmaduras sintetizadas en la cara *trans* del Golgi son acidificadas (1) por la acción de una bomba de protones V-ATPasa que permite establecer el gradiente electroquímico necesario para el relleno con transmisores (2). Las SVs son reclutadas (3) hacia la membrana donde ocurre el anclaje (4) y posterior activación (5) en un proceso dependiente de ATP. La entrada de Ca^{2+} desencadena la fusión (6) de la vesícula con la membrana plasmática. La endocitosis ocurre como mecanismo de recuperación de membrana.

Sin embargo, dado que las células cromafines poseen una enorme cantidad de vesículas, parecería que esta definición es muy poco precisa e involucraría una población muy heterogénea. Otros autores definen que las vesículas ancladas son aquellas en las que ciertas proteínas interactúan con otras de la membrana plasmática, aunque no existe consenso sobre cuáles serían dichas proteínas. En algunos trabajos se postuló que la sinaptotagmina, la syntaxina y la neurexina1 intervendrían en el anclado (Pevsner and Scheller, 1994). Mientras que trabajos más recientes, utilizando ratones transgénicos, aportaron evidencias que sugieren que la Munc18 y la syntaxina serían también candidatos para este proceso

(Sørensen et al., 2003; Borisovska et al., 2005). Otras proteínas que estarían involucradas en el anclado de las vesículas a la membrana son la Rab3 y la proteína RIM (*Rab3-interacting molecule*) (Sudhof, 2004). En particular, en células cromafines, se describió que Rab3 promueve el anclado de las vesículas a la membrana plasmática (Van Weering et al., 2007).

Tras el anclaje, las SVs deben atravesar un proceso de **activación** (o *priming*) (fig. 1.5; paso 5). Se sugiere la presencia de este estado de activación fundamentalmente ya que tras un estímulo repetitivo la exocitosis vesicular disminuye en ausencia de ATP citosólico (Parsons et al., 1995). La interpretación más aceptada de este resultado se basa en que las vesículas que no están preparadas para fusionarse después del anclaje necesitan pasar por un estado de activación que es limitante. Se ha sugerido que el paso de activación podría iniciar la exocitosis llevando a cabo un proceso parcial de fusión y en este punto, las vesículas se detendrían esperando una señal de Ca^{2+} . En este proceso las vesículas ya ancladas adquieren la capacidad de fusionarse frente a una señal de Ca^{2+} apropiada. El *priming* es un proceso complejo que involucraría varios pasos, y que según el consenso general, requiere ATP (Holz et al., 1989; Xu et al., 1998). Este proceso lleva finalmente a ensamblaje del complejo SNARE, que es el complejo proteico involucrado en la fusión. La formación del complejo SNARE implica la interacción entre proteínas de la membrana plasmática (t-SNARE) y de la membrana vesicular (v-SNARE) (Jahn and Sudhof 1999; Chen and Scheller 2001; Bruns and Jahn, 2002; Rizo and Sudhof, 2002; Fasshauer, 2003). En neuronas y en células neuroendocrinas, el v-SNARE es la sinaptobrevina, la cual forma un complejo estable con las t-SNAREs, SNAP-25 y syntaxina, que se ubican en la membrana plasmática. La cristalización del complejo SNARE reveló la existencia de cuatro α hélices, una de syntaxina, una de sinaptobrevina y dos de SNAP-25 (Sutton et al., 1998). Diversas proteínas accesorias están involucradas en la regulación, reciclado, y/o formación del complejo SNARE, como NSF, SNAP, Munc13, Munc18 y otras.

Una de las primeras etapas del *priming* consiste además en el reciclado de los complejos SNARE que han sido ya utilizados. Este es un proceso dependiente de ATP en el que intervienen las proteínas NSF y

SNAP. La NSF es una chaperona que utilizando la energía de hidrólisis del ATP y a la SNAP como cofactor catalizaría el proceso que promueve el desarmado de los complejos SNARE después de un proceso de exocitosis previo. Esto permitiría la reutilización de las proteínas SNARE en un nuevo proceso de fusión (fig. 1.6), (Söllner et al., 1993; Kibble et al., 1996).

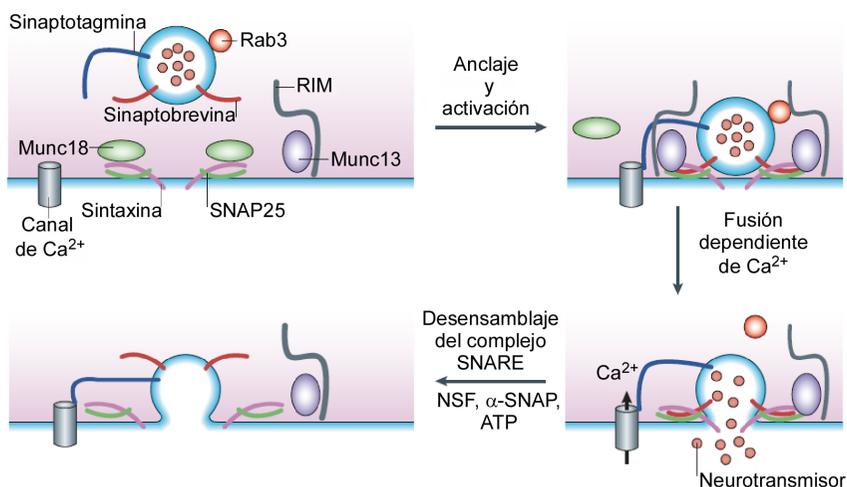


Figura 1.6. Esquema del proceso de anclaje y fusión. El complejo SNARE acerca las membranas venciendo las fuerzas electrostáticas y posibilitando la fusión (Modificado de Gundelfinger 2003).

Durante la activación o *priming* ocurren diversos eventos que conducen finalmente a la ubicación y alineación de las proteínas del complejo SNARE, favoreciendo la interacción de los componentes entre sí. El complejo así formado sufre un proceso activo desde el punto de vista energético conocido como *zippering* (cremallera) que permite la aproximación de la membrana de la SV con la membrana plasmática. La aproximación íntima de las membranas aumenta marcadamente la probabilidad de fusión entre ambas llevando a la formación de un poro de fusión (Han et al., 2004), que se establece entre los medios extracelular e intracelular.

El paso de **fusión** de la vesícula secretora (fig. 1.5; paso 6), ocurre tras el cambio de voltaje a través de la membrana que permite la apertura de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje y el aumento intracelular del Ca²⁺ en pocos milisegundos. En el caso de la exocitosis regulada por Ca²⁺, los eventos de anclaje y activación son etapas necesarias para que las vesículas alcancen el estado de maduración final y poder estar

preparadas para fusionarse. Sin embargo, la fusión vesicular ocurrirá solamente con alta probabilidad cuando el aumento citosólico de Ca^{2+} , sin intervención del ATP, supere cierto valor umbral (1-10 μM) en la región próxima a las vesículas (Sugita, 2008). Asimismo, de forma no fisiológica, otros cationes divalentes como el Ba^{2+} ó el Sr^{2+} pueden entrar por los mismos canales que el Ca^{2+} y promover la liberación. El Ba^{2+} es utilizado frecuentemente como secretagogo en amperometría con objeto de resolver temporalmente cada evento exocitótico (Machado, 2008). En la célula cromafín la entrada del Ca^{2+} va a estar fundamentalmente mediada por los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes que se abren en respuesta a la despolarización de la membrana según su umbral de activación: los canales de bajo umbral de activación (LVA) o los canales de alto umbral de activación (HVA) (Garcia et al., 2006).

Estos canales, según su capacidad de activación ante la despolarización, han sido clasificados en dos grupos principales, los canales de bajo umbral de activación (LVA), que se activan a voltajes por encima de los -50 mV y son inactivados rápidamente, y los canales de alto umbral de activación (HVA), que se abren a voltajes superiores (de -30 a -20 mV) y de los que se han identificado cuatro subtipos denominados L, N, P/Q y R (Garcia et al., 2006). La caracterización de la contribución de estos canales en el acoplamiento del estímulo-secreción ha venido de la mano del empleo de múltiples toxinas contra los diferentes subtipos de canales de Ca^{2+} , como la ω -conotoxina, la ω -agatoxina o las dihidropiridinas, que producen un bloqueo abrupto de la exocitosis. Las células cromafines bovinas han sido clave en estos estudios.

La fusión requiere, además de la presencia de las proteínas SNARE, de la existencia de un sensor de este estímulo de elevación del Ca^{2+} . Existe ya un alto grado de aceptación que la familia de las sinaptotagminas es la que cumple esta función (Geppert et al., 1994). En particular para la exocitosis rápida asociada a terminales sinápticas y, aparentemente también, para las vesículas liberables de las células cromafines (Voets et al., 2001), el candidato es la sinaptotagmina-1. En general, la sinaptotagmina es una proteína vesicular que posee cuatro sitios de unión a iones Ca^{2+} , que al ser ocupados por el ion, llevan a la activación de la proteína favoreciendo la unión de ésta a la syntaxina y a ciertos lípidos de

la cara interna de la membrana plasmática. Esto, juntamente con el *zippering* del complejo SNARE, llevaría a la formación del poro de fusión (Sugita, 2008). La finalización de este proceso conduce a la liberación del contenido vesicular, ya sea a la hendidura sináptica, en el caso de neuronas o a la circulación sanguínea, en el caso de las células neuroendocrinas.

1.4.2. La endocitosis y el reciclado de las vesículas secretoras.

Tras la exocitosis suele ocurrir un proceso de endocitosis en el que una porción de membrana plasmática se invagina hacia el interior celular y termina separándose de la membrana formando un endosoma. Esto permite reciclar la membrana plasmática e internalizar moléculas del exterior. La superficie de membrana agregada por la fusión de las vesículas durante la exocitosis es entonces recuperada, devolviendo a las fracciones de membrana plasmática e intracelular sus niveles originales por medio del proceso de endocitosis. Entre la exocitosis y la endocitosis se mantiene un equilibrio regulado que permite la integridad celular.

Además, una vez abierto el poro de fusión la exocitosis puede seguir caminos diferentes. Estos pueden llevar al colapso completo de la vesícula con la membrana plasmática o a un proceso de fusión transitoria. En el primer caso el poro de fusión se expande llevando a una integración total de la membrana vesicular con la membrana plasmática. En cambio, en una fusión transitoria el poro de fusión permanece abierto durante un cierto tiempo, y luego vuelve a cerrarse, llevando a que la vesícula se recupere en el mismo sitio de fusión sin perder su identidad. Con este comportamiento se han descrito tres vías de reciclado de vesículas: dos vías en las que las vesículas permanecen en la zona activa para ser rellenadas (*kiss-and-stay*) o son recicladas localmente sin que ocurra una endocitosis mediada por clatrina (*kiss-and-run*), y una vía más lenta en la que ocurre endocitosis mediada por clatrina (Sudhof, 2004). Estas vías de reciclado rápido han sido descritas en neuronas (Pyle et al., 2000) y también en gránulos cromafines (Albillos et al., 1997).

1.5. Los grupos vesiculares.

Como hemos visto, desde el momento en que es formada hasta que es liberada, una vesícula debe pasar por muchas etapas, comenzando con la biogénesis de la vesícula en el Golgi, siguiendo con su transporte por el citoesqueleto, luego su llenado con sustancias activas a través de transportadores específicos, su disociación del citoesqueleto, el anclado físico a la membrana plasmática y finalmente su activación, por lo que resulta razonable pensar en la posibilidad de encontrar grupos de SV según su estado de maduración dentro de este ciclo.

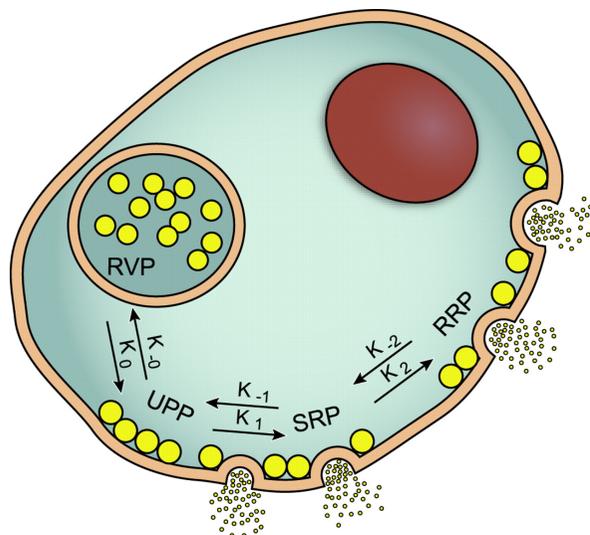


Figura 1.7. Esquema que representa los diferentes grupos de vesículas en una célula cromafín de acuerdo a su preparación para la exocitosis (ver texto). (Tomado de García et al., 2006).

Así, las SV de las células cromafines se pueden clasificar funcionalmente en distintos grupos en base a sus cinéticas de liberación. El primer grupo, el *Readily Releasable Pool* (RRP) o grupo de liberación rápida es fusionado en pocos milisegundos (10-40 ms) ante el aumento de Ca^{2+} intracelular (Neher, 1998; Trifaro et al., 1997) y constituye, del total de SV de la célula, sólo el 1-2%.

El segundo grupo se denomina grupo de liberación lenta (*Slow Releasable Pool*, SRP) (Voets et al., 1999) y comprende las vesículas que son reclutadas con una constante de tiempo de aproximadamente 200 ms

(Becherer and Rettig, 2006). En muchas células los gránulos existen en una variedad de estados intermedios entre estos dos grupos (Burgoyne and Morgan, 2003).

Se ha descrito también un grupo de vesículas inmaduras (*Unprimed Vesicle Pool*, UVP). El cuarto grupo es el de reserva (*Reserve Vesicle Pool*, RVP) y lo constituyen vesículas que no son liberables y que serán reclutadas para pasar al SRP (Garcia et al., 2006). En muchas células, existe una dinámica entre estos estados; las SV pueden permanecer como no liberables o pasar a formar parte de un grupo susceptible de ser liberado después de su reclutamiento para formar parte del grupo de liberación rápida (Burgoyne and Morgan, 2003).

Lo que hoy sabemos es que en general, la exocitosis regulada de los gránulos secretores implica la liberación de sólo una pequeña parte de la población total de gránulos maduros, y por ello en algunos tipos celulares, como las células cromafines, pueden tener un período de vida media muy largo, en ausencia de un estímulo. Es más, los diferentes grupos parecen poder activarse selectivamente dependiendo del secretagogo utilizado (Duncan et al., 2003; Haynes et al., 2007).

1.6. La maduración de la vesícula secretora: gradiente electroquímico, transmisores y transportadores.

1.6.1. Dirigiendo el transporte: la creación de un gradiente de protones electroquímico.

Las vesículas sinápticas y los gránulos secretores almacenan los neurotransmisores a altas concentraciones gracias a un transporte activo o *uptake*, mediado por una bomba de protones (Moriyama and Nelson., 1987; Nelson, 1991), cuya actividad establece un gradiente electroquímico ($\Delta\Psi_{H^+}$) a través de la membrana vesicular (fig. 1.8). Esta bomba de protones (H⁺-ATPasa o V-ATPasa) es un complejo multiproteico de alto peso molecular (≈ 500 KDa) que está formado por, al menos 13 subunidades, y de la que se piensa que constituye $\approx 10\%$ del volumen de la vesícula y se estima que existe en una cantidad relativamente baja de copias (Takamori et al., 2006). La V-ATPasa está compuesta por un complejo llamado V1, orientado hacia el citoplasma, donde se localiza la

actividad de hidrólisis de ATP, ATPasa; y por una parte integrada en la membrana vesicular, llamada V_0 , que media el trasiego de protones del lado citosólico al intravesicular.

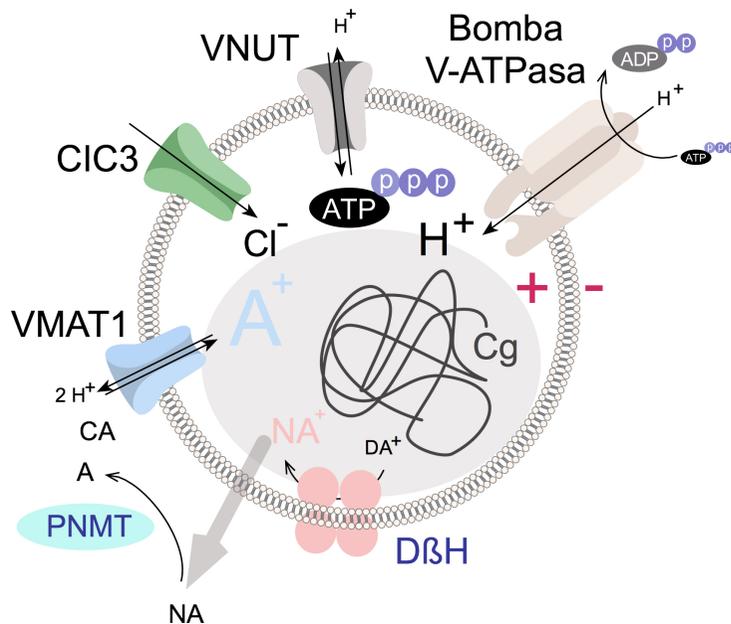


Figura 1.8. Modelo de un gránulo cromafín adrenérgico. El gradiente electroquímico generado por una bomba de protones V-ATPasa es empleado por el transportador de aminas, VMAT-1, y el transportador de nucleótidos, VNUT, para concentrar las CAs (0,8-1 M) y el ATP (120-200 mM) en el interior de los gránulos cromafines. La DA transportada es convertida, por medio de la DβH a NA, cuya salida por difusión a través de la membrana permite la conversión a A en el citosol por la enzima PNMT. La A es entonces transportada de nuevo al interior para ser almacenada a altas concentraciones. Las cromograninas (Cg) son las principales proteínas que forman la matriz intravesicular permitiendo la acumulación de aminas.

Mediante la hidrólisis del ATP, la bomba V-ATPasa construye un gradiente electroquímico de protones que hace que el interior vesicular pueda mantener un pH de $\approx 5,5$. Este gradiente electroquímico es además retroalimentado por la entrada de iones Cl^- a través de canales, fundamentalmente CIC-3 (Matitzen et al., 2008). El Cl^- , al actuar como contraión, favorece la actividad regulada de la V-ATPasa acidificando en mayor medida la cara intravesicular. Este gradiente electroquímico generado es la fuente de energía que emplean los transportadores para la acumulación de los transmisores en el interior de las SVs.

El almacenamiento vesicular y la exocitosis de los neurotransmisores es esencial para la transmisión química en neuronas y en células endocrinas. Las concentraciones que se alcanzan de los transmisores dentro de las SV son altísimas comparadas con las citosólicas, de ahí que varias clases diferentes de transportadores hayan sido descritas como participantes en el relleno o *uptake* de neurotransmisores hacia vesículas sinápticas y gránulos secretores en células endocrinas. Hay transportadores vesiculares de acetilcolina (VACHT), transportadores vesiculares de aminoácidos inhibitorios (VIAAT), transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs) y recientemente se han descrito además el transportador de nucleótidos vesicular (VNUT) (Sawada et al., 2008).

Estos transportadores median la acumulación activa de sus respectivos transmisores a través del gradiente electroquímico de protones de forma común. No obstante, existe una dependencia específica en los requerimientos energéticos de los transportadores: el componente eléctrico ($\Delta\Psi$) y el componente químico (ΔH^+).

1.6.2. VMAT y VNUT median la entrada de transmisores a los gránulos cromafines.

Se estima que el contenido de los gránulos cromafines en CA es de 1,1 a 2,5 $\mu\text{mol/mg}$ de proteína, esto corresponde a una concentración entre 0,5 y 0,6 M y a un número de 3×10^6 moléculas por gránulo (Winkler and Westhead, 1980), otros autores han propuesto que la concentración podría variar en un rango de 0,8-1 M dependiendo de la especie (Albillos et al., 1997; Jankowski et al., 1993; Montesinos et al., 2008). En el interior granular el pH se encuentra entre 5,5 y 5,7, por lo que el 99% de las CA presentes se hallan en su forma protonada (Winkler and Westhead, 1980). Dado el gradiente de concentración que hay que vencer para introducir tal cantidad de CAs, es necesaria la presencia de un transportador; el transportador vesicular de monoaminas (VMAT).

Las vesículas secretoras también son capaces de acumular y secretar ATP. En los gránulos cromafines el ATP podría encontrarse en el orden de 150 mM (Kopell and Westhead, 1982) y aunque se pensaba que el transporte hacia el interior de las vesículas era a través del transportador

de CAs, estudios recientes proponen que existe, como hemos mencionado, un transportador específico para nucleótidos, el VNUT (Sawada et al., 2008).

El número estimado de transportadores de los transmisores vesiculares en cada SV es ≈ 10 (Takamori et al., 2006) y aún se encuentra bajo discusión si la regulación de este número define la carga total o contenido cuántico de transmisores por SV y por lo tanto la regulación de la transmisión (Edwards, 2007).

1.6.2.1. El transportador de monoaminas vesicular (VMAT).

Los VMATs pertenecen a la familia *Slc18* cuyo transporte depende principalmente del gradiente de pH. Estos transportadores translocan 2 H⁺ por cada amina cargada positivamente y este transporte depende, en gran parte, del gradiente de pH (Johnson et al., 1981). Sus sustratos son las aminas biogénicas como la DA, NA, A y 5-HT y fueron originalmente caracterizados en los gránulos cromafines. En éstos se expresa VMAT en las dos isoformas descritas VMAT-1 y VMAT-2 (Erickson et al., 1996). Es la isoforma 1 la que principalmente permite el almacenamiento de monoaminas en unas concentraciones tales que probablemente en el lumen podrían convertirse insolubles y dar origen al núcleo denso característico de estos LDCVs. De hecho, se ha estimado que el gradiente que se alcanza es de hasta 5 órdenes de magnitud con respecto al citoplasma (Henry et al., 1994). Estos transportadores se caracterizan por ser de alta afinidad y eficiencia en el transporte de sus sustratos.

1.6.2.2. El transportador de nucleótidos vesicular (VNUT).

A lo largo de varias décadas, dado que la concentración de nucleótidos en las vesículas se mantiene a concentraciones mucho mayores de las que se encuentran en el citoplasma celular (>100 mM frente a 4 mM), diversos mecanismos de transporte activo para acumular nucleótidos han sido postulados (Currie and Fox, 1996; Weber et al., 1983; Gualix et al., 1996). A pesar de que las evidencias que soportaban la idea de la presencia de un transportador de nucleótidos vesicular, tanto de vesículas sinápticas como de gránulos cromafines, eran cada vez más numerosas, como los estudios bioquímicos clásicos que identificaban una

actividad específica de transporte de concentración de purinas (Luqmani et al., 1981; Gualix et al., 1999), la proteína responsable de la acumulación de ATP no fue identificada hasta hace apenas unos años (Sawada et al., 2008). En este trabajo, los investigadores caracterizaron a la proteína codificada por el gen *Slc17a9*, como el VNUT.

La *Slc17* es una familia de transportadores de fosfato del tipo I que engloba 8 genes que se clasifican en 3 subfamilias: (i) *Slc17a1-4* (NPT1, NPT3, NPT4 y el co-transportador homólogo $\text{Na}^+/\text{PO}_4^{2-}$); (ii) *Slc17a5* (sialina), un co-transportador lisosomal de H^+ /ácido siálico; y (iii) *Slc17a6-8*, transportadores vesiculares de glutamato (VGLUT). La cuarta subfamilia fue asignada a *Slc17a9* en un *screening* del genoma humano que estableció la estrecha relación filogenética con los demás componentes de la familia (fig. 1.9). El gen humano *Slc17a9* se localizó en el cromosoma 20 conteniendo 14 exones y 13 intrones.

Estructuralmente, la proteína humana posee 430 residuos dispuestos en 12 dominios transmembrana putativos con los extremos terminales amino y carboxilo en el citoplasma, como otros miembros de la *Slc17* con los que comparte una identidad del $\approx 23\text{-}29\%$ y similitud de $\approx 41\text{-}48\%$. La mayor divergencia entre las proteínas se produce en los extremos citoplasmático y el primer bucle luminal.

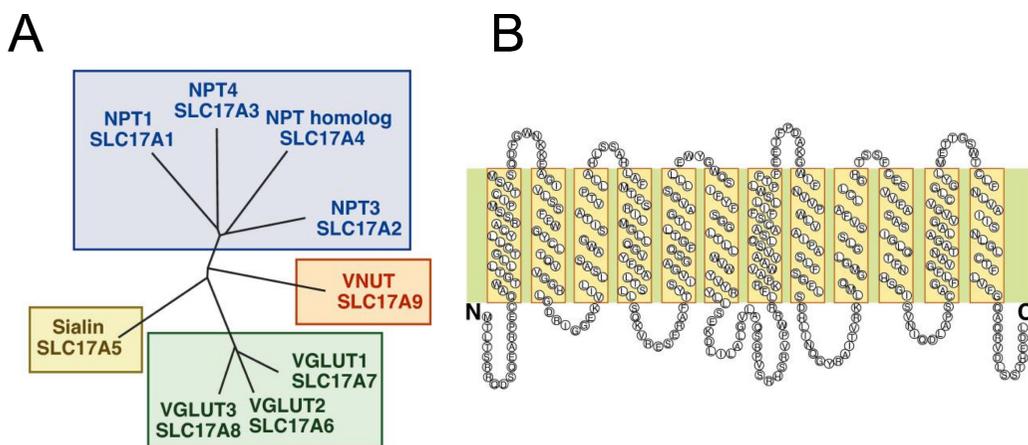


Figura 1.9. Árbol filogenético de la familia *Slc17* (A) y estructura secundaria putativa del VNUT (B). (Tomada de Sawada et al., 2008).

Los ortólogos de otras especies de mamíferos han sido identificadas y aunque la región del extremo N-terminal de la proteína exhibe variación específica de especie, la región restante muestra un alto grado de conservación (83% de identidad). Este dato habla de una larga historia evolutiva de los VNUTs lo que sugiere que los nucleótidos como neurotransmisores son fundamentales para la señalización y que este mecanismo de transporte es probable que haya estado presente ya en los sistemas nerviosos más primitivos (Sreedharan et al., 2010).

La comparación de todas las secuencias *Slc17* a través de especies de vertebrados indica que hay un número de residuos adicionales que están absolutamente conservadas. Muchos de estos residuos residen dentro de los segmentos transmembrana.

En este sentido, algunos trabajos proponen que, dado que todos los eucariotas vivos conocidos tienen vesículas que acumulan ATP, tales como la *Giardia lamblia* (un microorganismo patógeno muy intrigante en que carece de mitocondrias y aparato de Golgi, pero que dispone de gránulos densos que contienen ATP), la conjunción de vesículas que contienen ATP y la exocitosis constitutiva fue probablemente el origen de la neurosecreción en los días en los que la vida comenzó. Modificaciones bioquímicas posteriores sobre la colina, histidina, triptófano o tirosina dieron lugar a gránulos colinérgicos, histaminérgicos, serotoninérgico y la transmisión simpática (Borges., 2012).

En los vertebrados, los nucleótidos se conocen por su funcionamiento como co-transmisores a los transmisores clásicos, como por ejemplo el ácido gammabutírico (GABA) o el glutamato. No obstante, también se ha demostrado que las purinas se secretan en vesículas independientes, pero en sinapsis compartidas con vesículas de otra naturaleza. Los nucleótidos como neurotransmisores funcionales actúan en dos clases de receptores postsinápticos purinérgicos, el P2Y, acoplado a proteína G y los receptores ionotrópicos P2X. Entre éstos, los receptores P2Y tienen la historia evolutiva más corta que la de los P2X. Los receptores P2X se encuentran en las algas, así como en *Dictyostelium discoideum*. Curiosamente, estos receptores parecen haberse perdido de forma independiente tanto en linajes de artrópodos y nematodos. No obstante, sorprendentemente, se ha demostrado que aunque ni artrópodos ni metazoos parecen tener

receptores purinérgicos, al menos no del tipo presente en los vertebrados, estos linajes han conservado una copia única del transportador VNUT.

La expresión de la proteína ha sido identificada fundamentalmente en el cerebro de ratón y humano (Sawada et al., 2008), concretamente en las vesículas sinápticas de las neuronas de la corteza cerebelar, el bulbo olfatorio y el hipocampo (Larsson et al., 2012); en la glándula tiroides y en la médula adrenal (Sawada et al., 2008; Sakamoto et al., 2014) donde se propone que juega un papel vital en el almacenamiento y liberación de nucleótidos. Además, numerosos trabajos recientes han identificado y caracterizado la implicación en el transporte de nucleótidos, principalmente ATP, al interior de los SVs en diferentes tipos celulares como las células epiteliales (Iwatsuki et al., 2009; Sesma et al., 2014), las células pancreáticas secretoras de gránulos de zimógeno (Haanes and Novak et al., 2010) o las células β pancreáticas (Geisler, 2013). Los linfocitos T y las células epiteliales biliares también se ha demostrado que expresan VNUT y su dependencia en la liberación de ATP (Tokunaga et al., 2010; Sathe et al., 2011).

No obstante, también se ha estudiado que el VNUT se expresa y participa en la concentración de ATP no sólo en SVs sino en otra organelas como los lisosomas de las neuronas de los ganglios de la raíz dorsal (Jung et al., 2013) o de los astrocitos (Oya et al., 2013).

En relación a las isoformas de la proteína, un único trabajo ha identificado varias formas de expresión del transportador. Mediante análisis por RT-PCR y *western blot* VNUT apareció como un dúplex con movilidad aparente de 55 y 60 kDa. Los estudios de fraccionamiento subcelular indicaron que las isoformas se distribuían específicamente en gránulos de mucina de diferentes propiedades (Sesma., 2013).

Los estudios más antiguos sobre el mecanismo de transporte vesicular de nucleótidos se realizaron sobre los gránulos cromafines catecolaminérgicos de la médula suprarrenal y las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico del torpedo. Los gránulos cromafines fueron el modelo experimental más ampliamente empleado y una amplia variedad de nucleótidos tales como ATP, ADP, AMP, GTP o el UTP podían ser internalizados a los gránulos (Weber and Winkler, 1981; Bankston and

Guidotti, 1996;. Gualix et al, 1996, 1997). Una falta similar de especificidad de sustrato se ha demostrado en las vesículas sinápticas del modelo colinérgico del órgano eléctrico *T. marmorata* (Luqmani, 1981). A pesar de esta falta de especificidad, el transporte de nucleótidos granular está muy regulado por la concentración citosólica de nucleótidos, principalmente ATP y ADP. Estos sustratos de transporte son capaces de inducir cambios conformacionales lentos entre las diferentes formas de la proteína transportadora, resultando en cambios muy significativos en la capacidad de transporte. Este comportamiento cinético, conocido como mnemónico, permite tener un umbral de seguridad dependiente del metabolismo energético celular (Gualix et al., 1996, 1997).

El transporte de nucleótidos en las vesículas sinápticas del cerebro se caracterizó más tarde, cuando en otro estudio se ensayó el transporte de los nucleótidos de adenina a las vesículas sinápticas de cerebro de rata con la ayuda de análogos de nucleótidos fluorescentes donde se confirmaba el comportamiento cinético complejo del transportador vesicular de nucleótidos (Gualix et al., 1999).

Una actividad similar ha demostrado estar mediada por VNUT purificado reconstituido en proteoliposomas (Sawada et al., 2008). El transporte de ATP por VNUT en este sistema tuvo una K_m aparente en el rango submilimolar. En este caso el GTP, UTP y ATP γ S actuaron inhibiendo el transporte de ATP (Sawada et al. 2008). El transporte de ATP por VNUT se ha descrito que ocurre de forma dependiente del gradiente electroquímico generado por la V-ATPasa, en concreto y a diferencia que los VMAT, el componente eléctrico ($\Delta\Psi$) es el crucial para su funcionamiento. Esta característica así como la dependencia de Cl $^-$ para el funcionamiento, con una saturación a ≈ 4 mM, es compartida en los miembros de la familia *Slc17*, como el VGLUT (Sawada et al., 2008; Miyaji et al., 2010; Schenk et al., 2014). Además, se sabe que el transporte de nucleótidos es independiente de la presencia de Mg $^{2+}$ o Ca $^{2+}$ como estabilizadores de la molécula, que interaccionan de forma predominante con los nucleótidos trifosfato trivalente a pH fisiológico (Sawada et al., 2008). No obstante, aunque el ATP puede ser transportado de forma libre, evidencias han sido mostradas acerca del papel del VNUT como co-transportador de estos cationes divalentes junto al ATP (Miyaji et al. 2011).

El transporte de ATP por el VNUT es inhibido por fármacos que bloquean el VGLUT, como el Evans blue (EB), el DIDS o el atracilósido (Sawada et al., 2008; Miyaji et al., 2013; Tsuboi et al., 2013; Geisler et al., 2013) y en un estudio con mutaciones puntuales en las posiciones transmembrana Arg-35, Arg-119 y Gln-126 a Ala, los cuales corresponden con residuos de aminoácidos importantes en los otros miembros de *Slc17* NPT1 y VGLUT2, también se observó una deficiencia del transporte de nucleótidos por VNUT (Miyaji et al., 2011).

1.7. La capacidad de almacenamiento de los gránulos cromafines: los factores intravesiculares.

Aún recuerdo una de las primeras imágenes que el Dr. Borges mostró tras mi llegada al laboratorio. Se trataba de un dibujo en forma circular, a modo de vesícula cuyo interior estaba repleto de gente. Gente que se molestaba por la falta de espacio, era el camarote de los hermanos Marx y es que los gránulos cromafines alcanzan unas concentraciones tan altas, que sobrepasan los límites osmóticos fisiológicos. Los mecanismos por lo que esto es posible aún quedan por ser resueltos, al igual que la forma en la que se colocaban los pasajeros en aquel mínimo lugar.

En general, la acumulación de neurotransmisores dentro de las vesículas secretoras depende de tres factores principales: 1) el gradiente de pH vesicular, 2) la función del transportador vesicular de los transmisores y 3) la capacidad de almacenamiento de la luz vesicular (Pereira and Sulzer, 2012). Como hemos nombrado anteriormente, las CAs pueden alcanzar concentraciones intragranulares de entre 0,8 y 1 M (Albillos et al., 1997; Montesinos et al, 2010; Montesinos et al, 2008); el ATP y otros nucleótidos podría encontrarse en el orden de 200 mM (Kopell and Westhead, 1982; Weber et al., 1983); el Ca^{2+} libre intragranular alcanza 50-100 μM (Bulenda and Gratzl, 1985) así como cantidades no cuantificadas de péptidos, dopamina- β -hidroxilasa, y graninas (Winkler and, 1980) además se alcanza una concentración de 200 mg/mL de proteína (Videen et al., 1992). Todo ello empaquetado en un volumen de tan sólo 4 aL (attolitros) y a una osmolaridad teórica que puede alcanzar los 1,5-2 Osm (osmoles) frente a los 0,315 Osm del citosol.

Sin embargo, se ha propuesto que las vesículas secretoras se comportan como osmómetros perfectos en el equilibrio (Johnson and Scarpa, 1976; Morris et al., 1977). Si la interrupción debido al estrés osmótico no ocurre es porque los solutos deben agregarse para reducir la presión osmótica muy por debajo del estimado 1,5 Osm (Helle et al, 1985; Kopell and Westhead, 1982; Sen y Sharp, 1981). Los mecanismos involucrados en obtener estas altísimas concentraciones de solutos, a pesar de las grandes fuerzas osmóticas creadas, han intrigado a los investigadores durante décadas. Según las leyes de la física a tales concentraciones el gránulo debería captar agua y expandirse hasta igualar la presión a ambos lados, ello conduciría a su lisis, pero tal cosa no ocurre ¿Por qué?

Esta capacidad concentradora se explica en parte gracias a la existencia de interacciones entre los diferentes componentes vesiculares que favorecen la disminución de la osmolaridad en el interior del gránulo. En las últimas décadas, nuestro laboratorio ha venido estudiando la relación entre diversos factores proteicos; las principales cromograninas u otros variables como el pH y el Ca^{2+} intravesicular en la capacidad concentradora de las vesículas. No obstante, a pesar de la importante contribución de estos factores que denominamos intravesiculares, en la facilitación de la carga de solutos, aún queda por ser explicada la extrema capacidad de concentración de las SVs. En los próximos apartados detallaremos cómo ha sido descifrado el papel de estos factores intravesiculares y propondremos, como hipótesis de esta tesis al ATP como factor facilitador participante en este proceso

1.7.1. El pH intravesicular.

El pH luminal de los gránulos alcanza un valor alrededor de 5,5 (Winkler and Westhead, 1980), el cual coincide con el pK_a de la principal proteína intravesicular de los gránulos cromafines involucrada en la agregación de solutos, la CgA (Helle et al; 1985). La eficiencia del mecanismo de agregación parece ser máximo a pH 5,5 (Yoo, 1996). Se ha demostrado la importancia del pH intravesicular en la cinética de los eventos exocíticos, de manera que cuando el gradiente de pH es restringido, por ejemplo, con el uso de inhibidores de la V-ATPasa, como la bafilomicina A, existe una pérdida de en el contenido cuántico de

catecolaminas probablemente debido a su pérdida desde el interior de las vesículas al citoplasma (Camacho et al., 2006).

1.7.2. El Ca^{2+} intravesicular.

El Ca^{2+} es un componente común en muchas vesículas que almacenan hormonas. En los gránulos cromafines se alcanzan altas concentraciones de estos cationes (20-40 mM) donde se ha descrito que ejercen un papel agregativo, uniéndose a las cromograninas (Videen et al., 1992). Por otra parte, ha sido descrito que el Ca^{2+} vesicular puede representar un almacén crucial capaz de formar un microdominio específico de Ca^{2+} en las inmediaciones de la membrana granular, el lugar específico de control de la movilidad del gránulo y la exocitosis (Camacho et al., 2008).

1.7.3. Las cromograninas.

Los gránulos secretores contienen una matriz, con características diferentes en cada caso debido a su heterogénea composición. Los principales componentes proteicos de la matriz intravesicular de vesículas de núcleo denso son los graninas (> 80%) (Crivellato et al., 2008), una familia de glicoproteínas solubles en agua que incluye a las cromogranina A (CgA) y B (CgB) y las secretograninas (Sg).

Las graninas están formadas por cadenas polipeptídicas simples, con un péptido señal en el extremo N-terminal que las dirige tras su síntesis al RER y de ahí al Golgi donde ocurren diversas modificaciones postraduccionales, como fosforilaciones, glicosilaciones, etc. Desde la TGN se originan los gránulos secretores que contendrán dichas graninas. Son procesadas por enzimas contenidas en los gránulos para generar las proteínas maduras. Se caracterizan por su alto contenido en aminoácidos ácidos originando un pI de entre 4,5 a 6,1. Unen Ca^{2+} con baja afinidad pero alta capacidad (Yoo and Albanesi, 1991). En presencia de Ca^{2+} y a pH bajo se agregan entre sí y con otros componentes contenidos en los gránulos como el ATP (Yoo et al., 1990), las CA y otras proteínas (Helle et al., 1985; Videen et al., 1992) y Ca^{2+} (Sen y Sharp, 1981).

En los gránulos cromafines, la unión de las CAs a estas proteínas es responsable del empaquetado, quelado y mantenimiento, al menos

parcialmente, de la iso-osmolaridad. Ello parece prevenir que las vesículas se hinchen, al tiempo que permite el almacenamiento de cantidades más altas de transmisor (Helle et al., 1985). Otros autores han demostrado funciones fisiológicas que incluyen la formación de complejos con CAs, y la interacción con el ATP.

El papel de las Cgs en el mantenimiento de altos niveles de CAs en las vesículas secretoras se ha demostrado recientemente en ratones *knock-out* individuales de la cromogranina A (CgA-KO) y la cromogranina B (CgB-KO) o dobles (CgAB-KO) en nuestro laboratorio. Los registros amperométricos de células cromafines derivadas de cualquiera de las cepas carentes de cromogranina A o B individuales demostraron una disminución de la liberación de CAs provocada por una disminución del $\approx 25-30\%$ en el tamaño cuántico (Díaz-Vera et al, 2010; Montesinos et al., 2008). Es importante destacar que, a diferencia de las células *wild-type* (WT), la incubación de las células *knock-out* A o B con L-DOPA no aumentó la cantidad de CAs secretadas por vesículas en estas cepas. Dado que este transmisor introducido de forma artificial era capaz de aumentar los niveles de CAs citosólicos en estas células control, se concluyó que el mecanismo de acumulación vesicular de CA estaba siendo saturado en la ausencia de cualquiera de las cromograninas (Díaz-Vera et al, 2010; Díaz-Vera et al., 2012; Montesinos et al, 2008).

Las células cromafines CgAB-KO exhibieron una mayor reducción en el tamaño cuántico, de alrededor del 50%, y sus LDCVs tenían una apariencia atípica y un tamaño más grande (Díaz-Vera et al., 2012). Estos cambios morfológicos vesiculares, junto con la disminución de la frecuencia de eventos de liberación podrían reflejar el papel sugerido de las cromograninas en la biogénesis de vesículas núcleo denso (Díaz-Vera et al., 2012).

A pesar de los efectos significativos en la reducción sobre tanto la carga como en la exocitosis de catecolaminas en las células cromafines carentes de Cgs (Díaz-Vera et al, 2012; Díaz-Vera et al, 2010), la ausencia de éstas sólo afectó a la mitad el contenido de aminas vesicular de gránulos cromafines, esta concentración está aún lejos de isotonicidad. Estos resultados proponen la participación de otros componentes que expliquen la capacidad de almacenamiento de solutos.

1.7.4. El ATP intravesicular.

1.7.4.1. El ATP como neurotransmisor.

A mediados de los 60, antes de que el ATP fuera identificado como neurotransmisor de los nervios denominados no adrenérgicos no colinérgicos (NANC), el científico Burnstock lideró un estudio inspirado en los experimentos que Loewi había realizado unos cuantos años atrás. Usando una preparación de taenia coli se produjo una respuesta típica de la musculatura lisa bajo la estimulación eléctrica, una relajación rápida seguida de una contracción, mientras que la perfundida con ATP produjo una relajación más lenta sin contracción. Años más tarde, Burnstock formulaba la hipótesis de la neurotransmisión purinérgica para dar una explicación a tales resultados (Burnstock, 1972) pero lamentablemente, pocos creyeron en esta teoría durante los próximos 25 años y es más, a menudo fue incluso ridiculizada en las reuniones científicas y simposios. La resistencia a este concepto era quizás comprensible dado que el ATP estaba bien establecido como fuente de energía intracelular involucrada en el ciclo de Krebs y otras vías bioquímicas y parecía poco probable que tal molécula ubicua haría también actuar como un mensajero extracelular. Sin embargo, el ATP, “una molécula biológica antigua”, no es sólo una fuente energía intracelular sino también, una molécula de señalización extracelular.

Los nervios que utilizan ATP como su principal transmisor fueron nombrados posteriormente purinérgicos y el almacenamiento, liberación y la inactivación de ATP para los nervios purinérgicos fue propuesto. Desde entonces una gran cantidad de evidencias ha seguido en apoyo de la hipótesis purinérgica.

El ATP actúa sobre dos clases de receptores purinérgicos, el P₂Y, acoplado a proteína G y los receptores ionotrópicos P₂X. En las células cromafines de la glándula adrenal, el receptor P₂Y₁₂ media la inhibición de la liberación exocitótica de catecolaminas mediante la modulación de los CCDV. En cambio, varios estudios han demostrado que la estimulación de receptor P₂Y₂ mejora la formación de inositol fosfato y aumenta la liberación exocitótica de catecolaminas. También se conocen receptores P₂X₄₋₇ en células cromafines cuya estimulación por agonistas específicos

puede estimular la secreción de catecolaminas por provocando la apertura de un canal catiónico no selectivo (Sakamoto et al., 2014).

Los mecanismos de liberación no exocitótica de nucleótidos de adenina no están totalmente identificados, aunque se ha propuesto que podrían estar mediados por una serie de transportadores o canales que forman parte de la superfamilia de proteínas ABC (*"ATP-binding cassette"*). Otras hipótesis señalan la posible participación de canales iónicos dependientes de voltaje, conexinas, panexinas y otros miembros de las uniones estrechas entre células (Bahima et al., 2006; Eltzschig et al., 2006). Tampoco podemos olvidar que el UTP, UDP y UDP-glucosa son compuestos funcionales en el Golgi y el grupo del Dr. Boucher ha propuesto su salida mediante exocitosis constitutiva como excedente de la funcionalidad del Golgi (Lazarowski, 2012).

Como todos los neurotransmisores, los nucleótidos deben ser inactivados, degradados o retirados del medio extracelular para evitar su acción prolongada. Así, una vez en la hendidura sináptica, son rápidamente hidrolizados por unas enzimas extracelulares específicas denominadas ectonucleotidasas. Como consecuencia de esta hidrólisis los nucleótidos van perdiendo secuencialmente sus grupos fosfato, generando diferentes metabolitos hasta sus correspondientes nucleósidos precursores (Harkness, 1968; Miki et al., 1986), que a su vez pueden actuar como ligandos fisiológicos de otros receptores purinérgicos.

1.7.4.2. La co-transmisión.

El principio de Dale, fue cuestionado en 1976 por Burnstock y la existencia de nervios que puede sintetizar, almacenar y liberar más de un transmisor es ahora ampliamente aceptado. A mediados de la década de 1950, se reconoció que el ATP era co-almacenado con las catecolaminas en las células cromafines de la médula adrenal (Hillarp, 1955; Blaschko et al. 1956). Poco después, la co-liberación de ATP con la adrenalina de en la célula cromafín fue identificada (Douglas y Poisner 1966).

De acuerdo con este concepto, se describió posteriormente el almacenamiento y liberación del ATP en terminales colinérgicas (Richardson and Brown, 1987), noradrenérgicas simpáticas y

parasimpáticas (von Kugelgen and Starke, 1991) y GABAérgicas del asta dorsal de la médula espinal (Jo and Schlichter, 1999; Jo and Role, 2002), además de la liberación exocitótica y dependiente de Ca^{2+} del ATP en terminales nerviosas centrales aisladas (Sawynok et al., 1993). Todos estos estudios, unidos a multitud de estudios posteriores, establecen firmemente el concepto de cotransmisión que se conoce en la actualidad (Pankratov et al., 2006).

El ATP es acumulado y almacenado en las vesículas de una gran variedad de células secretoras y no secretoras, (oocitos, células epiteliales, PC12, células β pancreáticas, mastocitos, fibroblastos, astrocitos, eritrocitos, etc.), (Borges, 2013; Aleu et al., 2003; Fabbro et al., 2004). Es más, la presencia habitual de ATP en vesículas secretoras es a veces utilizada como un universal de exocitosis (Pankratov, 2005). La secreción de ATP está incluso presente en nervios periféricos donde es co-almacenado y co-liberado junto a la ACh (Morel and Meunier, 1981) o a la NA (Sesti et al., 2002).

En el SNC, el ATP puede ser almacenado en los terminales sinápticos de varias maneras: en vesículas de ATP que pueden co-existir con otras contenedoras de glutamato, en vesículas de ATP en terminales en los que ejerce como transmisor único, o co-almacenado y co-liberado con GABA (Jo and Role, 2002). La acumulación de aminas y ACh, cargadas positivamente, es dirigida mayoritariamente por el gradiente de H^+ , mientras que la acumulación de transmisores cargados negativamente (ATP y glutamato) es dirigido en su mayor parte por la diferencia en el potencial de membrana. De acuerdo con este esquema, parece que al ATP cargado negativamente podría ser más fácilmente acumulado en vesículas contenedoras de acetil colina o catecolaminas que en las cargadas negativamente por glutamato o GABA (Pankratov et al., 2006).

1.7.4.3. El ATP como factor intravesicular.

Además de su papel bien establecido como fuente de energía y de sus propiedades como neurotransmisor, ATP posee características químicas intrínsecas que hacen que sea relevante para la acumulación de sustancias dentro de vesículas secretoras en cantidades que exceden en gran medida los límites teóricos osmóticos.

Esta purina es acumulada y almacenada en las vesículas de una gran variedad de células: en los gránulos cromafines, el ATP podría encontrarse, como ya hemos mencionado, en el orden de $\approx 120-200$ mM (Winkler et al., 1982) frente a los ≈ 4 mM citosólicos. El ATP posee unas propiedades físico-químicas que lo hacen especial en el interior de las LCDVs y es la formación de complejos intravesiculares.

La formación de complejos débiles entre las monoaminas y el ATP, los dos mayores constituyentes del interior del gránulo, ha sido evidenciada en numerosos trabajos con el fin de dar cuenta las propiedades osmóticas de estas organelas. Por ejemplo, por ultracentrifugación (Berneis et al., 1972), la resonancia magnética nuclear (RMN); (Granot et al., 1976), la espectroscopía de infrarrojo y la fluorescencia o microcalorimetría (Weder et al., 1973) se han utilizado para confirmar que un complejo entre aminas y ATP podría ser responsable de la estabilidad de estas vesículas.

Estas aproximaciones son coincidentes en que la fuerza de las interacciones con el ATP es, en orden decreciente, con la 5-HT, la NA, la A, DA, la tiramina y la histamina. Sin embargo, la Ach no reaccionó con el ATP lo que sugirió la participación del anillo indol o catecol de las aminas en este proceso (Weder and Wiegand., 1973).

Más específicamente, según los estudios de RMN, la interacción entre las aminas y los nucleótidos involucra la asociación por apilamiento de los anillos. Estas fuerzas son además reforzadas por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo del catecol y los nitrógenos del anillo de adenina, y del grupo hidroxilo β y la ribosa o los grupos fosfato del ATP.

Aparte, en estos trabajos se confirma la participación de fuerzas de interacción electrostática entre la cadena positiva de las aminas y la cadena de fosfatos de los nucleótidos cargada negativamente; dada la disrupción del complejo a pHs en los cuales el grupo amino predominante es desprotonado (Granot et al., 1976; Weder and Wiegand., 1973). Sin embargo, la fuerza de interacción de solamente estas cadenas es mucho más sutil que involucrando el apilado de los anillos de ambas especies, según los estudios de competición realizados (Granot et al., 1976).

Estas interacciones débiles además sugieren la formación de complejos de naturaleza extremadamente dinámica que no impiden una rápida liberación de las CA en la exocitosis (Weder and Wiegand., 1973).

Fue en 1982, Kopell y Westhead describieron cómo la interacción descrita entre estas moléculas, ATP y CA poseen un comportamiento de solución no ideal en cuanto a la presión osmótica que presentaban. Por tanto, el papel asignado al ATP fue de un factor para permitir el almacenamiento de altas concentraciones de catecolaminas.

La relación molar de CAs y ATP permanece en controversia. Esta relación entre NA y ATP en las terminales nerviosas simpáticas se estimó entre 7: 1 y 12:1 (NA: ATP) (Schumann and Philippu, 1958; Euler and Lishajko et al. 1963; Stjärne and Lishajko 1966; Geffen and Livett 1971; Lagercrantz and Stajarne 1974) sugiriendo que la mayoría de las catecolaminas no se pueden almacenar como un complejo con ATP. No obstante, en los LDCVs de las células cromafines se estimó una altísima relación de ATP por CA de 4:1 (Kopell and Westhead et al., 1982) lo que condujo a la idea la participación del ATP en la formación de un complejo de almacenamiento no difusible con las CAs. Sin embargo, por medio del estudio de la interacción por RMN se describió la presencia de una relación binaria catecolamina-nucleótido o ternaria involucrando la interacción de metal-nucleótido-catecolamina originando complejos 1:1 o 2:1 (Granot et al., 1976).

No obstante, a pesar de la existencia de evidencias claras sobre la formación de complejos ATP-CAs en estudios *in vitro*, muy poca información existe sobre las funciones del ATP intravesicular en el almacenamiento y exocitosis de neurotransmisores.

La dificultad en la modulación del contenido de ATP en las SVs viene dada principalmente a la baja tasa de recambio que existe entre este compartimento y el citoplasma. Los gránulos cromafines son por ello considerados como “secuestradores de ATP” (Corcoran et al., 1986). Numerosos trabajos en los que se medía el reciclaje y el almacenamiento de ATP de nueva síntesis utilizando trazadores radioactivos de los nucleótidos determinaron la existencia de 2 claros pools de nucleótidos de adenina: los gránulos cromafines, que representaron el $\approx 75\%$ del ATP

celular y el $\approx 35\%$ restante distribuido extravesicularmente (Bevington et al., 1984; Corcoran et al., 1986). De forma opuesta a las evidencias de un comportamiento mnemónico del VNUT, que permite tener un umbral de seguridad dependiente del metabolismo energético celular (Gualix et al., 1996, 1997), la inhibición farmacológica de la producción de ATP por estrategias como la aplicación de cianuro y el tratamiento con deoxiglucosa revelaron un éxito en la reducción del ATP citosólico pero fueron prácticamente ineficaces en el cambio del contenido de ATP vesicular, incluso en tratamientos prolongados de varios días. La resistencia al cambio del ATP en las SVs llevó a considerar esta molécula como metabólicamente inerte, que no se intercambia realmente con el citoplasma (Corcoran et al., 1987).

La caracterización de la entidad genética del transportador responsable ha permitido en los últimos años la modulación de la expresión del *Slc17a9* en células aisladas (Sawada et al., 2008; Larsson et al., 2012; Geisler et al., 2013; Tsuboi et al., 2013) así como la supresión en los ratones *knock-out* (Sakamoto et al., 2014). En todos los casos, la disminución de la expresión del transportador provocó una disminución a la baja de la exocitosis de ATP, demostrando de forma plausible su implicación en el transporte hacia el interior del gránulo secretor.

Los trabajos que han usado al VNUT como diana molecular para explicar la transcendencia de la señalización purinérgica en diversos tipos celulares desde el momento del conocimiento de la identidad molecular han sido numerosos. Así, mediante el silenciamiento génico (Sawada et al., 2008; Sathe et al., 2011; Larsson et al., 2012; Geisler et al., 2013), el uso de ratones *knock-out* del transportador (Sakamoto et al., 2014) o el bloqueo de su actividad con fármacos sobre vesículas o lisosomas aislados (Haanes et al., 2010; Tsuboi et al., 2013) se han atribuido nuevas funciones del ATP en la regulación de la secreción.

Sin embargo, el uso de esta herramienta como estrategia molecular para evitar la entrada del ATP a las SVs y la implicación la falta de este factor intravesicular ayudante de la concentración de transmisores se ha dejado completamente al margen. En este sentido, planteamos realizar un estudio para conocer el papel del ATP en la acumulación vesicular de la CA y las consecuencias de su inhibición en el en la exocitosis usando

como herramienta la modulación de la expresión del transportador de nucleótidos vesicular.

Objetivos

2. OBJETIVOS

Nuestro grupo de investigación ha estudiado durante los últimos años diversos factores intravesiculares involucrados en la exocitosis de catecolaminas. Para continuar ahondando en los mecanismos que controlan la eficacia de la transmisión planteamos las siguientes hipótesis:

- i. El ATP puede interaccionar físicamente formando complejos con las catecolaminas. Más que una hipótesis, esta afirmación es una evidencia dado que numerosas publicaciones demuestran que estas especies pueden interaccionar.
- ii. La presencia de ATP en los gránulos cromafines permite la acumulación de catecolaminas a concentraciones tales que, de otro modo, supondrían la lisis osmótica de la vesícula, ejerciendo así un papel en la regulación del contenido cuántico.

Para abordar estas hipótesis, nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- i. Explorar la implicación del VNUT en la acumulación vesicular y la exocitosis del ATP en células cromafines bovinas.
- ii. Estudiar los efectos de una reducción del ATP intravesicular en el almacenamiento y en la exocitosis de catecolaminas.

Materiales y métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Listado de reactivos y constructos de DNA.

Los siguientes productos se adquirieron de Sigma-Aldrich: ácido iodoacético, el ácido bicinconírico, el ácido perclórico, la albúmina de suero bovino (BSA), la adrenalina, la alúmina, la azida sódica, el azul de Coomassie, el azul de tripán, la colagenasa, la DHBA, el dimetil fenil piperazinio (DMPP), el DMEM, la DNAsa I, el Ham's F12, el HEPES, el heptanosulfonato sódico, la kanamicina, la L-DOPA, la N-etilmaleimida (NEM), la noradrenalina, la oligomicina, el Optiprep[®], la pargilina, la penicilina, el Percoll[®], la poli-D-lisina, la tripsina y el Triton-X100.

El vector pEGFP-N1 es de Clontech. El kit de determinación de ATP proviene de Molecular Probes. El suero bovino fetal, de Lonza y la gentamicina de Acofarma. El inhibidor de ectoATPasas ARL67156 y el Evans blue lo obtuvimos de Tocris. El Urografin[®] y el cóctel inhibidor de proteasas cOmpete[®] fueron de Roche .

La síntesis de los oligonucleótidos la realizó la casa comercial *Integrated DNA Technologies* (IDT) para los cebadores de DNA y Sigma-Aldrich para los oligonucleótidos de siRNA. Las enzimas de restricción y la DNA ligasa son de la compañía Takara Bio Inc.

La calidad de todas las sales empleadas fueron de grado reactivo de Merck o Sigma-Aldrich, el agua fue purificada en un sistema Elix10/MilliQ Gradient A-10 de Millipore.

En el anexo I se presenta una tabla con la composición de las soluciones más comunes empleadas.

El plásmido que codifica el neuropéptido Y como proteína de fusión con EGFP (NPY-EGFP) fue cedido amablemente por el Dr. Wolfhard Almers (Vollum Institute, OHSU) (Taraska et al., 2003) y el constructo de neuropéptido Y fusionado al DsRed (NPY-DsRed) fue proporcionado afectuosamente por el Dr. Zheng-Xing Wu (Institute of Biophysics & Biochemistry, College of Life Science & Technology, Huazhong University of Science & Technology). El vector pEGFP-N1 fue obtenido en Clontech Laboratories, Inc. (CA, USA). La metodología sobre la preparación del

plásmido codificante del VNUT fusionado al EGFP en el plásmido pEGFP-N1 se detalla en el apartado 3.4.

3.2. Listado de anticuerpos.

Los anticuerpos primarios utilizados, su aplicación y su dilución de uso se describen en la siguiente tabla:

NOMBRE N°. Catálogo	EMPRESA	OBSERVACIONES	TÉCNICA Y DILUCIÓN DE USO
CgA sc-1488	Santa Cruz Biotechnology Inc	Anticuerpo policlonal de cabra	WB (1:200)
CgB sc-1489	Santa Cruz Biotechnology Inc	Anticuerpo policlonal de cabra	WB (1:200) IF (1:50)
SgII	Santa Cruz Biotechnology Inc	Anticuerpo policlonal de cabra	WB (1:200)
GFP sc-8334	Santa Cruz Biotechnology Inc	Anticuerpo policlonal de conejo	WB (1:200)
TH T2928	Sigma-Aldrich	Anticuerpo monoclonal de ratón	WB (1:10000) IF (1:1000)
PNMT	Abcam	Anticuerpo monoclonal de ratón	WB (1:1000)
α Tubulin T6074	Sigma-Aldrich	Anticuerpo monoclonal de ratón	WB (1:10000)
Actina T6074	Sigma-Aldrich	Anticuerpo monoclonal de ratón	WB (1:10000)
Anti- cabra P0160	Dakocytomotion	Anticuerpo policlonal	WB (1:10000)
Anti- conejo NA934	Amersham GE Healthcare	Anticuerpo policlonal	WB (1:10000)
Anti- ratón NA931	Amersham GE Healthcare	Anticuerpo policlonal	WB (1:10000)

Actina T6074	Sigma-Aldrich	Anticuerpo monoclonal de ratón	WB (1:10000)
Alexa Fluor® 568 A21124	Life Technologies	Anti-IgG anti-ratón de cabra	IF (1:500)
Alexa Fluor® 568 A11057	Life Technologies	Anti-IgG anti-cabra de burro	IF (1:500)
Alexa Fluor® 488 A21206	Life Technologies	Anti-IgG anti-conejo de burro	IF (1:500)

3.3. Obtención y aislamiento de células y orgánulos subcelulares.

3.3.1. Cultivo primario de células cromafines bovinas.

Las glándulas suprarrenales de vaca son proporcionadas por el Matadero Insular de Tenerife. Una vez extraídas son trasladadas al laboratorio en un intervalo de tiempo no superior a 30 min. El procedimiento utilizado para el aislamiento y cultivo de las células cromafines adrenales se realiza en condiciones estériles en una campana de flujo laminar vertical y siguiendo las recomendaciones descritas por (Dominguez et al., 2012; Moro et al., 1990 y O'Connor et al., 2007)

Los pasos seguidos se detallan a continuación (fig. 3.1):

A) Se elimina la grasa que rodea la glándula y con una jeringa se inyectan 3-5 mL de una solución de Locke: 154 mM de NaCl; 5,6 mM de KCl; 3,6 mM de NaHCO₃; 10 mM de HEPES y 11 mM de glucosa; sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ y pH de 7,3. Se suplementa con 40 mg/mL de gentamicina y 50 UI/mL de penicilina. Las glándulas se colocan en un vaso de precipitado tapado y se incuban a 37°C durante 10 min. Una vez realizado este lavado, se repite el paso anterior, esta vez añadiendo a la solución 2 mg/mL de colagenasa tipo IA (300-480 UI/mg) y 4 mg/mL de albúmina de suero bovino (BSA; fracción V) y se mantiene en incubación a 37°C durante 20 min (fig. 3.1; paso A). Esta incubación se repite 2-3 veces, según la

resistencia de las glándulas adrenales a la presión. En estas inyecciones es preciso ser cuidadoso para evitar la rotura, ya que la glándula está parcialmente digerida.

B) La glándula adrenal en este momento se corta sagitalmente con un bisturí (fig.3.1; paso B), y se extrae el máximo tejido medular (color crema) evitando coger tejido cortical (color púrpura). El tejido cromafín se pasa a una placa de Petri con solución de colagenasa fresca. Con dos hojas de bisturí se cortan de forma grosera los trozos de tejido, facilitando así, el progreso de la disgregación enzimática.

C) El tejido con colagenasa fresca se deja incubando en agitación 10 min, a 37°C, tras lo cual se disgrega mediante pipeteo (fig. 3.1; pasos C y D).

D) Se deja 15 minutos más en incubación haciendo la disgregación cada 5 minutos. Tras ello, se procede a filtrar la suspensión de tejido con una malla de gasa estéril, para eliminar trozos groseros no digeridos (fig. 3.1; paso E).

E) El material filtrado y lavado con la solución Locke es centrifugado a 600 g durante 5 min. De esta forma se elimina la colagenasa. El precipitado resultante se resuspende en 50 mL de solución de Locke y se repite el proceso de centrifugación (fig. 3.1; paso E).

F) El nuevo precipitado se resuspende en 10 mL de Locke y se pasa a través de una malla de nilón de 200 μm de diámetro de poro (fig. 3.1; paso F), para eliminar agregados celulares, y se lava con Locke para arrastrar el máximo de células posible. El material así obtenido está enriquecido en células cromafines; sin embargo existe una contaminación por la presencia de restos celulares y otros tipos celulares como los fibroblastos o las células sanguíneas.

En nuestro laboratorio realizamos purificaciones adicionales, que permiten el enriquecimiento de los cultivos primarios en células cromafines o incluso la separación de células adrenérgicas de las células noradrenérgicas empleando gradientes de densidad con diferentes sustratos.

3.3.1.1 Purificación de células cromafines empleando gradientes discontinuos de Urografín®.

Para purificar las células cromafines empleando este método, la suspensión celular obtenida del paso F es sometida a un gradiente de densidad discontinuo. El gradiente se realiza de la siguiente manera: 10 mL de la solución de células se mezclan con 10 mL de Urografín® al 15% (preparado a partir de 20 mL la solución comercial al 76%, a la que se le añaden 81 mL de agua para mantenerla isotónica). La mezcla tendrá ahora una concentración de Urografín® al 7,5%.

Se toman dos tubos de centrifuga estériles de 30 mL y se cargan con 20 mL de solución de Urografín® al 15% cada uno. A continuación, lentamente y evitando romper la interfase, se va añadiendo la solución de Urografín® al 7,5% junto con las células, hasta completar los 10 mL restantes. Este paso es crítico, y es preciso realizar la adición con sumo cuidado para lograr una interfase limpia. Se equilibra el peso de los tubos y se centrifuga a 7.500 g durante 20 min a 18°C. Como el gradiente es discontinuo las células cromafines se localizarán en la interfase, en el fondo los hematíes, y en la superficie del tubo restos celulares y grasa (fig 3.1; pasos G y H).

Las células que aparecen en una banda difusa, en la interfase, se recogen con una pipeta Pasteur y se resuspenden en Locke. Para eliminar el Urografín® se centrifuga durante 5 min a 600 g (fig. 3.1; paso L).

Se elimina el sobrenadante y se vuelve a resuspender con medio de cultivo DMEM y se filtra con una malla de 90 µm con el fin de romper los microagregados de células. Es importante no agitar demasiado la solución para evitar la formación de agregados por la presencia de calcio (fig. 3.1; paso M).

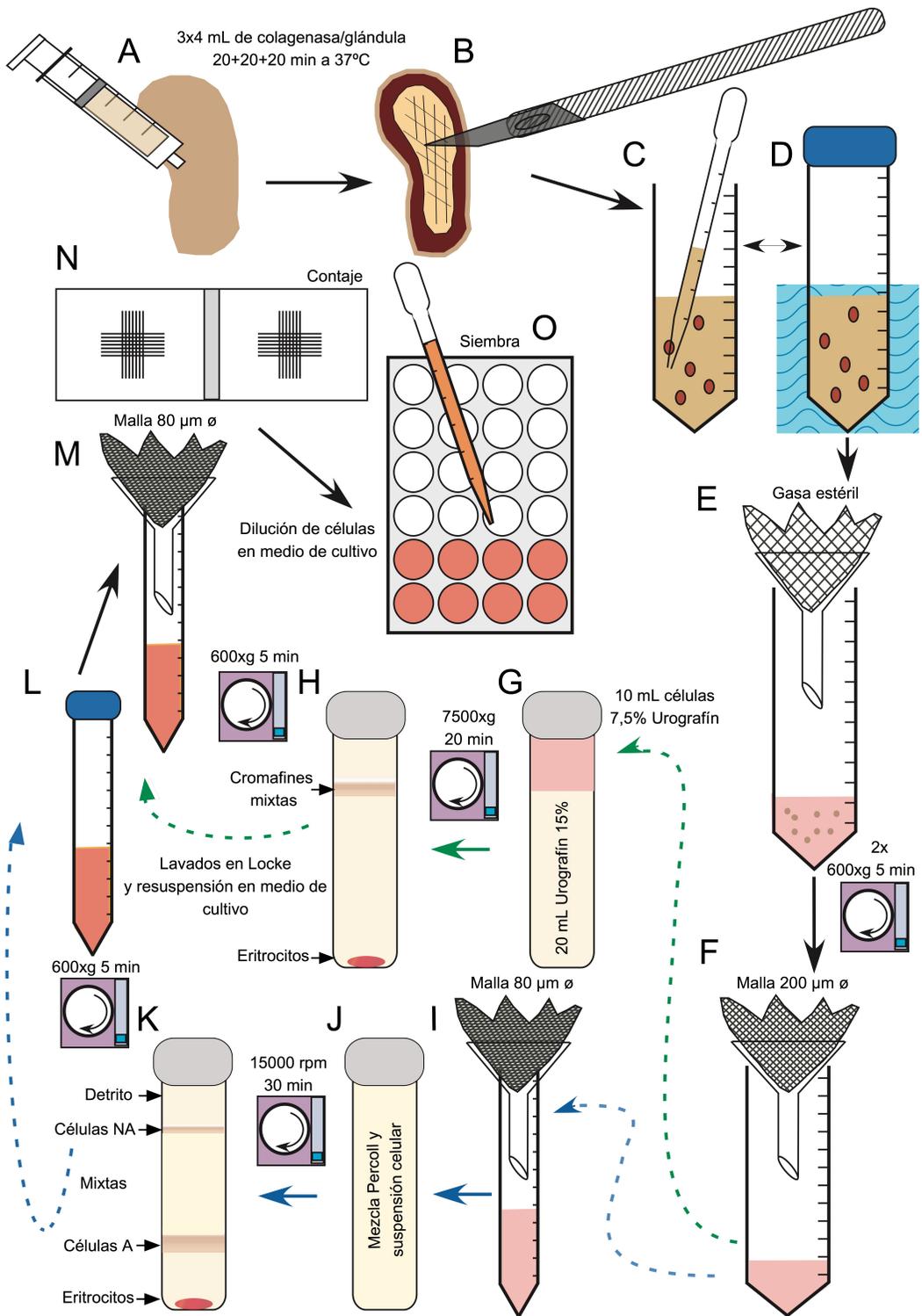


Figura 3.1. Representación esquemática de los procedimientos de aislamiento y cultivo de las células cromafines a partir de glándulas adrenales bovinas. Los detalles del procedimiento de purificación de las células cromafines mediante Urografín® (pasos G y H) o Percoll® (pasos I a K) se detallan en el texto.

3.3.1.2. Separación de las células cromafines mediante gradientes de Percoll®.

El protocolo de cultivo de separación de células adrenérgicas de las noradrenérgicas se llevó a cabo según las indicaciones de Moro et al., 1989. Brevemente, la suspensión celular obtenida en el paso F se pasa a través de una malla de 80 µm de poro y el volumen filtrado se mezcla con una solución de Percoll® diluída en Locke (p.ej. para tubos de centrífuga de 30 mL mezclamos 14 mL de solución de Percoll®, preparados empleando 1,6 mL de Locke al 10x y 12,4 mL de Percoll®; con 16 mL de suspensión celular en Locke). Tras la centrifugación del gradiente de densidad durante 30 min a 15.000 rpm, se obtienen 3 poblaciones de células (fig. 3.1; K): una fracción ligera (fracción 1 ó células NA); una intermedia (fracción 2 ó mixta) y otra densa (fracción 3 ó células A). Cada fracción es separada y lavada con Locke mediante 2 centrifugaciones de 5 min a 600 g. Los precipitados resultantes son resuspendidos en medio de cultivo y filtrados por el paso a través de una malla de 80 µm para evitar los posibles agregados celulares.

Para la siembra de las células se debe tener en cuenta la densidad adecuada en función del estudio a llevar a cabo (véase anexo I). La siembra de las células cromafines se realizó sobre placas de cultivo o en cubreobjetos de vidrio de diferente diámetro (Marienfeld GmbH & Co. KG) para experimentos de microscopía. En los casos que se indica, las células fueron sembradas sobre la superficie tratada con 0,01% de poli-D-lisina.

La densidad requerida para cada condición experimental se ajustó según el rendimiento de cada cultivo realizando el conteo de células (fig. 3.1; paso N). Para ello, la suspensión celular se diluye a 1:10 con el colorante vital azul de tripán (37%) y se mezcla con suavidad para ser analizada en un hemocitómetro (cámara de *Neubauer*). El recuento se realiza de las células que no están teñidas por el colorante, ya que son las que permanecen intactas. La media del número de células obtenido en los cuatro cuadrantes es entonces multiplicada por el factor de dilución y por el

volumen de la cámara, para obtener así el número de células por mL de suspensión celular.

Una vez sembradas las células se mantienen a 5 % de CO₂ en la estufa de cultivo a 37°C en una atmósfera saturada de humedad (fig. 3.1; paso O). El medio de cultivo empleado es una mezcla de DMEM : Ham's F12 (relación 1:1) suplementado con suero bovino fetal (FBS) 10% (inactivado a 55°C durante 1 h) y con 40 mg/L de gentamicina y 100 UI/L penicilina. Las células son analizadas hasta un periodo máximo de 4 días.

3.3.2. El cultivo de la línea celular HEK293T.

La línea 293T (células embrionarias HEK293T de riñón humano que expresan el antígeno T del virus SV40) son adherentes y se cultivan a 37° en medio de cultivo DMEM suplementado con un 10% de FBS y antibióticos (penicilina 100 U/L y gentamicina 40 mg/L). Las células se mantienen en frascos de cultivo de 75 cm² en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C y con atmósfera saturada de humedad y cada 2-3 días son subcultivadas realizando un lavado con la solución de Locke y un tratamiento durante 3 min con una solución de 0,5 g/L de tripsina y 0,2 g/L de EDTA, lo cual permite que las células se despequen del sustrato. Se añade medio de cultivo, se centrifugan a 800 g, se elimina el sobrenadante, se resuspenden con medio de cultivo fresco y se realiza una dilución 1/10 para su mantenimiento.

Para el recuento de las células se realiza el mismo procedimiento que el descrito para las células cromafines.

3.3.4. Aislamiento y separación de los gránulos cromafines en un gradiente de densidad isosomótica de iodixanol.

El método seguido consistió en una adaptación del método de O'Connor (O'Connor and Frigon, 1984).

Las glándulas adrenales bovinas (de 4 a 6 unidades) son lavadas por la inyección de Locke y cortadas sagitalmente para realizar la extracción del tejido medular con la ayuda de tijeras y bisturí. Una vez pesado el material aislado (≈6 g) es homogeneizado empleando un homogeneizador de vidrio de 5 mL (Jencons, Inglaterra) en la solución B

(que contiene 0,25 M de sacarosa, 1 mM de EDTA, 1 mM de MgSO₄, 10 mM de HEPES, 10 mM de KCl, ajustada a pH 7 con KOH, inhibidores de proteasas (cOplete[®], Roche) y DNAsa 10 µg/mL. El tejido es homogeneizado pasando el émbolo a través del homogeneizador 10 veces con la ayuda de un agitador rotativo motorizado (Selecta P, marca) en frío. La solución resultante es diluida hasta obtener un volumen final 30 mL y pasada a un tubo de 30 mL de Nalgene[®] que es centrifugado a 1.000 g durante 10 min a 4°C empleando una centrifuga (Sigma2k15) con un rotor de ángulo fijo (Sigma nº 12139) para descartar el precipitado de los núcleos y restos celulares (P1). El sobrenadante es pasado a un nuevo tubo y es centrifugado a 10.000 g durante 20 min a 4°C en la misma centrifuga. Al final de este proceso se descarta el sobrenadante, que contiene el citosol y los microsomas, y se obtiene un precipitado enriquecido en gránulos cromafines (P2).

La separación de los componentes de esta fracción enriquecida en gránulos se realizó por medio de un gradiente continuo de iodixanol (Optiprep[®]). El iodixanol, es una sustancia no iónica, no toxica para las células, metabólicamente inerte y osmóticamente inactiva, que utilizamos en sustitución a la sacarosa empleada tradicionalmente para la separación de gránulos cromafines bovinos (Smith and Winkler., 1967).

Para la formación del gradiente continuo, se prepara una solución de trabajo haciendo una dilución 5:1 a partir del iodixanol 60% y la solución diluyente (0,25 M de sacarosa, 6 mM de EDTA, 6 mM de MgSO₄, 60 mM de KCl, ajustada a pH 7 con KOH e inhibidores de proteasas (cOplete[®], Roche). Mediante la dilución de la solución de trabajo con la solución de homogeneización B descrita anteriormente se preparan las soluciones que se emplean para la creación del gradiente de densidad del 5, 8 y 26% (p/v). Éstas son desgasificadas y mantenidas en frío.

Los gradientes continuos de densidad se preparan poniendo las soluciones de mayor a menor densidad desde el fondo de unos tubos de ultracentrífuga de 5 mL (SetOn, cat. nº 7022) que son girados sobre sí mismo a 28 rpm con un ángulo de 87° durante 55 s empleando el módulo de gradientes de la estación de gradientes (Gradient Station, BioComp Instruments, Inc.). El P1 obtenido anteriormente es resuspendido en la solución de iodixanol al 5% y 100 µL son cargados en la parte superior del

gradiente formado.

Los tubos se centrifugan en una ultracentrífuga (Optima L-100XP Ultracentrifuge, Beckman Coulter) a 100.000 g a 4°C durante 1 h con una aceleración máxima y una desaceleración 5, en un rotor oscilante (SW55Ti, Beckman Coulter). Se sacan los tubos y se mantienen inmersos en hielo hasta su fraccionamiento. Para medir la densidad de las fracciones se utiliza un tubo en el que en lugar de añadir muestra, se aplican 100 µL de 5% de iodixanol.

El fraccionamiento del gradiente tras la centrifugación se realiza empleando el módulo de fraccionamiento de la estación de gradientes. Para recoger 12 fracciones seleccionamos un desplazamiento del émbolo automático de 3,34 mm para cada fracción, que corresponde a ≈400 µL/fracción. El contenido de cada fracción se lava con PBS frío y se centrifuga a 20.000 g durante 40 min a 4°C para retirar el iodixanol.

Los precipitados resultantes se resuspenden en 50 µL de la solución TENT con inhibidores de proteasas y se sonicán en un baño de ultrasonido (Branson 2510) en frío durante 15 min. Las muestras son congeladas a -80°C hasta su posterior análisis.

3.4. Obtención del vector de expresión de VNUT-EGFP.

3.4.1. Diseño de oligonucleótidos de DNA para clonaje y secuenciación.

La secuencia de cDNA del transportador de nucleótidos vesicular (SLC17A9) (Sawada et al., 2008); VNUT bovino (2,2 Kb) fue tomada de la base de datos de NCBI (NM_001100378.2).

Para el clonaje de la región codificante del cDNA del VNUT (1,4 Kb) en el plásmido pEGFP-N1 (4,7 Kb), se seleccionaron las dianas *EcoRI* y *KpnI* de la posición de multiclonaje del vector de expresión (fig. 3.2). Así, los oligonucleótidos se diseñaron incorporando delante del codón de inicio, para el oligonucleótido *forward*, o detrás del codón de parada, para el oligonucleótido *reverse*, las secuencias específicas para las dianas de restricción de este par de enzimas. Además, se incluyó la secuencia *Kozak* en el oligonucleótido *forward* previa al codón de inicio.

Otros oligonucleótidos fueron diseñados para secuenciar el plásmido resultante del clonaje del VNUT en pEGFP-N1. En concreto se seleccionó la zona previa, para el cebador *forward* y posterior, para el cebador *reverse*, al sitio de multiclonaje del vector.

3.4.2. Aislamiento de RNA y síntesis de cDNA de cromafines bovinas.

El RNA total de las cromafines bovinas fue extraído a partir de 7×10^6 células usando el kit *RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA genómico residual fue eliminado mediante un paso de digestión con DNasa I. La cantidad y calidad de las muestras de RNA fue determinada por la medida de las densidades ópticas (OD) OD₂₆₀ y OD₂₈₀.

La reacción de retrotranscripción se llevó a cabo a partir de 1 µg del RNA total, usando cebadores oligo “d (T)” tal y como se describe en el protocolo del kit *iScript cDNA Synthesis* (BioRad).

3.4.3. Clonaje del VNUT bovino en pEGFP-N1.

Con el objetivo de generar un vector que nos permitiese expresar el VNUT unido a la proteína fluorescente verde EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) en líneas celulares y cultivos primarios de células cromafines bovinas se clonó el cDNA del VNUT en el vector de expresión pEGFP-N1 (fig. 3.2).

Para ello, se partió del cDNA total obtenido de células cromafines y se realizó una PCR con una polimerasa de alta fidelidad (Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System; Roche) con la que se incorporaron por medio de los oligonucleótidos específicos las dianas de restricción *EcoRI*, *KpnI* y la secuencia Kozak. Las condiciones de la reacción y los cebadores utilizados se describen en la figura 3.2.

Con el resultado de la PCR se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% y se extrajo el DNA de la banda correspondiente al VNUT con el kit de extracción *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

Posteriormente, tanto el inserto producto de la PCR como el vector pEGFP-N1 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI*. Posteriormente se realizó la ligación utilizando una T4 DNA-ligasa durante 16 horas a temperatura ambiente (RT). Tras ello, se transformaron bacterias DH5 α competentes y las sometimos a la resistencia del antibiótico kanamicina. Con los clones positivos realizamos una extracción del DNA con *plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare), y comprobamos por electroforesis tras la digestión con *EcoRI* y *KpnI* que la ligación era correcta. Posteriormente se realizó una extracción de DNA con *plasmidPrep Mini Spin Kit* (GE Healthcare) y se comprobó por medio de secuenciación, que el inserto era el correcto y se había ligado de la forma adecuada.

3.4.4. Preparación de las bacterias competentes y su transformación.

Para poder introducir DNA foráneo con alta eficiencia dentro de bacterias es necesario inducir el “estado de competencia” de las mismas. Para conseguir este estado, cultivos bacterianos de la cepa DH5 α de *E. coli* frescos, en fase logarítmica de crecimiento ($A_{660}=0,3-0,4$), fueron tratados, con la solución RF1: que contiene 100 mM de RbCl, 50 mM de MnCl₂, 10 mM de CaCl₂, 30 mM de acetato sódico, 15% de glicerol y pH 5,8 con ácido acético; durante 30 minutos a 4°C. Este tratamiento es necesario para debilitar la estructura de su pared celular haciendo que se puedan introducir en las células el DNA deseado. Una vez pasado el tiempo de incubación con la solución RF1, las bacterias fueron centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos a 4°C y resuspendidas en la solución RF2: 10 mM de RbCl, 75 mM de CaCl₂, 10 mM de MOPS, 15% de glicerol, pH 6,8 ajustado con NaOH. En esta solución, las bacterias son preservadas a -80°C, listas para la transformación.

Tras la ligación (apartado 3.4.3) se transformaron bacterias DH5 α competentes utilizando el protocolo de choque térmico. Para ello se descongeló una alícuota de bacterias competentes en hielo, se resuspendieron con el resultado de la ligación, y se mantuvieron 30 min en hielo. Se sometieron a un choque térmico de 42°C durante 45 s. Se añadió medio LB (para 1L: 10g de Triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl, pH=7 y se autoclava) y se agitaron a 37°C durante 60 min.

Posteriormente se sembraron en placas de agar-LB conteniendo 50 mg/mL del antibiótico kanamicina, lo cual seleccionará aquellos clones de bacterias que han incorporado los plásmidos, ya que el vector posee un gen de resistencia al mismo. (fig. 14A). Se incubaron a 37°C hasta el día siguiente.

3.4.5. Secuenciación de DNA y análisis de las lecturas.

Las reacciones de secuenciación han sido realizadas usando el kit *ABI Prism BigDye terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing* (Applied Biosystems) y la electroforesis y lectura fue realizada por el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Investigación del Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria. Para el análisis de lecturas y alineamiento con la secuencia de referencia se utilizó el software Geneious®.

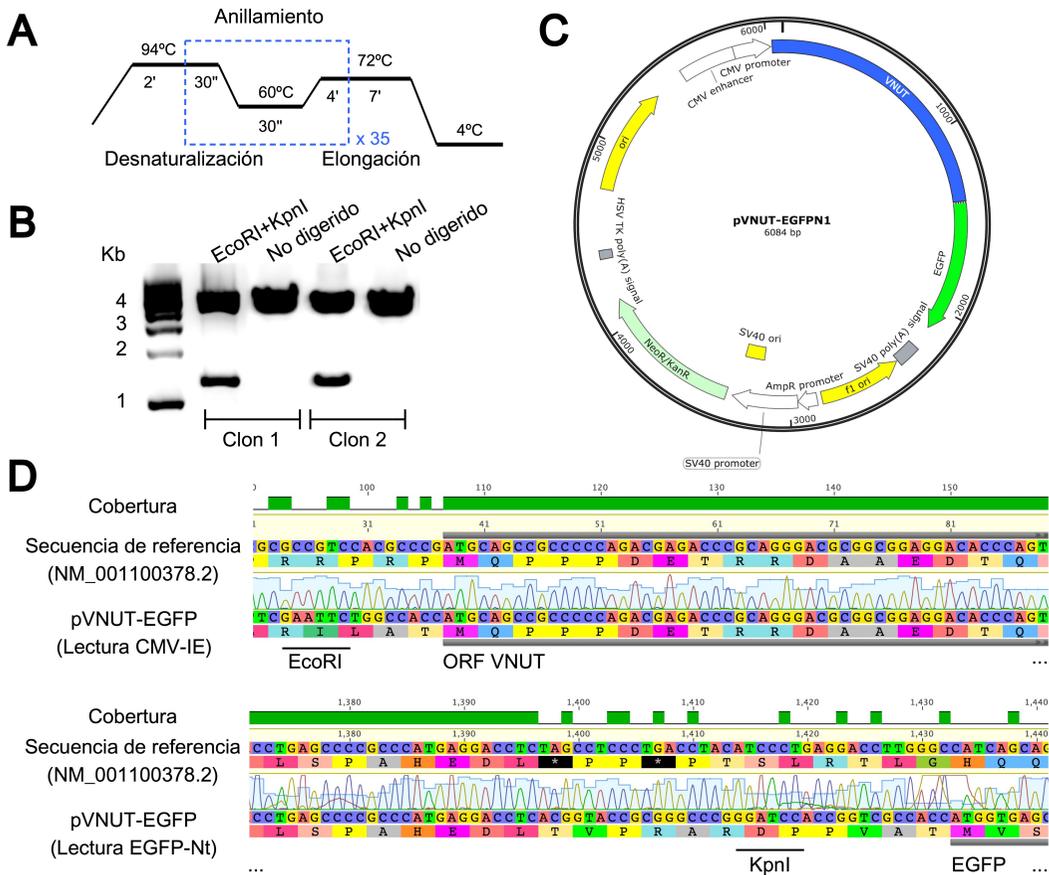


Figura 3.2. Vector plasmídico codificante para el VNUT-EGFP. **A.** Condiciones utilizadas para realizar la PCR del VNUT. **B.** Electroforesis del resultado de la digestión del plásmido VNUT-EGFP extraído de 2 clones bacterianos diferentes con las enzimas *EcoRI* y *NotI*. **C.** Esquema del vector, CMV promotor: promotor de la expresión de citomegalovirus; VNUT: secuencia codificante del VNUT bovino; EGFP: secuencia codificante de la EGFP; KanR/NeoR: gen de resistencia de la kanamicina y neomicina. **D.** Alineamiento entre las lecturas de secuenciación y la secuencia de referencia de la base de datos NCBI. En el panel superior se muestra el análisis de cobertura (verde) entre la lectura del VNUT-EGFP realizada por el oligonucleótido CMV-IE en el inicio de la pauta de lectura (ORF). Se puede leer la diana de restricción empleada para el clonaje (*EcoRI*). En el panel inferior se representa la cobertura del alineamiento entre la lectura realizada por el oligonucleótido EGFP-Nt y la secuencia de referencia del VNUT bovino. Se observa la secuencia final del VNUT sin el codón de parada; la diana de restricción empleada para el clonaje (*KpnI*) y la continuación de la pauta de lectura del EGFP.

3.5. Diseño de oligonucleótidos de siRNA.

Para el diseño de oligonucleótidos de siRNA (*small interference RNA*), se utilizó la herramienta siDESIGN (siDesign Center, GE Dharmacon) teniendo una serie de consideraciones. Primero, se seleccionaron regiones exónicas de la secuencia del VNUT de 21 nucleótidos de longitud evitando regiones próximas a 5' y 3' UTRs (*Un-Translated-Regions*). Además se evitaron regiones de repetición de 4 o más bases, como aquellas con $T_m < 30^\circ\text{C}$ y $> 60^\circ\text{C}$. Para asegurar que la secuencia era específica de la diana se realizó un alineamiento con el genoma bovino. Los siRNA control empleados fueron secuencias scramble diseñadas para el uso general en células de mamífero. Los dúplex del siRNA fueron marcados en la cadena sentido en el extremo 5' del oligonucleótido con el cromóforo Cy3. Las secuencias diana de los siRNAs utilizados fueron: VNUT siRNA 1 (Exón 7): 5'-GGAGACAGCTCTTCCGAAA-3' y VNUT siRNA 2 (Exón 2): 5'-GGTCATCCTGCTCTCGGCTT-3'.

3.6. La nucleofección de células.

Las células cromafines bovinas fueron electroporadas usando un dispositivo nucleofector siguiendo el protocolo recomendado por Amaxa[®]. La nucleofección requiere que las células estén en suspensión por lo que para células cromafines bovinas, el procedimiento se llevó a cabo tras el protocolo de aislamiento celular. En este caso se usaron $3 \cdot 10^6$ células por condición, resuspendidas en 100 μL de solución de nucleofección (*Basic Nucleofector[®] Kit for Primary Mammalian Neurons*) conteniendo los siRNAs (75 pMol) o hasta 3 μg de las construcciones de DNA. Esta suspensión celular fue transferida a una cubeta de electroporación y sometida al programa O-005. Las células fueron analizadas en un periodo entre 24 y 72 h post-nucleofección.

Para la línea celular 293T, la nucleofección se realizó empleando $3 \cdot 10^6$ células por condición resuspendidas en 100 μL de solución de nucleofección conteniendo el plásmido pVNUT-EGFP (3 μg) sólo o junto a los siRNAs (75 pMol) utilizando el programa Q-001. Las células fueron analizadas a 24 y 48h después de la nucleofección.

3.7. Determinación de la expresión del VNUT por PCR cuantitativa (qPCR).

3.7.1. Diseño de oligonucleótidos de qPCR.

En el diseño de los oligonucleótidos para qRT-PCR cada pareja fue seleccionada en base a 3 criterios. Primero se determinó que debían ser específicos de la secuencia del VNUT bovina. Para ello se realizó un *nucleotide BLAST* con las secuencias candidatas a oligonucleótidos con el objeto de ser alineadas con el genoma bovino. Segundo, cada pareja de cebadores fue diseñada teniendo en cuenta la temperatura de *melting* (T_m). En concreto, hemos determinado el uso de oligonucleótidos con T_m de 59°C ($\pm 1^\circ\text{C}$). El tercer criterio fue la longitud del amplicón. La longitud media seleccionada fue de ≈ 100 bp.

3.7.2. PCR cuantitativa.

Para cuantificar la expresión del VNUT en células cromafines bovinas se realizó PCR cuantitativa (qPCR) partiendo de muestras de RNA que previamente retrotranscribieron (qRT-PCR) mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.4.2.

En este estudio, la qPCR se realizó con la mezcla *iQ SYBR Green supermix* ($Abs_{max} = 497$ nm, $Emm_{max} = 520$ nm) (Bio-Rad) en un sistema termociclador *Bio-Rad Mini Opticon Real-time PCR*. Las muestras se prepararon por triplicado siguiendo el protocolo que recomienda el fabricante. Los cebadores usados para analizar la expresión del VNUT y GAPDH fueron los siguientes:

VNUT	qPCR	<i>forward</i> :	5'-GGAGGGGGCCGTCCTATGCA-3';
VNUT	qPCR	<i>reverse</i> :	5'-GAGGCAGGGCTGGCTGTTGG-3';
GAPDH	qPCR	<i>forward</i> :	5'-GGAAGCTCACTGGCATGGCCT-3';
GAPDH	qPCR	<i>reverse</i> :	5'-CGCCTGCTTACCACCTTCTTG-3'.

3.7.3. Eficiencia de la qPCR.

Para cada pareja de oligonucleótidos, se realizó una curva de eficiencia de la reacción mediante diluciones de la muestra de cDNA. El valor de C_T frente al \log_2 de la dilución fue representado y a partir del ajuste

lineal se calculó la pendiente de la recta para cada pareja de cebadores. La eficiencia de la PCR viene dada por la fórmula $X_n = X_0 + (1+E)^n$; donde X_n es el número de moléculas diana amplificadas en el ciclo n , X_0 es el número inicial de moléculas diana y E es la eficiencia. La eficiencia $E = 2^{1/a} - 1$, siendo a la pendiente de la recta.

3.8. Técnicas de detección de proteínas.

3.8.1. *Western-blot*.

3.8.1.1. Preparación de la muestra.

Las células (cromafines bovinas o HEK293) y las fracciones vesiculares se lisaron en una solución TENT 1% (50 mM de Tris-HCl a pH 7,4, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 1% de Tritón-X100, suplementada con un cóctel inhibidor de proteasas (cOmplete[®], Roche). Posteriormente se sometieron a ultrasonidos con un sonicador Labsonic[®] M (Sartorius) o de baño (Branson 2510) y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

La cantidad total de proteínas en cada muestra fue determinada por el método del ácido bicinconínico o por la tinción con azul de Coomassie de un *dotblot* (apartado 3.8.2).

3.8.1.2. Separación de proteínas mediante electroforesis SDS-PAGE.

La separación de proteínas se realizó en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE, “sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”). Los extractos de proteínas se mezclaron con el tampón de carga 6x (*Laemmli*) de forma que la muestra quedara a una concentración final de 1x, para conseguir la desnaturalización de las proteínas, dar densidad homogénea a la muestra y teñirla de azul para visualizar su avance en el gel durante la electroforesis. Además, las muestras se sometieron a desnaturalización de las proteínas, durante 5 min a 95°C . Se utilizaron geles discontinuos con una zona de compactación (“stacking” 4 %) y otra de separación (“running” 7,5 %).

Para su elaboración se usó el sistema diseñado para tal fin de BioRad. La composición del gel de empaquetamiento fue: poli(acrilamida al

4%, 0,13 M de tampón Tris-HCl a pH 6,8; 0,1% de SDS; 0,12% de APS; 0,13% de TEMED. El gel de separación estaba compuesto por: poliacrilamida al 7,5%, 0,38 M de tampón Tris-HCl a pH 8,8; 0,1% de SDS; 0,08% de APS; 0,08% de TEMED.

Se cargó cada muestra en el gel y junto a ellas un marcador de pesos moleculares (*Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio Rad*). La electroforesis se llevó a cabo en el sistema *Mini Trans-Blot® Cell* (BioRad) con el tampón de electroforesis SDS-PAGE (0,025 M de Tris-base, pH 8,3, 0,192 M de glicina, 0,1% de SDS) a un amperaje constante de 40 mA por gel.

3.8.1.3. Transferencia de las proteínas a membrana.

Las proteínas separadas por electroforesis se transfieren a una membrana de polivinilideno difluoruro (PVDF, “polyvinylidene difluoride”, Immobilon-P Transfer Membranes, Millipore) de 0,45 μm de poro, durante 1 h y a un amperaje constante de 300 mA. Las membranas de este tipo deben ser activadas antes de la transferencia, para ello se sumergieron durante 15 s en metanol absoluto, 2 min en agua milliQ y por último 5 min en el tampón de transferencia. Después de la transferencia, la membrana se reactiva y se bloquea durante 30 min, a temperatura ambiente y en agitación horizontal, en una solución de leche desnatada (Svelty®, Nestle) al 5 % en TBSt 1x (0,05 M de Tris; 0,150 M de NaCl y 0,1% de Tween-20), para evitar uniones inespecíficas de los anticuerpos utilizados. Tras el bloqueo se lavaron las membranas con TBSt 1x tres veces durante 5 min a temperatura ambiente y en agitación.

Posteriormente, se procedió al marcaje con el anticuerpo primario, preparado en una solución de PBS (136,9 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de Na_2HPO_4 , 1,76 mM de KH_2PO_4) con 1% de BSA (Bovine Serum Albumin) y 0,01% de azida sódica, durante toda la noche a 4°C (diluciones de anticuerpos descritas en el apartado 3.2)

Entonces, las membranas se lavan en TBSt 1x tres veces durante 5 min, a temperatura ambiente y en agitación. A continuación se marca con el anticuerpo secundario que está conjugado con la peroxidasa de rábano, diluido 1/10.000 en TBSt 1x. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron

los siguientes: anti-cabra (P0160, Dakocitomotio), anti-conejo (NA934, Amersham GE Healthcare) y anti-ratón (NA931, Amersham GE Healthcare). Luego, la membrana se lavó tres veces en TBSt durante 5 min. Finalmente, se reveló el marcaje añadiendo el sustrato de la peroxidasa (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad). La señal de quimioluminiscencia emitida se detectó con el sistema de captura de imagen (ChemiDoc™ MP, Biorad) y se analizó usando el software provisto por el fabricante (ImageLab).

Para marcar la membrana con otros anticuerpos se realiza un proceso de “stripping” (término utilizado para describir la eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios de un marcaje previo en una membrana de western blot). Primero, se emplea una solución de “stripping” (152 mM de glicina; 0,1 % (p/v) de SDS; 1 % (v/v) de Tween-20; a pH 2-3) con la que se trata la membrana durante 30 min. Luego se hacen dos lavados de 10 min en una solución de NaCl 50 mM, y por último, dos lavados de 5 min con TBSt, todo a temperatura ambiente y en agitación. A continuación, se puede volver a comenzar con el proceso de bloqueo y marcaje descrito anteriormente.

3.8.2. Dot-blot.

Los lisados de las células cromafines sometidos a estimulación en los ensayos de secreción a punto final (apartado 3.9.1) así como las muestras de secreción recogidas en los ensayos de secreción a tiempo real (en el apartado 3.9.2) fueron concentrados en una membrana de PVDF usando un dispositivo *dotblot* de 48 pocillos (Slotblot, GE Healthcare, Europe GmbH) conectado a una bomba de vacío. Una vez que las muestras atravesaron la membrana, los pocillos fueron lavados con una solución de TBSt 1x y la membrana fue tratada para el inmunomarcaje como se detalló en el apartado anterior. Para la tinción con azul de Coomassie se empleó una solución comercial según las indicaciones del producto.

3.8.3. Inmunofluorescencia.

Las células cromafines ($5 \cdot 10^5$ células cultivadas) sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro tratados con 0,01% de poli-D-lisina fueron fijadas durante 10 min a RT en una solución de 4%

paraformaldehído en PBS. Tras ello, las células se lavaron 3 veces e incubadas durante 1 h en la solución de permeabilización (0.1% Tween-20 en PBS). A continuación, se trataron con la solución *quenching* (100 mM de glicina en PBS) y se bloquearon con 5% de FBS en la solución de permeabilización. La incubación con los anticuerpos primarios anti-CgB y anti-VNUT, ambos a 1:100 en la solución de bloqueo, se realizó durante toda la noche en una cámara refrigerada en agitación orbital. El anticuerpo anti-TH se empleó a una dilución 1:1000.

Al día siguiente, los anticuerpos fueron retirados y las células se lavaron, con PBS, 3 veces durante 10 min para ser incubadas con los anticuerpos secundarios marcados con fluoróforos anti-IgG de ratón hecho en cabra (Alexa Fluor® 568) para el marcaje de la TH, anti-IgG₁ de ratón hecho en burro (Alexa Fluor® 488), para detectar el VNUT y anti-IgG de cabra hecho en burro (Alexa Fluor® 568) para el marcaje de la CgB; todos diluidos a 1:500 en la solución de bloqueo durante 1 h a RT. Tras 3 lavados con PBS durante 10 min, los cubreobjetos fueron retirados de la solución y montados usando la Fluoroshield® con DAPI (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain). Las imágenes de microscopía se tomaron en secciones medias xy en un microscopio confocal Leica TCS SP8 (Leica Microsystems). Las imágenes finales fueron analizadas empleando el software Metamorph (UniversalImaging Corp., Downington, PA).

3.8.4. Citometría de flujo.

Las células 293T (2×10^5) tras 24 y 48 h desde la nucleofección fueron lavadas y resuspendidas en PBS con 0,1% BSA. Para hacer un análisis cuantitativo del efecto de los siRNAs del VNUT sobre la expresión del VNUT-EGFP se midió la fluorescencia mediante un citómetro de flujo (XL-MCL system, Beckman-Coulter Inc., UK) usando el filtro FL1 y substrayendo la señal basal de células que no contenían el plásmido. El análisis de los datos de citometría de flujo fue realizado por el software WinMDI®.

3.9. Ensayos de secreción de las células cromafines bovinas.

3.9.1. Secreción a punto final.

Las células cromafines ($5 \cdot 10^5$ células por pocillo) fueron cultivadas en placas de 24 pocillos tratadas con 0,01% de poli-D-lisina. Inmediatamente antes de empezar los experimentos, las células fueron lavadas dos veces con la solución Krebs-HEPES: 140 mM de NaCl; 5,9 mM de KCl; 1,2 mM de $MgCl_2$; 2 mM de $CaCl_2$; 10 mM de HEPES y 11 mM de glucosa a pH 7,4 y seguidamente incubadas en la misma solución suplementada con 100 μM del inhibidor selectivo de ecto-ATPasas ARL67156 (Levesque et al., 2007) durante 30 min a 37°C con y sin la presencia de 500 μM N-Ethylmaleimide (NEM); 2,5 μM de oligomicina; 10 μM de Evans Blue (EB); 100 μM de ácido iodoacético (IAA) o glucosa. A continuación las células fueron expuestas durante 5 min a la misma solución (secreción basal o constitutiva) o con 100 μM del agonista nicotínico DMPP (secreción estimulada o regulada) durante 5 min a 37°C. Después de la incubación, el medio de secreción (200 μL) fue colectado y las células fueron lisadas en 200 μL de TENT. Las muestras se centrifugaron a 900 g durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes fueron sometidos al análisis de la determinación de ATP, la medición de las CA por cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica (HPLC-ED) o la determinación de la cantidad de proteínas mediante ensayos de *dot-blot* en el caso de las muestras de lisados celulares (ver apartado 3.8.2).

Los experimentos de sobrecarga de CA en el citosol se realizaron incubando las células en cultivo con 100 μM de L-DOPA y 10 μM de pargilina durante 90 min (Colliver et al., 2000). La L-DOPA es permeable a la membrana y es el sustrato de la enzima L-aminoácido-aromático descarboxilasa presente en las células cromafines por lo que provoca un incremento de CA en el citosol.

3.9.2. Secreción a tiempo real.

Para estudiar la secreción de un conjunto de células cromafines online, $3 \cdot 10^6$ células fueron nucleofectadas con oligonucleótidos de siRNA o con la construcción NPY-EGFP y sembradas en placas Petri de 92 mm de diámetro y mantenidas en las condiciones de cultivo especificadas

hasta 24-48 h después de la transfección. Antes del experimento, las células fueron separadas de la placa de cultivo empleando una espátula y lavadas con Krebs-HEPES por medio de una centrifugación a 600 g durante 5 min. Luego, los precipitados celulares se resuspendieron en 100 μ L de la misma solución y fue cargada sobre una microcámara que contenía con un filtro de cigarrillo. Las células empaquetadas en la microcámara fueron perfundidas con la solución Krebs-HEPES a una velocidad de 1 mL/min y el flujo que atraviesa las mismas es dirigido hacia un detector electroquímico (LC-4B, BioAnalytical System) con un potencial de oxidación de +650 mV, conectado a un sistema de adquisición PowerLab 8/30 (ADInstruments). Las células fueron estimuladas a la secreción de CA cada 3 min mediante pulsos de \approx 15 s de duración (\approx 400 μ L) con una solución de 10 μ M DMPP disuelto en Krebs-HEPES mediante un inyector de 6 vías. Tras el protocolo de estimulación repetitiva, se realizó la inyección de una solución al 0,1% de Triton-X100 para determinar la cantidad de CA contenidas en las células en cada experimento.

La secreción de CA fue cuantificada mediante la integración de las curvas sobre los niveles basales.

3.10. Determinación de ATP secretado por luminiscencia mediada por luciferina-luciferasa.

La determinación cuantitativa del ATP se realizó mediante un ensayo de detección de la bioluminiscencia emitida tras la reacción entre la D-luciferina y el ATP mediada, reacción mediada por la enzima luciferasa (fig. 3.5).

Usando el kit de determinación de ATP (*ATP Determination Kit*; Life Technologies) con las indicaciones del productor; realizamos curvas de calibrado con concentraciones conocidas de ATP (1 a 10.000 nM) por las que podemos extrapolar el valor de luminiscencia de muestras de concentración del ATP desconocido.

La medición se realiza en una placa blanca de 96 pocillos a la que se añaden 10-50 μ L de la solución estándar de ATP o el mismo volumen de las muestras a determinar. El luminómetro estándar empleado

(Luminoskan Ascent, Termolab Systems) permite la inyección automática de la mezcla de luciferina-luciferasa y las lecturas de luminiscencia fueron registradas antes y después de la adición de la misma. Se realizó un registro en cada pocillo de la cinética de la reacción 27°C durante 15 s a un voltaje de 1200 PMT.

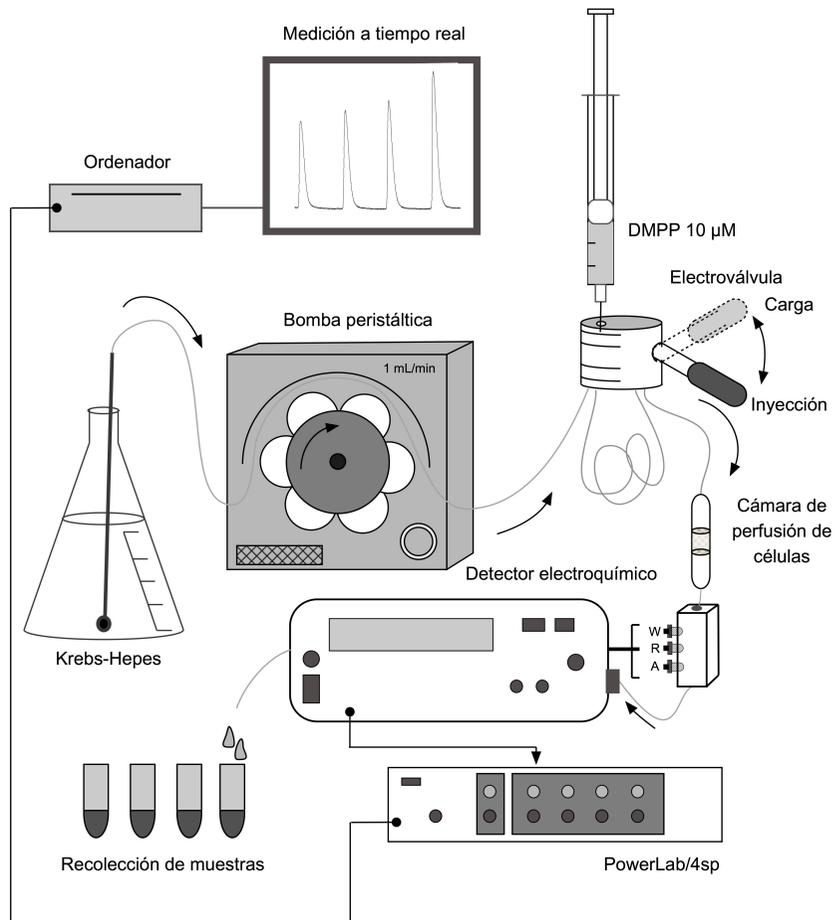


Figura 3.3. Esquema del equipo utilizado para la determinación de la secreción a tiempo real. Mediante una bomba peristáltica se bombea Krebs-HEPES a las células, de ahí pasa por el detector amperométrico (detector: W-trabajo, R-referencia, A-auxiliar) para, finalmente, recoger muestras para ser analizadas por *dot-blot*. Mediante un inyector de 6 vías se aplica el estímulo (DMPP 100 durante 10 s). El powerlab/4sp permite la adquisición de los datos que se almacenan en el ordenador para su posterior análisis.

Para el análisis de las CAs mediante HPLC-ED, las muestras de secreción y los lisados celulares fueron diluidos para obtener una concentración de 0,05 N de ácido perclórico (PCA) y 200 nM de dihydroxybenzylamine (DHBA) como estándar interno.

Las muestras se inyectaron por medio de un inyector automático (modelo SIL-6B, Shimadzu) y se separaron en un cromatógrafo (modelo Shimadzu) a un flujo de 1 mL/min empleando una columna (Tracer Analítica, Teknokroma, Barcelona) de 12,5 cm de largo relleno Spherisorb ODS-2 con un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil para la separación de CA que se empleó fue un tampón fosfato: 9,66 g/L de NaH_2PO_4 ; 0,00372 g/L de EDTA y 1 g/L de heptasulfonato sódico. El pH se ajustó a 3,1 con ácido fosfórico. Se añadió metanol al 7-10% (v/v). La mezcla se filtró mediante un filtro de 0,22 mm (Millipore) y se desgasificó por burbujeo con helio (Borges et al., 1986).

La detección electroquímica se llevó a cabo un voltaje constante de +650 mV frente a un electrodo de referencia lo cuál es suficiente para oxidar las CA, ya que su potencial redox está en torno a los +500 mV (Chow et al., 1992; Leszczyszyn et al., 1990). Se empleó un detector electroquímico (modelo LC- 4B, Bioanalytical Systems, USA) y una frecuencia de adquisición de 1 Hz empleando un programa de adquisición desarrollado en nuestro laboratorio por el Dr. Yézer González.

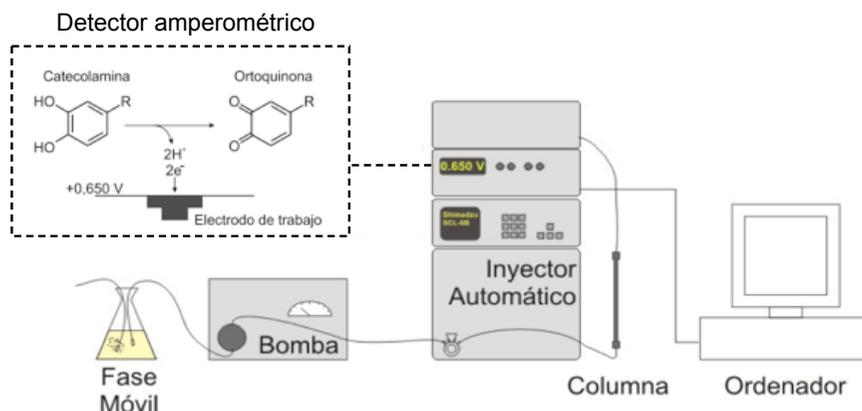


Figura 3.4. Esquema del equipo cromatográfico y de la reacción de oxidación de las CA ante un potencial de oxidación. Las CA poseen dos residuos en el anillo catecol que son fácilmente oxidables, dando lugar a la liberación de dos protones y dos electrones por cada molécula oxidada.

Para el análisis de los picos cromatográficos de las catecolaminas utilizamos el estándar interno didihydroxibenzilamina (DHBA) a una concentración conocida (200 nM). Debido a que cada molécula se comporta de diferente manera al pasar por la columna (en tiempo de retención y en el área bajo la curva) hay que calcular el factor de corrección (FC) para cada una de las moléculas. Para ello se inyecta una mezcla de estándares (adrenalina, noradrenalina, dopamina y DHBA) a una concentración de 200 nM. Una vez obtenida el área bajo la curva de cada pico se normaliza por el área del DHBA obteniendo así cada factor de corrección. En cada muestra se mide el área bajo la curva de la molécula de interés y se utiliza el área de DHBA para conocer la concentración de la catecolamina en cuestión.

$$\text{Concentración (nM)} = \frac{\text{área CA} \times \text{FC} \times [\text{DHBA}]}{\text{área DHBA}}$$

donde,

área CA, es el área bajo la curva de cada una de las CA; FC, es el factor de corrección para cada CA (área DHBA / área CA); [DHBA], es la concentración del estándar interno; área DHBA, es el área bajo la curva del estándar interno.

Una vez calculada la concentración de las moléculas de interés se normalizan los datos por la proteínas totales de la muestra (determinado por el método del ácido bicinconínico o por la tinción azul de Coomassie de un *dot-blot*) y así se pueden comparar las diferentes condiciones experimentales. Las comparaciones se realizaron con el test de U de Mann-Whitney.

3.12. La amperometría en célula única.

3.12.1. Elaboración de los electrodos de carbono.

3.12.1.1. Fabricación.

La fabricación de microelectrodos se ha llevado a cabo siguiendo el proceso descrito previamente (Kawagoe et al., 1993) con las modificaciones que se describen en (Machado et al., 2008). Brevemente,

con una bomba de aire se aspira una fibra de carbono de 5 μm de diámetro (Thornel P-55; Amoco Corp., Greenville, SC) en un capilar de borosilicato (*World Precision Instruments*). El capilar se estira y escinde en un estirador de pipetas (PC-10, Narishige, Tokio, Japón). Se corta la fibra de carbono de tal manera que se aproxime al extremo del capilar. Se examinan en un microscopio (Erma, Opticalworks, Japón) rechazando aquellos que en la punta el capilar posean un diámetro superior a $\approx 15 \mu\text{m}$.

Para conseguir un sellado adecuado entre la fibra de carbono y las paredes del capilar, la punta de los electrodos se sumerge en una resina tipo epoxi (Epo-tek[®]301) durante ≈ 40 s. Esta resina consiste en dos componentes (A y B), se mezcla a temperatura ambiente en una relación 4:1 (por peso) hasta que quede totalmente homogénea. Después los electrodos endurecen durante toda la noche en un horno a 150°C .

Para conseguir un microelectrodo de superficie activa uniforme se pulen a 45° en una pulidora de diamante negro (Modelo EG-40, Narishige) utilizando 2-propanol como lubricante que contribuye a eliminar grasa. Una descripción detallada sobre la construcción de electrodos puede encontrarse en (Machado et al., 2008).

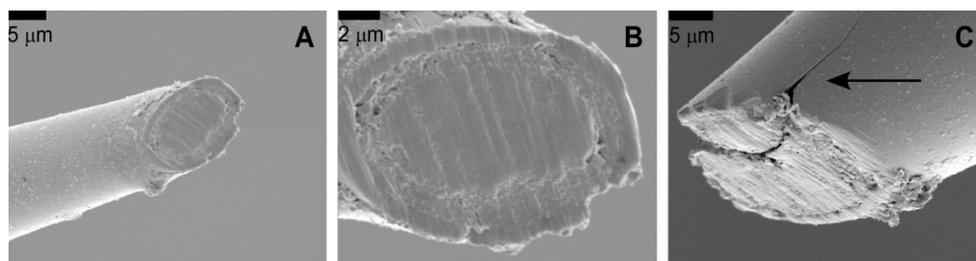


Figura 3.5. Apariencia de un microelectrodo de carbono ya pulido. Imagen tomada mediante microscopía electrónica de barrido. **A y B.** Vista a distinto aumento de un electrodo pulido. **C,** grieta en otro electrodo imperceptible bajo el microscopio óptico (Tomado de Machado et al., 2008).

3.12.1.2. La calibración.

La calibración de cada electrodo se realiza antes de cada experimento. Es importante para comprobar el estado de la superficie activa, asegurando así que las respuestas sean reproducibles, que la proporción señal-ruido sea adecuada y la corriente basal estable. Para la

calibración se utiliza un sistema de inyección con parada de flujo (FIA: *Flow Injection Analysis*), lo que permite exponer el electrodo, de forma rápida a las catecolaminas que en nuestro caso es NA, a una concentración de $50 \mu\text{M}$. Con este sistema se comprueban las características del electrodo en *flujo continuo*, lo que nos da una idea del comportamiento del electrodo frente a una concentración constante de CA, y en *parada de flujo*, lo que nos da una idea de las características propias del electrodo, ya que en este caso no está condicionada por el flujo. Lo ideal es que existan pocas diferencias entre la señal máxima en flujo continuo y en parada de flujo, y que las respuestas se detecten en el rango de milisegundos (fig. 3.6).

La señal amperométrica se acondiciona en un potenciostato (EI400, Ensmann Instrumentation, Bloomington, IN, USA) y se registra y digitaliza a través de un conversor, USB-6009 de 14 bits (National Instruments, Austin, Texas, USA), controlada por un software diseñado por el Dr. Yézer González Morales en nuestro laboratorio, con el cual la señal se registra en un osciloscopio digital.

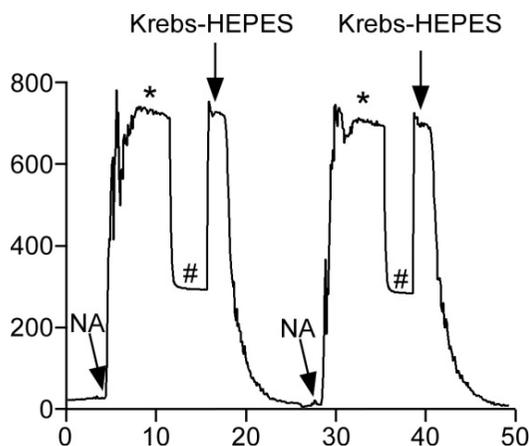


Figura 3.6. Calibración de un electrodo en el sistema de perfusión con $50 \mu\text{M}$ de NA. En el registro se pueden apreciar 2 pulsos de NA, cada uno de ellos con dos alturas de corriente. La altura mayor (*) corresponde a un estado de flujo continuo y la segunda altura (#) a un estado de parada de flujo. Este segundo estado advierte de las propiedades del electrodo, ya que no está sujeto a flujo. Tras aplicar NA y parar el flujo, se aplica Krebs-HEPES para lavar el sistema y la corriente vuelve a la señal basal. Como se puede apreciar las respuestas son reproducibles y la corriente basal es pequeña y estable.

3.12.2. Construcción de micropipetas para aplicar sustancias.

Las micropipetas para la aplicación de sustancias, a diferencia de los sistemas de perfusión tradicionales, permite controlar el tiempo de aplicación y la distancia a la célula. La construcción sigue un procedimiento sencillo. Un capilar de borosilicato, idéntico a los descritos en la construcción de electrodos, (WPI ref# IB120F-4, World Precision Instruments, UK) se escinde, en un proceso de dos pasos en un estirador de pipetas (PC-10, Narishige, Narishige, Japón). De esta manera conseguimos dos micropipetas, cada una de ellas con una punta de un diámetro aproximado de 5 μm . Las micropipetas se rellenan con la solución secretagoga y se sitúan lateralmente a $\approx 40 \mu\text{m}$ de la célula. La liberación de estas sustancias se lleva cabo mediante aplicación de presión positiva.

3.12.3. Detección amperométrica de la exocitosis.

Los registros amperométricos se llevaron a cabo, en el interior de una jaula de Faraday, usando un amplificador (VA-10X, npi electronic GMBH, Alemania). El electrodo de trabajo se coloca en el portaelectrodo del preamplificador con plata clorurada y se monta sobre un micromanipulador motorizado (World Precision Instruments) unido a la platina de un microscopio invertido (Leica DM-IRB, Wetzlar, Alemania). Un sistema similar se monta en el otro lado, permitiendo el posicionamiento de la micropipeta para aplicar sustancias por presión positiva. Este sistema de inyección por presión, fabricado en nuestro laboratorio, está regulado por electroválvulas (Lee, Westbrook, USA) que pueden ser controladas manualmente o por ordenador. Las células se colocan en una cámara de metacrilato que tiene incorporado un electrodo de microagregados de plata (Ag/AgCl) (WPI #Ref EP2), que sirve de electrodo de referencia. Entre los dos electrodos se ajusta el potencial de oxidación a + 650 mV. La frecuencia de muestreo es de 4 KHz, dando así una buena resolución temporal. La señal se filtra a 1 KHz (filtro tipo Bessel 8 polos) haciendo uso del programa de adquisición y control del amplificador PowerLab/LabChart (ADInstruments, Australia).

3.12.4. Análisis de datos amperométricos.

El análisis de datos amperométricos se llevó a cabo usando ficheros con formato binario de IGOR-Pro (Wavemetrics, OR, USA) y empleando una serie de programas desarrollados en nuestro laboratorio, que permiten la automatización del proceso de análisis, el programa se denomina “Spike 32” (Segura et al., 2000).

Estos programas nos permiten: calibrar la señal adquirida según la ganancia del potenciostato; filtrar digitalmente la señal amperométrica, pudiendo elegir entre varios tipos de filtros, mejorando así la relación señal/ruido sin añadir artefactos de sobrefiltrado; identificar los picos amperométricos de forma automática y objetiva, mediante un algoritmo de búsqueda basado en la primera derivada; obtención de los parámetros cinéticos de cada evento; revisión manual de los registros y realización de un estudio estadístico preliminar del conjunto de experimentos seleccionados. En este caso, la estadística puede ser aplicada a los datos agrupados por células o directamente al total de los eventos amperométricos, sin agrupar, obtenidos durante un experimento individual (Colliver et al., 2000).

3.12.5. Parámetros cinéticos de las espigas.

En la figura 9 se puede ver una fragmento de un registro amperométrico, obtenido de una célula única después de la aplicación de un estímulo secretagogo. La secreción de CA es discontinua, y cada deflexión o “espiga” se corresponde con la medición de CA secretadas desde una sola vesícula (Wightman et al., 1991).

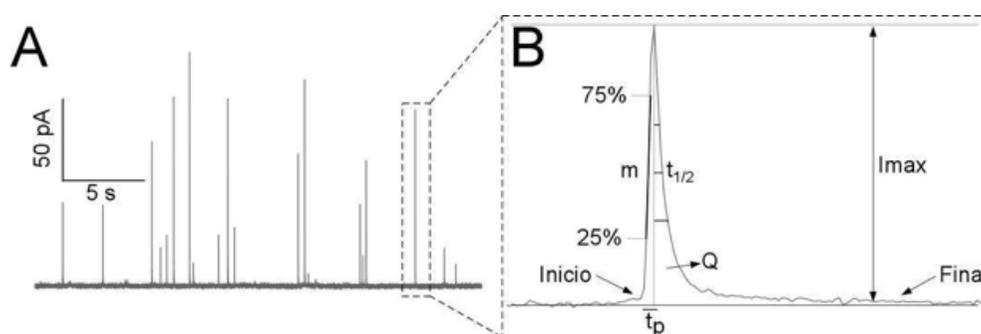


Figura 3.5. Registro amperométrico. A. Fragmento de un registro amperométrico típico. **B.** Ampliación de una de las deflexiones o espigas del registro, y los parámetros que

caracterizan su morfología y cinética (explicación en el texto).

Una vez identificadas las espigas, de forma automática con el programa, se obtienen los parámetros cinéticos, que se describen a continuación para cada evento:

- **Q**, se obtiene por integración del área bajo la curva y se corresponde con el contenido de CA oxidadas proveniente de una vesícula. Se expresa en pC.

- **Imax**, es la amplitud máxima de corriente e indica la concentración máxima alcanzada en la superficie del electrodo expresada en pA.

- **t_{1/2}**, se define como el ancho de la espiga a la mitad de la amplitud máxima, expresada en ms.

- **m**, es la pendiente media de ascenso entre el 25 y 75% del valor máximo de amplitud, expresado en nA/s.

- **tp**, es el tiempo al pico, es decir, el tiempo necesario en alcanzar la amplitud máxima, expresado en ms.

Una vez determinados estos parámetros, el programa permite su exportación a otros programas para la cuantificación de la secreción total por integración de la señal y su posterior análisis estadístico.

3.12.6. Criterios de selección de espigas.

Para la determinación de los parámetros cinéticos se deben seguir una serie de criterios que nos aseguren la objetividad del análisis. Por lo tanto, debemos excluir del análisis aquellas espigas que no cumplan los siguientes criterios:

- Cuya morfología no permita cuantificar sin error, alguno de los parámetros indicados más arriba.

- Que tengan un valor de Q inferior a 0,015 pC y superior a 7 pC, el rango en el que se encuentra el contenido en CA (Machado et al., 2008).

- Que tengan un valor de Imax inferior a 3 pA. En condiciones normales y tras filtrar el registro amperométrico, se obtiene un ruido de 1,1

pA de amplitud media y 0,32 pA de desviación estándar (SD). Si establecemos como límite 10 veces la SD, 3 pA es un buen límite de corte inferior.

- Que tengan un “pie” de altura igual o superior a 1/3 del valor de I_{max} , ya que puede tratarse de dos espigas superpuestas.

3.13. La microscopía de epifluorescencia y TIRF.

3.13.1. Adquisición de las imágenes de microscopía.

Las imágenes se obtuvieron usando un microscopio invertido (Zeiss 200M, Axiovert, Alemania) a través de un objetivo de apertura numérica de 1,45 (α Fluor, 100X/1,45, Zeiss) tal y como está descrito en (Barroso-Gonzalez et al., 2009). Brevemente, el objetivo fue acoplado al cubreobjetos a través de un aceite de inmersión ($n_{488} = 1,518$; Zeiss).

Para la iluminación de campo evanescente, se empleó luz monocromática (488 nm) y coherente de un láser de iones de argón (Laso, Lasertechnik GmbH, Alemania) que fue filtrada con un filtro paso banda (488/10; Zeiss) y que utilizamos para excitar de manera específica la proteína fluorescente (EGFP). El haz luz se centró en una posición en el plano focal posterior del objetivo. Después de introducir el cubreobjetos, la luz se sometió a la reflexión interna total al chocar contra la interfaz entre el vidrio y la solución o de células en un ángulo determinado. La reflexión interna total genera un campo evanescente que disminuye exponencialmente al aumentar la distancia desde la interfaz, dependiendo del ángulo en el que la luz incide en el interfaz (Axelrod et al., 1983; Steyer and Almers, 2001). El rayo láser fue incidido sobre el cubreobjetos a 64-66° respecto a la normal.

La luz de excitación (488 nm) fue dirigida al objetivo por un espejo dicróico 510-nm y un filtro de emisión HP525/50 BP. Todos los filtros fueron obtenidos de Chroma Technology (Brattleboro, VT, USA). Las imágenes se proyectaron sobre una cámara digital CCD-EM (C9100-13, Hamamatsu Photonics, Japón). Cada imagen se registró usando el software de adquisición HC Imagen de (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón) durante una exposición de 300 ms.

3.13.2. Análisis de la co-localización.

De forma similar a como se describe en (Barroso-Gonzalez et al., 2009b), el solapamiento entre las diferentes moléculas fluorescentes fue determinado tomando imágenes de microscopía confocal. Las imágenes fueron filtradas usando un filtro paso bajo de 3x3 píxeles empleando el software Metamorph (Universal Imaging, PA, USA.).

Con el objetivo de calcular la señal de ruido de fondo, cada estructura y 5 regiones fuera de las mismas fueron trazadas mediante una pequeña región de interés (ROI; círculo de 0,8 μm \varnothing).

Los círculos discretos designados en cada imagen registrada con fluorescencia verde (VNUT) se trasladan a la misma imagen, en sus mismas posiciones de designación originales, pero registrada para la fluorescencia roja (CgB). Se consideró co-localización positiva VNUT/CgB cuando la fluorescencia en el canal verde cuando la intensidad de fluorescencia fue al menos la media más tres veces la desviación estándar de la señal de fondo.

El porcentaje de co-distribución se determinó en cada célula después de la substracción de la co-distribución aleatoria y los valores medios fueron calculados para el número total de células analizadas. Las imágenes fueron rotadas 90° y la co-distribución de las moléculas se calculó de nuevo como se ha descrito para determinar si la correlación observada no fue debida a un solapamiento aleatorio de la señal. De esta forma, si la co-localización observada fuera aleatoria, la rotación de la imagen no cambiaría el grado de solapamiento de señal después de la rotación de la imagen.

3.14. Medidas de concentración de calcio intracelular.

Las células cromafines nucleofectadas con los oligonucleotidos interferentes fueron sembradas en cubreobjetos de vidrio de 12 mm de diámetro a una densidad de 300.000 células. Tras 24 horas, las células cromafines fueron lavadas de su medio de cultivo con Krebs-HEPES y tratadas con 2 μM de la sonda de calcio Fluo-4 (Molecular Probes, Invitrogen, Barcelona, Spain) durante 45 min a 37°C. A continuación, las células fueron lavadas durante 45 min a RT y los cubreobjetos fueron

colocados en una cámara celular montada sobre la platina de un microscopio Zeiss Axiovert 200 bajo perfusión continua de Krebs-HEPES. La fluorescencia de las células fue excitada a 488 nm (100 ms de excitación cada 1 s, con 10-nm de ancho de banda) usando un láser de argón (Lasos, Lasertechnik GmbH, Germany). Las imágenes de la fluorescencia emitida, obtenidas con un objetivo 20x Fluar, se colectaron usando un filtro dicróico 510-DCLP y un filtro de emisión D525/50 (Chroma Technology, Rockingham, VT). Los registros se realizaron mediante la captura de imágenes grabadas por una cámara CCD (Axio CamMRm, Zeiss). La señal fluorescente de cada célula fue analizada en el tiempo empleando el programa Metafluor (Universal Imaging Corporation, PA). El análisis estadístico fue llevado a cabo por un test *t* de Student.

3.15. Análisis estadístico.

Los conjuntos de datos están expresados como las medias \pm SE. La significación estadística entre los grupos experimentales fue obtenida mediante el test *t* de Student o el no paramétrico de Mann Withney. Las diferencias fueron consideradas significativas a un nivel de $p < 0,05$. Los datos fueron analizados por el programa Prisma (Graphpad Software, San Diego, USA).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. El transportador de nucleótidos vesicular se expresa en las células cromafines y se localiza fundamentalmente en vesículas secretoras.

La distribución del VNUT endógeno fue analizada usando técnicas inmunocitoquímicas y un anticuerpo contra el dominio N-terminal citoplasmático del transportador y comparada con la de la cromogranina B (CgB), uno de los principales constituyentes de las SVs usando microscopía confocal de fluorescencia. Hemos observado que la expresión endógena del VNUT se presenta con un patrón y una distribución característica granular (Fig 4.1) y que co-localiza mayoritariamente con la CgB endógena $\sim 75 \pm 3$ % (expresado como la media \pm SE; $n=278$ spots de $n \geq 7$ células).

En conjunto, estos resultados demuestran que el VNUT es un constituyente de al menos una parte importante de las SVs en las células cromafines y que la expresión de la proteína VNUT-EGFP es clasificada a vesículas de nueva síntesis.

Para proporcionar una relación cuantitativa de la asociación del VNUT en fracciones subcelulares obtenidas durante la purificación de LDCVs, quisimos extender nuestro estudio a gránulos cromafines purificados. Las LDCVs pueden separarse mediante gradientes continuos de iodixanol (OptiPrep®). En estudios previos, el fraccionamiento subcelular ha demostrado que los principales componentes proteicos de las vesículas, las cromograninas, detectadas por *western blot*, aparecen co-distribuidas con las catecolaminas, indicando que están selectivamente asociadas a las LDCVs (Morris and Schovanka, 1977). Sin embargo, se desconoce cómo está distribuido el VNUT. Es por ello que examinamos el perfil del VNUT y comparamos su distribución con los transmisores que se co-almacenan en los gránulos cromafines; ATP y catecolaminas, además de un conjunto de proteínas contenidas en las SV. Las SVs se separaron en 12 fracciones por ultracentrifugación en un gradiente continuo de iodixanol y fueron sometidas a múltiples análisis: cromatografía líquida de alta presión con detección electroquímica (HPLC-ED); para cuantificar las catecolaminas; determinación de ATP por la reacción de la luciferina-

luciferasa y *western blot* para mostrar los perfiles de distribución las proteínas vesiculares.

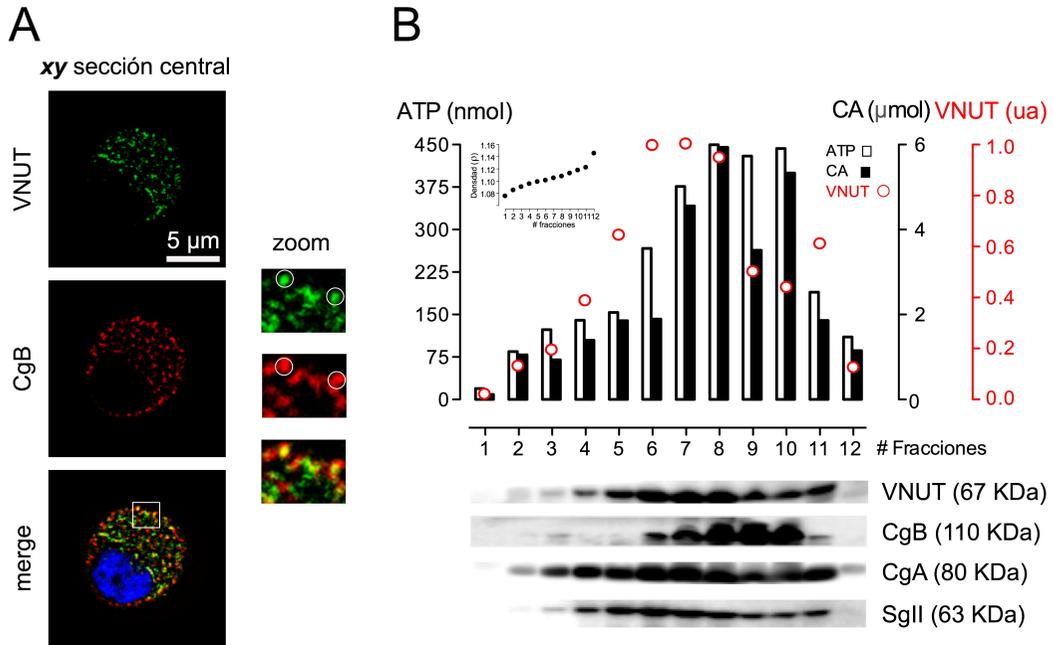


Figura 4.1. El VNUT endógeno co-distribuye con las vesículas secretoras de las células cromafines. A. Análisis de microscopía confocal de la distribución subcelular del VNUT y la CgB. El solapamiento muestra además el marcaje de DAPI. Las imágenes de zoom muestran estructuras marcadas con VNUT y CgB donde se ha realizado el análisis de co-distribución. La cuantificación fue realizada como se describe en el apartado “material y métodos”. Barra de escala de 5 μ m. **B.** Distribución del ATP y las catecolaminas (*panel superior*) junto a un conjunto de un conjunto de proteínas vesiculares (*panel inferior*) seguido de un fraccionamiento por gradiente de densidad continuo de iodixanol de los pellets enriquecidos en vesículas obtenidos a partir de médulas de glándulas adrenales de vaca. La figura muestra un resultado representativo de 4 experimentos independientes. El *inset* muestra el perfil de densidad del iodixanol en cada fracción en un tubo paralelo.

La figura 4.1 muestra que la distribución del VNUT es paralela a la distribución del ATP, sosteniendo la evidencia de que está implicado en su transporte al interior del gránulo y por tanto, su co-distribución; además las CA aparecen asociadas en las mismas fracciones enriquecidas en gránulos (particularmente desde la fracción 4 a la 11). Es más, VNUT co-eluyó con otras proteínas específicas y enriquecidas en gránulos cromafines como la CgA, la CgB y la SgII. Asimismo, el marcador mitocondrial COX1 fue indetectable en los gránulos o en otras fracciones

del gradiente de iodixanol (datos no mostrados) indicando el enriquecimiento de gránulos sin contaminación mitocondrial.

Estos datos descritos demuestran que el VNUT está selectivamente enriquecido en los LDCV y por tanto allí podría gobernar el transporte de nucleótidos. El patrón observado de marcaje del VNUT fue mayoritariamente granular coincidente con la localización vesicular del ATP.

4.2. El VNUT-EGFP es incorporado a los gránulos de nueva síntesis en las células cromafines bovinas.

Adicionalmente, para confirmar que los VNUTs se encuentran además específicamente clasificados en gránulos secretores, expresamos de forma heteróloga un constructo de VNUT bovino que porta EGFP en el dominio C-terminal. De manera simultánea, dado que las quimeras de NPY se han empleado de forma rutinaria para estudiar la localización del contenido proteico de las SV y ha sido demostrado que se localizan de forma idéntica que las expresadas endógenamente; éstos fueron expresados como proteínas de fusión con DsRed (NPY-DsRed) en las células cromafines.

La figura 4.2 muestra un conjunto representativo de imágenes de microscopía confocal donde a las 24 h desde la transfección, las células cromafines fueron visualizadas con un patrón de VNUT-EGFP que encaja predominantemente con el de la distribución del NPY-DsRed (sobre 85% de co-localización de 4 células diferentes) sugiriendo que la mayoría del VNUT se localiza en vesículas secretoras que han sido sintetizadas *de novo*.

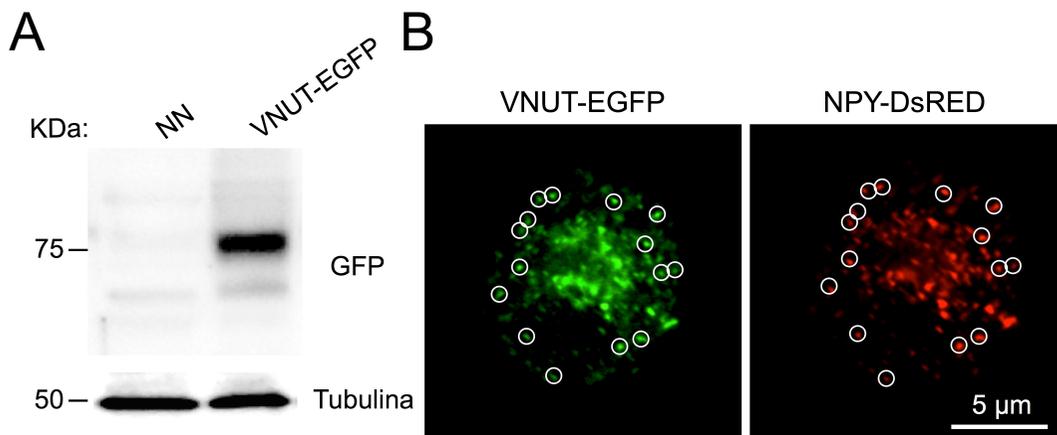


Figura 4.2. Expresión del VNUT-EGFP asociado a los gránulos cromafines. **A.** Western blot de lisados de células HEK293T sin vector (carril 1) y células transfectadas con VNUT-EGFP. Se utilizó un anticuerpo anti-GFP y un anti- α tubulina como control de carga. **B.** Imagen de microscopía confocal que muestra la expresión de la proteína VNUT-EGFP y NPY-DsRed. Los círculos indican estructuras típicas vesiculares en las que existe co-localización de las dos proteínas quiméricas (barra de escala 5 μ m).

4.3. El transportador de nucleótidos vesicular es silenciado eficazmente por siRNAs.

Las SVs constituyen una de los principales reservorios de ATP celular. Dado que la inhibición de la producción de esta forma energía podría conllevar cambios que pondrían en peligro la integridad de la célula, una estrategia concreta para prevenir la carga de nucleótidos en estas organelas podría ser el silenciamiento del transportador vesicular que media su entrada.

Para este propósito, diseñamos oligonucleótidos de siRNA específicos de especie que tienen como diana diferentes regiones de la secuencia de mRNA de VNUT bovino.

Para determinar la eficacia de la interferencia en la expresión del VNUT, las células cromafines transfectadas de forma transitoria, con una eficiencia de $\approx 40\%$, con los oligonucleótidos de RNA fueron procesadas para el análisis de la expresión del mRNA mediante PCR a tiempo real (qPCR). El tratamiento con los siRNAs específicos produjo una disminución del $\approx 60\%$ (siVNUT₁) y el $\approx 50\%$ (siVNUT₂) comparados con las células transfectadas con el siRNA control (scramble) (Fig. 4.3).

El análisis de la eficacia de interferencia del VNUT, fue además determinado mediante la cuantificación de los niveles de proteína por *western blot*. Los lisados de las células cromafines tratadas con diferentes dúplex de RNA, durante tiempos de incubación de 24, 48 y 72 h después de la transfección, fueron ensayados utilizando el anticuerpo que reconoce el extremo N-terminal del transportador de nucleótidos. Se observó que los oligonucleótidos de siRNA disminuyeron la expresión del VNUT en ≈ 65 (siVNUT₁) y $\approx 55\%$ (siVNUT₂). Esta capacidad de interferencia se determinó mediante la relación entre la intensidad de la banda de VNUT con respecto a la de la banda de la proteína empleada como control de carga, α -tubulina. Dado que el oligonucleótido siVNUT₁ mostró la mayor eficiencia en la reducción de la expresión, fue el seleccionado para silenciar VNUT en nuestras células en adelante. Además, se realizó una cuantificación del rendimiento de la interferencia en el intervalo de tiempo entre 24 y 72 h desde la nucleofección (Fig. 4.3 C), y dado que el mayor silenciamiento se produjo entre las 24 y 48 h, tomamos esta ventana operacional para realizar los experimentos.

Conjuntamente, mediante el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra la CgB, observamos que el silenciamiento del VNUT no afectó la expresión de este componente proteico principal del gránulo secretor de las cual depende la acumulación de aminos (Diaz-Vera J.; 2012) y la regulación del control de la biogénesis de gránulos (Kim et al., 2003). Adicionalmente, para descartar la posibilidad de que el VNUT pudiese estar implicado en la biogénesis de LCDVs por otra vía independiente a las cromograninas, el plásmido de NPY-EGFP se co-transfectó con los siRNAs. Las imágenes de microscopía de fluorescencia mostraron que no existía modificación en el patrón punteado, marcador de gránulos de nueva síntesis, cuando el VNUT fue silenciado (fig. 4.11).

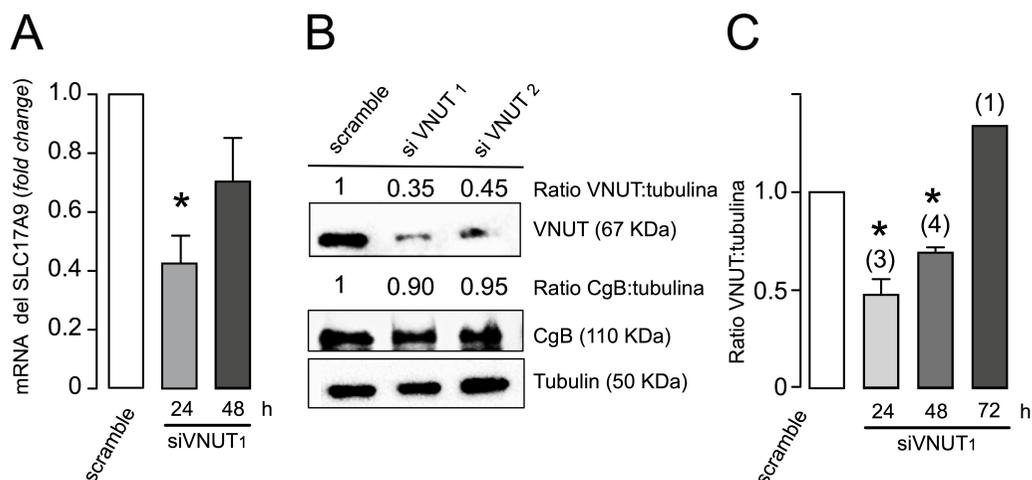


Figura 4.3. Análisis de la interferencia específica del VNUT en las células cromafines bovinas. **A.** Los niveles de mRNA que codifican para el VNUT fueron determinados mediante qRT-PCR. Las barras expresan la media \pm SD (n=3). Los valores fueron comparados usando un test ANOVA seguido a un test de comparaciones múltiples de Bonferroni, *p<0.05. **B.** *Western blot* representativo del análisis de la interferencia del VNUT en células cromafines tratadas con el oligonucleótido control (scramble; carril 1) o con los oligonucleótidos específicos (siVNUT1 y siVNUT2; carriles 2 y 3). Se aplicó la misma cantidad de proteínas en cada carril. El silenciamiento del VNUT endógeno se cuantificó como la ratio entre las intensidades de las bandas de VNUT/ α -tubulina. Se muestra un experimento representativo de un n=3. **C.** Análisis cuantitativo del curso temporal de la expresión del VNUT después de la transfección del oligonucleótido interferente siVNUT₁.

De manera simultánea, con el objetivo de ahondar en la validación de las herramientas moleculares empleadas en este estudio, corroboramos el efecto de los siRNAs empleando un sistema de expresión heteróloga del plásmido pVNUT-EGFP en células HEK293T.

La potencia de los oligonucleótidos interferentes en la modulación de la expresión del VNUT-EGFP fue entonces medida por citometría de flujo. Tras 24 h, el tratamiento de las células con el siVNUT₁ produjo una disminución al \approx 65% de la fluorescencia detectadas por el canal FL1 frente a las células tratadas con el siRNA scramble. El efecto del siVNUT₂ fue menor en la reducción de la expresión de VNUT (\approx 20 %), mientras que la mezcla de los dos siRNAs produjo una disminución de \approx 32% de la fluorescencia (Fig. 4.4.).

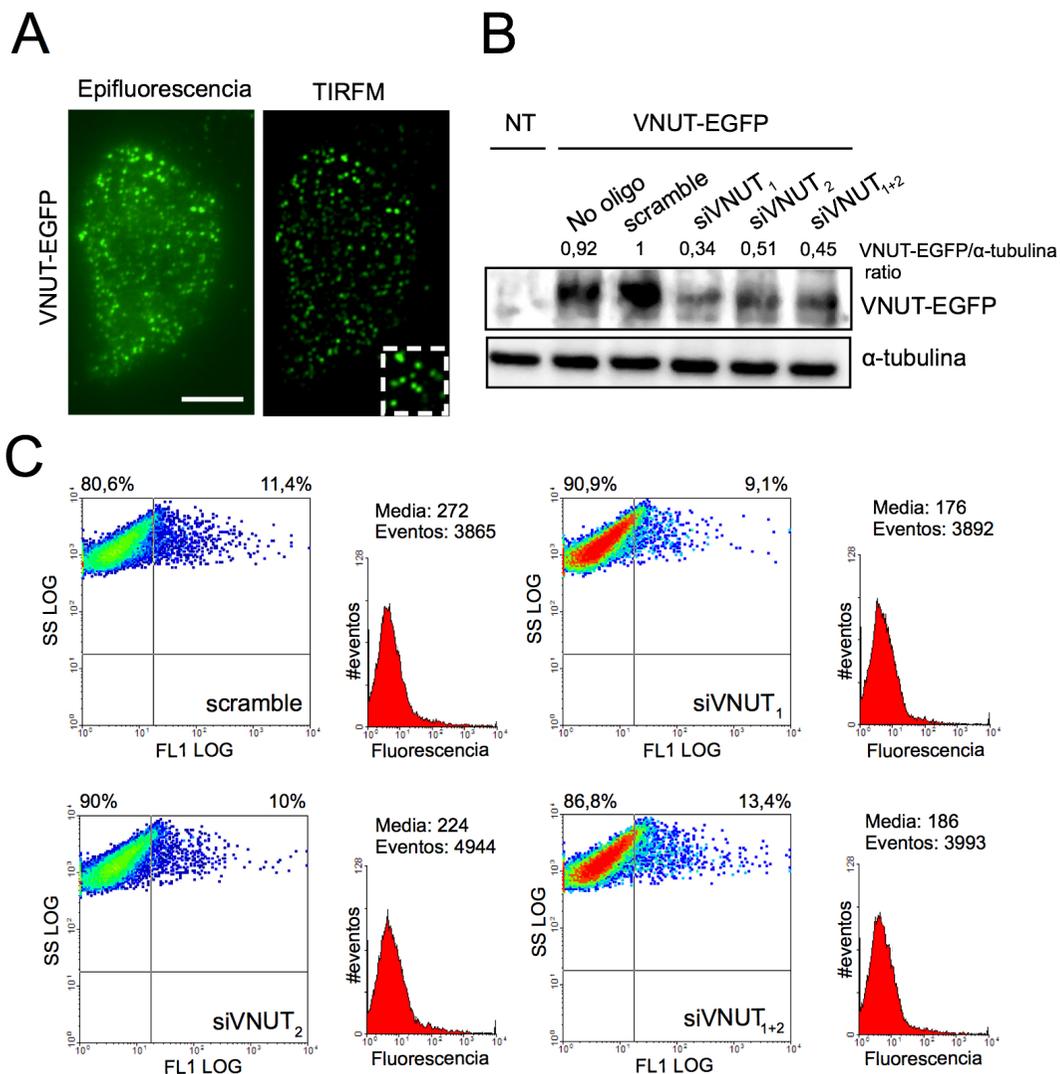


Figura 4.4. El análisis de la interferencia del VNUT bovino expresado de forma heteróloga en células HEK293T muestra resultados similares a los obtenidos con las células cromafines silenciando la proteína endógena. **A.** Imágenes de microscopía confocal y microscopía de onda evanescente (TIRMF) que muestran la expresión de la quimera VNUT-EGFP en células de la línea HEK293T. VNUT-EGFP presenta una distribución típica de localización granular, que se evidencia notablemente en la imagen tomada en las proximidades de la membrana plasmática. Barra de escala de 5 μ m. **B.** Análisis de las proteínas mediante *western blot* que pone de manifiesto la efectividad de los siRNAs en la reducción de la expresión del VNUT. Las ratios VNUT/tubulina se especifican en cada carril normalizados al control (scramble). **C.** Análisis de citometría de flujo de la expresión del VNUT-EGFP bajo la acción de los diferentes oligonucleótidos interferentes. Los diagramas de densidad muestran los porcentajes de células positivas para la fluorescencia en verde (expresada como el log de FL1; LOG FL1) mientras que los

histogramas representan las medias de la fluorescencia de las células HEK293T que expresaron VNUT-EGFP.

Además, de forma paralela, células en las mismas condiciones experimentales fueron lisadas para extraer las proteínas totales. Con los extractos proteicos se corrió una *SDS-PAGE* para realizar un *western blot*. La expresión del VNUT-EGFP, revelada con un anticuerpo específico contra la GFP, se vio disminuida en el mismo sentido que en los experimentos de citometría de flujo (Fig. 4.4).

Estos resultados demuestran que: 1) VNUT-EGFP es expresado con éxito en células HEK293T y además se localiza en estructuras granulares, 2) los siRNAs empleados para el silenciamiento son válidos, y 3) los anticuerpos contra la proteína endógena VNUT son efectivos en la detección de modificaciones de la expresión de la proteína, dados los resultados en la misma dirección en los experimentos de citometría de flujo.

4.4. El origen del ATP secretado por la estimulación nicotínica de las células cromafines es principalmente vesicular.

En las células cromafines, el ATP se distribuye tanto en los gránulos secretores como en el citosol por lo que es necesario establecer el origen del ATP que se secreta ante un estímulo secretagogo (Rojas et al., 1985) en nuestras condiciones experimentales.

Para discriminar en las células cromafines bovinas la secreción de ATP proveniente de las LCDVs y no a partir de ATP liberado por otras vías adicionales, las expusimos a condiciones que tanto facilitarían o inhibirían la exocitosis dependiente de Ca^{2+} (fig. 4.5; A). Las células cromafines ($5 \cdot 10^5$ células por pocillo), se lavaron dos veces con el buffer Krebs-HEPES (2 mM de Ca^{2+} ; excepto en los casos en los que se especifica) y seguidamente fueron incubadas con 100 μM de ARL67156, un inhibidor selectivo de las ecto-ATPasas durante 10 min a 37°C (fig. 4.5; B).

En estas condiciones, la cantidad de ATP secretado de forma espontánea en el medio de incubación fue razonablemente baja (12% del total secretado) respecto a la adición del agonista nicotínico DMPP (100 μM) el cual causó la respuesta máxima de la secreción de ATP. La presencia del inhibidor de ecto-ATPasas ARL67156 en la solución de

secreción fue de crucial importancia para evitar la degradación del ATP liberado.

De forma adicional, la privación del Ca^{2+} extracelular a bajos valores, 0,5 mM de Ca^{2+} , disminuyó notablemente el ATP secretado. No obstante, dado que ha sido demostrado que las células cromafines pueden incluso secretar componentes citosólicos como el ascorbato, de manera dependiente de Ca^{2+} extracelular en respuesta a estimulación nicotínica (Levine M. et al., 1983), expusimos además a las células a la inhibición de la proteína SNARE NSF, por la N-etilmaleimida (NEM, 500 μM). Este pretratamiento abolió completamente la respuesta inducida por DMPP (fig. 4.5; C).

Estos resultados muestran en conjunto que la secreción del ATP posee una fuerte dependencia de la exocitosis: el hecho de que el Ca^{2+} en baja concentración y la aplicación del NEM casi bloquearan por completo la secreción de ATP indican que las otras vías adicionales no están contribuyendo de forma importante a la liberación.

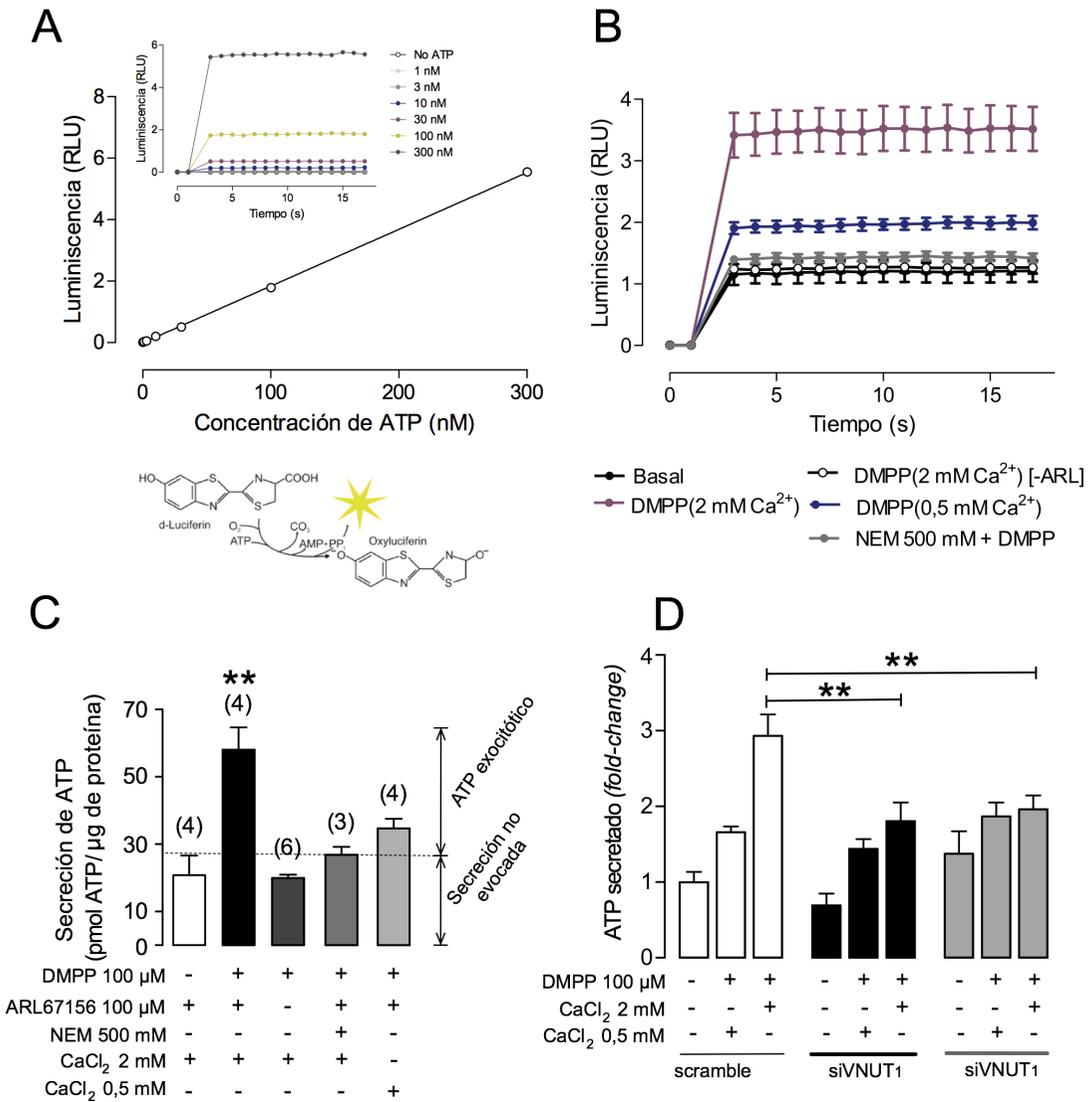


Figura 4.5. El silenciamiento del transportador de nucleótidos vesicular atenúa la exocitosis de ATP en células cromafines bovinas. **A.** Curva de luminiscencia obtenida con concentraciones crecientes de ATP mediante la reacción enzimática de la luciferina-luciferasa. El *inset* muestra la cinética de la luz emitida por la reacción con el ATP de concentraciones conocidas. **B.** Cinética de la luminiscencia emitida por la reacción de la luciferina-luciferasa con el ATP secretado por las células cromafines en las condiciones que se indican. **C.** Cuantificación de los niveles de ATP liberado por la medida de luminiscencia de la reacción de luciferina-luciferasa después de la exposición de las células cromafines control a diferentes condiciones experimentales. En todos los casos la concentración de Ca^{2+} en el medio extracelular fue de 2 mM excepto en el caso que se indica la reducción a 0,5 mM. La liberación de ATP proveniente de exocitosis se considera

aquella que no es inhibida por el NEM **D**. Reducción de la liberación de ATP como impacto del silenciamiento del VNUT (** $p < 0.01$, U- Mann Whitney).

4.5. La expresión del VNUT es esencial para el almacenamiento y exocitosis del ATP.

Con el objetivo de validar la contribución funcional del VNUT en el almacenamiento vesicular del ATP y la consecuente secreción, se realizaron experimentos de estimulación en placas de cultivo a punto final inhibiendo la expresión del VNUT con los siRNAs.

Las células cromafines tratadas con el siVNUT₁ o con scramble se procesaron después 24 y 48 h desde la nucleofección y las fracciones secretadas de forma basal (no estimulada) o tras la estimulación con DMPP 100 μM se analizaron, como se describe en el apartado de material y métodos, para cuantificar la cantidad del ATP. Solamente la secreción estimulada, demostrada como secreción exocitótica, fue disminuida en alrededor de un 40% en las células con el VNUT silenciado por los diferentes oligonucleótidos interferentes respecto a las control (fig. 4.5 C). La presencia de 2 mM Ca^{2+} como componente de la solución extracelular fue determinante para observar el efecto del *knock-down* del VNUT en la reducción de la acumulación y por tanto exocitosis del ATP.

Estos resultados vuelven a ser consistentes con el papel de la exocitosis de vesículas en la secreción de ATP en las células cromafines bovinas ya que el silenciamiento del transportador vesicular disminuyó los niveles del ATP secretado. Además, atribuimos el papel crucial de la existencia de este transportador vesicular para el almacenamiento y la exocitosis del ATP en las células cromafines.

4.6. La carencia del VNUT en LDCVs disminuye selectivamente la secreción de adrenalina.

La primera aproximación para conocer la repercusión de la falta de ATP en las vesículas secretoras sobre la exocitosis de CAs fue tomar las muestras secretadas por las células cromafines nucleofectadas con el RNA de interferencia control o específico en condiciones de secreción basal o de estimulación con DMPP (medio de secreción de los mismos

experimentos descritos anteriormente) y realizar un análisis cuantitativo de las CAs por HPLC-ED.

Los medios de secreción y los lisados celulares se centrifugaron para descartar los restos celulares y los sobrenadantes fueron diluidos para alcanzar una concentración de PCA al 0,05 N y DHBA a 200 nM (estándar interno). Las muestras fueron inyectadas en el HPLC para analizar la cantidad de adrenalina y noradrenalina secretadas y contenidas en las células.

En la figura 4.6 se muestran ejemplos de muestras provenientes de células control y de células interferidas por siVNUT₁, cuyos cromatogramas representan la noradrenalina (sombreado rojo), adrenalina (sombreado azul) y DHBA como estándar interno (sombreado verde) a una concentración de 200 nM.

Los porcentajes de noradrenalina y adrenalina del total de catecolaminas secretadas bajo la estimulación nicotínica con DMPP fueron de ≈ 30 a 40 y ≈ 70 a 60% respectivamente en células control. Con fines comparativos entre experimentos realizados con cultivos celulares diferentes se normalizó al 100% la máxima respuesta, que ocurrió en las células control estimuladas con DMPP en todos los ensayos realizados para ambas catecolaminas (fig. 4.6, B).

La reducción del ATP intravesicular como resultado de la interferencia del VNUT, conllevó a una pérdida de la secreción de catecolaminas estimulada por DMPP que fue específicamente significativa para la adrenalina. Las células interferidas secretaron $\approx 40\%$ menos adrenalina que las células control (fig. 4.6; C y D). Por el contrario, ni la secreción basal (no evocada), ni la cantidad total de CAs contenidas en los lisados de las células cromafines, control o interferidas, tras la estimulación resultó alterada.

De estos resultados concluimos que la presencia de ATP en las SVs es esencial para el mantenimiento de la secreción de otros neurotransmisores contenidos.

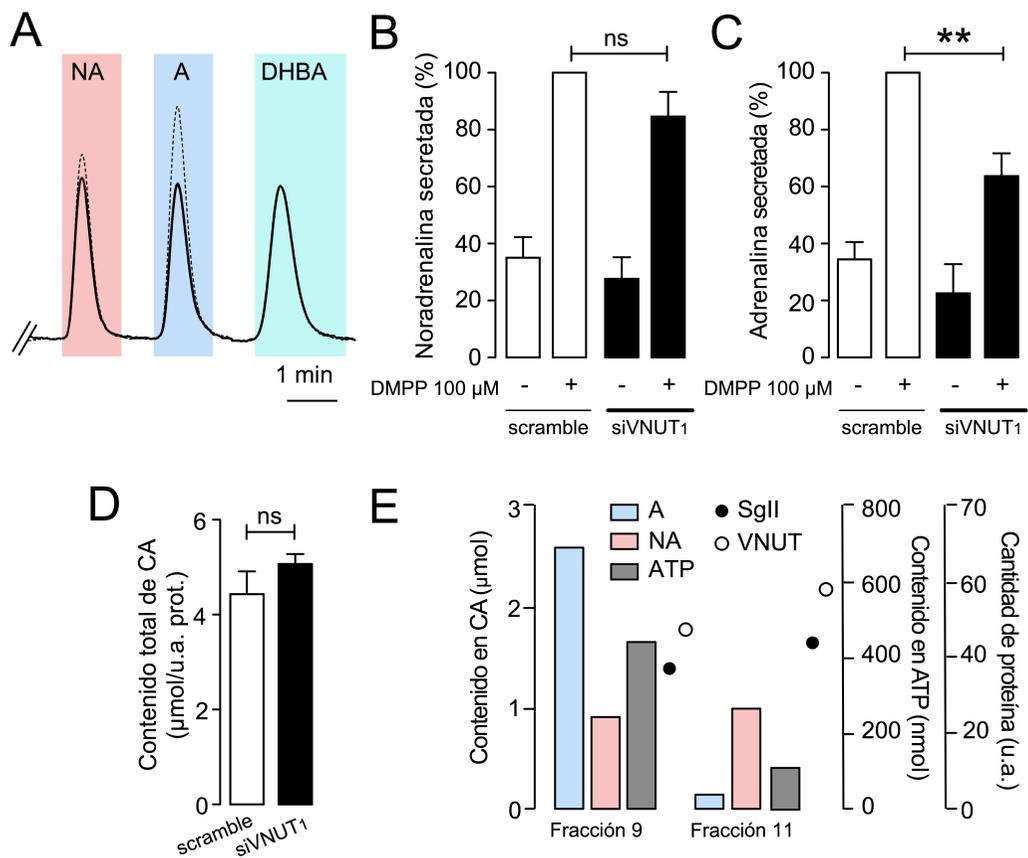


Figura 4.6. El silenciamiento del VNUT afecta la exocitosis de adrenalina en células cromafines bovinas. **A.** Cromatogramas típicos de HPLC-ED que muestran trazos ejemplo de la detección de aminas de las muestras secretadas de células control (línea punteada) e interferidas con VNUT (línea continua). **B y C** representan la secreción basal o de estimulación evocada por DMPP de noradrenalina y adrenalina normalizada a la máxima respuesta. Los datos muestran las medias \pm SEM. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ (test de Dunnett t pareado). La cuantificación refleja el resultado de ≥ 3 cultivos de células cromafines independientes. **D.** Contenido total medio de catecolaminas en los lisados de células tratadas con siRNA scramble o siVNUT₁. **E.** Relación del contenido de los transmisores A y NA con el de ATP y las proteínas VNUT y SgII de una fracción de gránulos cromafines enriquecida en adrenalina (fracción 9) frente a una enriquecida en noradrenalina (fracción 11). Los datos mostrados son valores representativos de 3 gradientes de vesículas aisladas independientes.

En un esfuerzo de comprender cómo la depleción de ATP en las SVs modifica preferentemente la adrenalina más que la noradrenalina, la relación entre los principales transmisores a partir de gránulos purificados y

separados de un gradiente continuo de iodixanol fue analizada por regresión lineal. Las CAs en conjunto y la presencia de ATP exhibieron una alta dependencia. Además la presencia de VNUT explicó la cantidad de ATP contenido en las fracciones vesiculares (fig. 4.1; B). Sin embargo, el análisis de las CA por separado, adrenalina y noradrenalina, permitió revelar la asociación preferente entre la A y el ATP en una fracción adrenérgica que la NA y el ATP en una fracción noradrenérgica, a niveles similares de la proteína VNUT y SgII, considerada esta última como control de la carga de gránulos cromafines en cada fracción vesicular (fig. 4.6; E)

Estos resultados están en concordancia con los obtenidos mediante el silenciamiento del VNUT: la depleción de ATP afecta mayoritariamente a las vesículas que contienen adrenalina.

4.7. Los efectos sobre la liberación de catecolaminas de la reducción del VNUT son evidentes sólo en los primeros pulsos de estimulación.

Con el objetivo de discriminar la dinámica, a tiempo real, de la función secretora de las células cultivadas de la adrenal bovina, desarrollamos un sistema usando una cámara de perfusión conectada a un detector amperométrico que mide las catecolaminas liberadas (Green and Perlman et al., 1981; Herrera et al., 1985; Kumakura et al., 1986).

Es muy importante considerar que en este tipo de experimentos la posibilidad de regulación autocrina y/o paracrina que puedan originarse y/o modificarse con la aplicación de nuestras condiciones se evita, debido al rápido lavado de los neurotransmisores y demás contenidos vesiculares por el sistema de perfusión (Gandia et al., 1993).

Para estimular la liberación exocitótica de catecolaminas pertenecientes a diferentes grupos de vesículas, sometimos a células scramble o nucleofectadas con siVNUT₁ a un protocolo de estimulación repetitivo de inyecciones de DMPP 10 μ M durante 25 s en solución Krebs-HEPES con intervalos de lavado de 3 min. En los experimentos ejemplo que se muestran en la figura 4.7; A, el primer estímulo causó una respuesta de 25 nA el cual fue seguido de un patrón característico de picos de secreción. En estas condiciones, se puede observar un crecimiento

gradual en la cantidad de catecolaminas secretadas de los primeros 5-6 pulsos tanto en células control como con VNUT interferido.

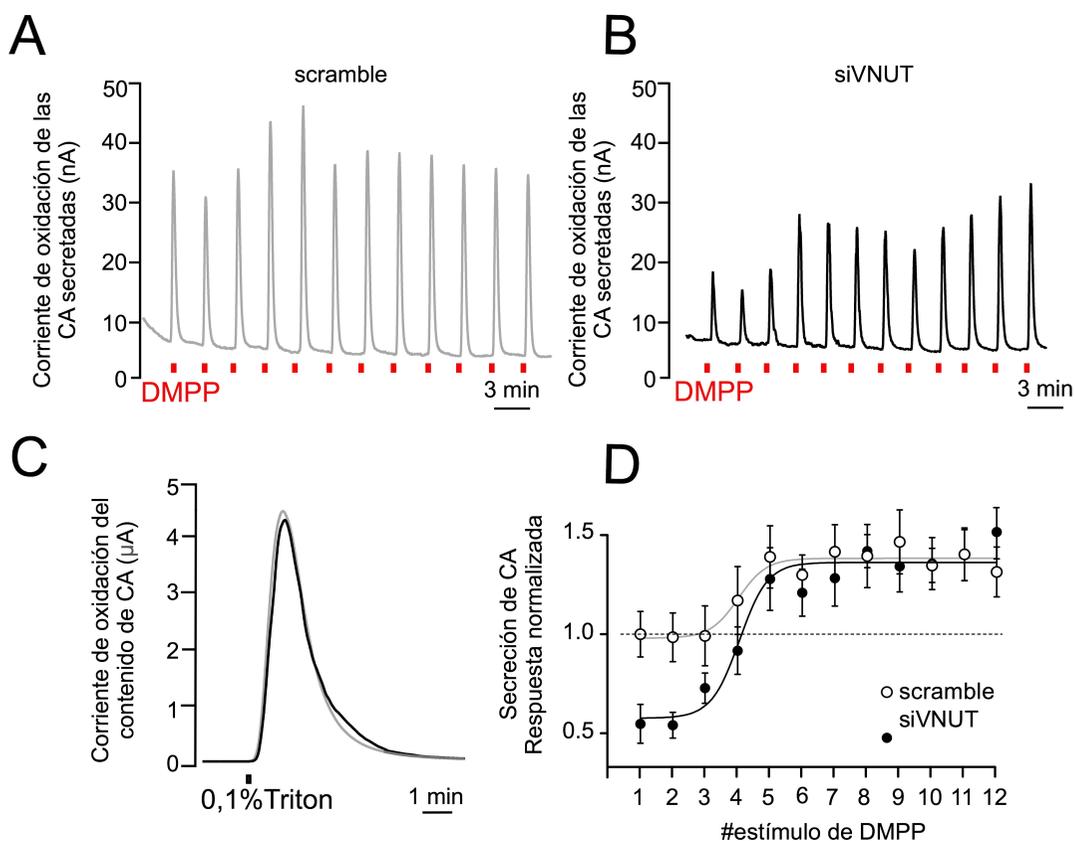


Figura 4.7. El silenciamiento del VNUT afecta la secreción de catecolaminas predominantemente en los primeros pulsos de secreción en un protocolo de estimulación repetitiva. **A y B** son registros de experimentos representativos de la secreción de catecolaminas evocada por la estimulación repetitiva con DMPP 10 μ M de las células cromafines control (scramble) o con VNUT interferido (siVNUT) respectivamente. Al final de cada experimento se aplicó una inyección de 0,1% de Tritonx100 con el fin de determinar el contenido en catecolaminas restante (**C**). **D**. Resultados agrupados que representan la secreción de catecolaminas resultante de cada estimulación respecto al total de catecolaminas detectadas en cada experimento empleando 7 controles vs 7 VNUT-KD. Los datos fueron normalizados a la media del primer pulso de las células control para corregir diferencias entre diferentes grupos celulares de varios cultivos independientes. Hemos considerado la respuesta inicial como 1.

4.8. La estimulación nicotínica selecciona la liberación de las LDCVs de nueva síntesis.

Para optimizar la correcta colección de fracciones de las muestras secretadas en los experimentos de secreción a tiempo real, realizamos un test con inyecciones de rojo fenol (RF) diluido en Krebs-HEPES a pH 7,4. La idoneidad de este colorante para la validación de esta aproximación viene dada a que puede ser detectada fácilmente tanto por el color como por su detección amperométrica, ya que el RF se oxida al potencial redox de +650 mV. Se realizaron 3 registros de una duración de 4 min en los que se recogieron fracciones de $\pm 290 \mu\text{L}$ cada 20 s. La inyección de $\pm 350 \mu\text{L}$ de $200 \mu\text{M}$ de RF se realizó tras el primer minuto desde el inicio de la grabación. Mediante el análisis de la Abs_{555} en las 12 fracciones recogidas en cada registro se determinó la cantidad en moles de RF recogido en cada experimento empleando la relación de Lambert-Beer: $\text{Abs} = \epsilon_{\text{mM}} \cdot l \cdot c$; siendo $\epsilon_{\text{mM}} = 31,62$ el coeficiente de extinción molar del RF; y $l = 1 \text{ cm}$ la longitud de la cubeta donde se realizó la medida.

La función integral de las cantidades recuperadas en cada fracción indicó que el 100% del RF inyectado es recuperado (fig. 4.8; B). La mayor proporción de RF ($\pm 80\%$) se encontró en las fracciones recogidas entre 1-2 min después de la inyección y tras 30 s a partir de la aparición de la señal amperométrica, por lo que fueron estos tiempos los seleccionados para la recolección de fracciones en los experimentos de secreción a tiempo real.

Para resolver las razones de por qué sólo los primeros pulsos de la secreción son modificados y no el resto, diseñamos una estrategia novedosa para identificar la exocitosis de las nuevas vesículas sintetizadas acoplada a la medida de la secreción de catecolaminas a tiempo real. Para ello, las células cromafines nucleofectadas con NPY-EGFP se sometieron al protocolo de estimulación repetitiva en el equipo de secreción *on-line* en el que se monitorizaron las CAs secretadas. De las muestras eluidas y recolectadas durante el protocolo de estimulación se midió el péptido de secreción NPY-EGFP junto a la CgB endógena secretadas, recogidas en fracciones durante el experimento, fueron monitorizadas mediante su detección por *dot blot*.

La medida simultánea de las catecolaminas y las proteínas secretadas reveló una explicación de nuestros resultados: los gránulos de secreción más nuevos son los primeros en ser secretados y éstos son los afectados por el silenciamiento del VNUT.

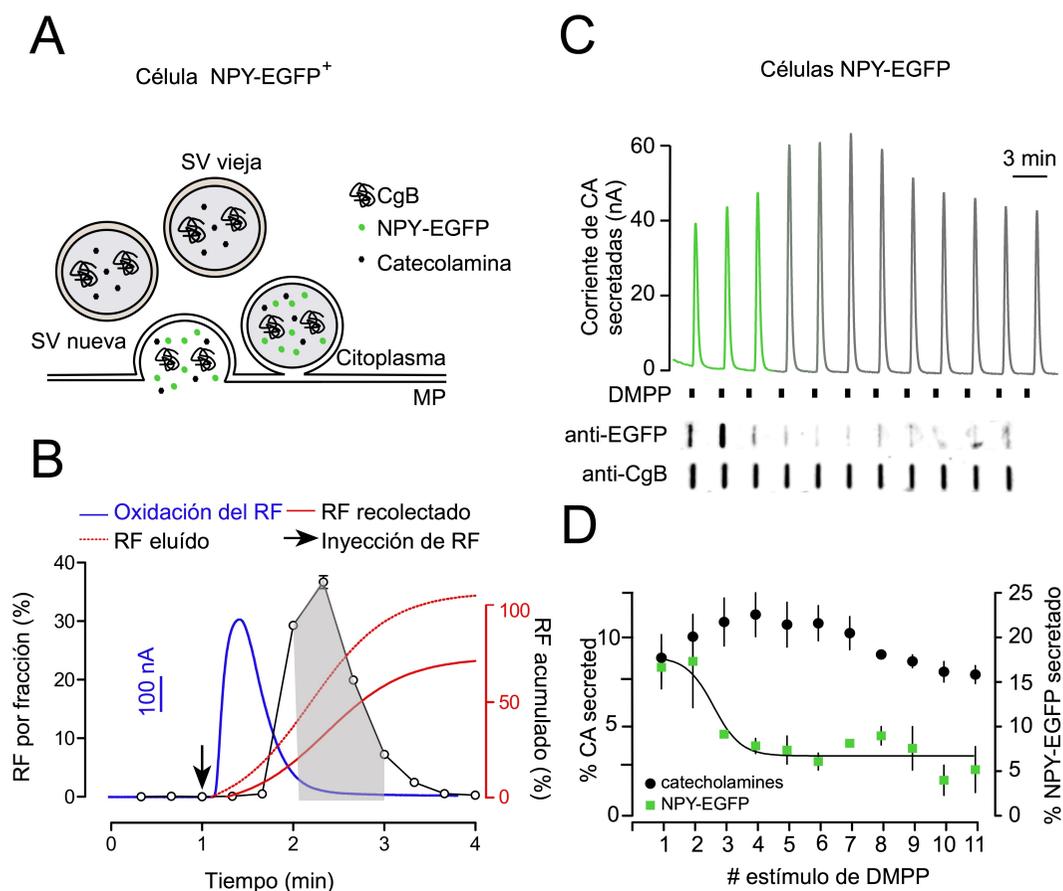


Figura 4.8. Los nuevos gránulos serán los primeros en liberarse. **A.** Representación gráfica que ilustra algunas SVs de una célula cromafín que expresa NPY-EGFP de forma heteróloga (célula NPY-EGFP⁺). Los gránulos de nueva síntesis tendrán incorporado al neuropéptido Y fusionado a EGFP, además de otras proteínas endógenas, como la CgB, y catecolaminas como componentes intravesiculares. El NPY-EGFP secretado funciona como un trazador selectivo de la exocitosis de las SVs de nueva síntesis. **B.** Validación del sistema de recogida de fracciones secretadas por el equipo de secreción a tiempo real. Una calibración con rojo fenol (RF) fue realizada antes de realizar los experimentos con las células cromafines expresando NPY-EGFP con el fin de optimizar los tiempos de recogida de las muestras secretadas. La integración de la señal de absorbancia en diferentes fracciones mostró que 1 min de recogida después de 1 min de la inyección del estímulo era suficiente para recoger \pm 80% de los productos secretados de cada pulso. **C.**

La capacidad de las células para reclutar vesículas de nueva síntesis se estudió aplicando 12 pulsos de estimulación sucesiva de una duración de ± 25 s en células cromafines que expresan NPY-EGFP. La variación en la corriente indica la secreción de catecolaminas. En el *panel inferior* se muestran las proteínas NPY-EGFP expresada de forma heteróloga y CgB endógena secretadas en 11 pulsos de estimulación detectadas por *dot blot*. **D.** Cuantificación de las catecolaminas y el NPY-EGFP secretado en los diferentes pulsos de estimulación representados como el porcentaje del total secretado.

4.9. El silenciamiento del VNUT afecta el grado de reclutamiento de vesículas.

La amperometría en célula única se realizó para conocer las propiedades cinéticas secretoras de las células con VNUT silenciado. Con este propósito, los oligonucleótidos interferentes fueron marcados con el fluoróforo Cy3 (fig. 4.9; B, *inset*) para discriminar células transfectadas con los siRNAs (las células positivas fueron al menos la media ± 3 veces la desviación estándar del ruido de fondo). Las células control (*scramble*) y las silenciadas se estimularon con DMPP 10 μ M durante 10 s usando un protocolo repetitivo similar al usado en el método de secreción a tiempo real.

Las medidas fueron realizadas en el mismo día usando el mismo electrodo de fibra de carbono calibrado y alternando grabaciones de las células control y las nucleofectadas con siVNUT₁.

La aplicación de DMPP produjo secreción en forma de ráfagas de exocitosis de alrededor de 8s de duración los cuales fueron sorprendentemente atenuadas en las células con VNUT interferidas, indicando que la frecuencia de eventos exocitóticos está reducida (fig. 4.9; E y F).

Es más, una vez hecha esta observación, se procedió a estimar la cantidad total liberada por célula mediante la integración del área bajo la curva del trazo de corriente (fig. 4.9; B). Como se esperaba, con el efecto de bajada de eventos de exocitosis, la integración de la respuesta secretora que corresponde a la cuantificación de las catecolaminas secretadas, del control comparada con las células interferidas disminuyó (fig. 4.9; C). El resultado de esta operación muestra la reducción en la

cantidad de CAs detectadas durante el tiempo de registro en el que se aplicaron los 6 estímulos de DMPP.

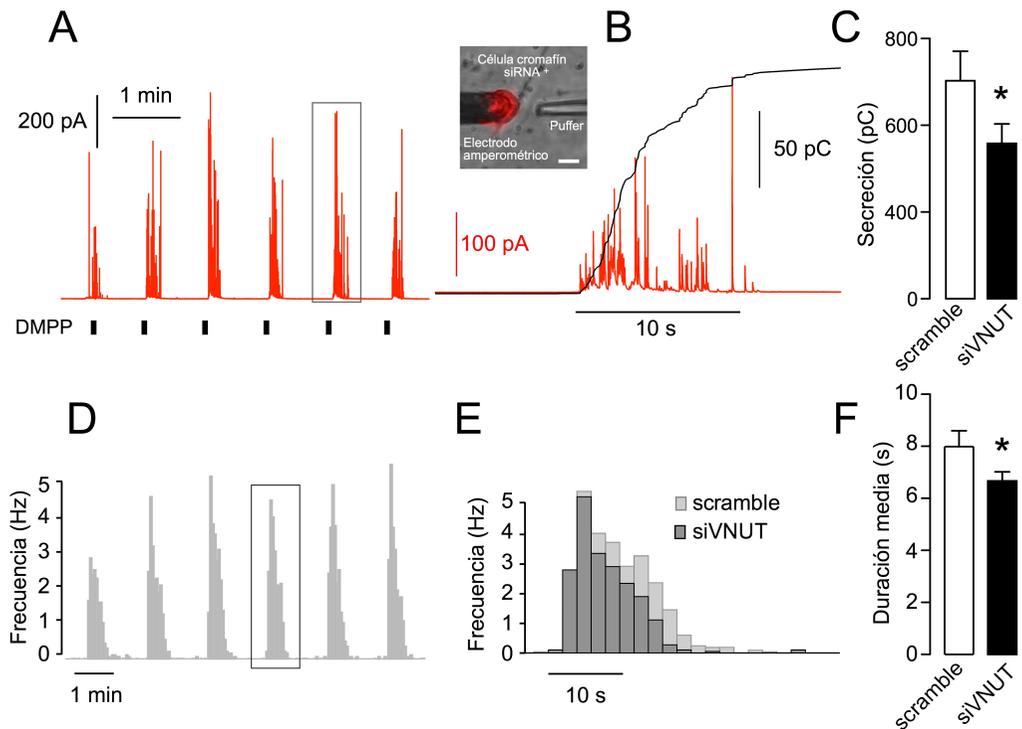


Figura 4.9. La frecuencia de disparo está atenuada por la interferencia del VNUT en células cromafines bovinas. **A.** Registro amperométrico representativo de una célula tratada con siRNA scramble. La secreción fue estimulada cada minuto por la inyección durante 10 s del agonista DMPP a 10 μ M. Después de las estimulaciónes la pipeta se distanció en el eje z \pm 1 mm usando un micromanipulador motorizado. **B.** Ilustración ampliada del registro anterior que muestra un patrón típico de exocitosis (*trazo rojo*) y la secreción calculada (*trazo negro*). El *inset* muestra una imagen de una célula cromafín nucleofectada con siRNA con el fluoróforo Cy3 cuya exocitosis está siendo registrada con un microelectrodo de carbono. La micropipeta (*puffer*) localizada a \pm 10 μ m desde la célula permite la inyección de la solución de estimulación. Barra de escala 15 μ m. **C.** Secreción agrupada de los pulsos aplicados de células control y siVNUT₁. Los datos representan la media \pm SE de la secreción obtenida por la estimulación con DMPP 10 μ M. **D.** Análisis de la frecuencia de disparo de espigas exocitóticas. La imagen muestra la frecuencia de exocitosis. Cada barra representa la media de la frecuencia de espigas registrada en bins de 2 s en células control (n=10). La distribución de probabilidades alcanza un máximo de 5 s después de la estimulación con DMPP. En el *panel derecho* se

muestra una ampliación, señalada con un rectángulo, de la distribución de probabilidades representativa de las espigas amperométricas para uno de los pulsos aplicados en células control (siRNA scramble) e interferidas (siVNUT₁). **D.** Cuantificación de la duración media de las ráfagas exocitóticas en células control y con VNUT silenciado.

4.10. La capacidad secretora de las células VNUT-KD disminuye de forma independiente al incremento de Ca²⁺ inducido por DMPP.

Es bien conocido, que la frecuencia de disparo está principalmente controlada por el Ca²⁺ libre intracelular el cual evoca la fusión vesicular. Considerando VNUT como mediador del transporte de nucleótidos hacia las SVs, la señalización purinérgica podría estar afectando en nuestro sistema. A pesar de que esta posibilidad fue descartada previamente con el experimento de secreción en el sistema de perfusión rápida, para explorar este planteamiento, se realizaron experimentos de medidas de Ca²⁺ intracelular en células positivas para los oligonucleótidos marcados por la Cy3 (fig. 4.9; A) aplicando 4 pulsos de DMPP 10 μM en células control e interferidas con VNUT. La exposición al DMPP produjo oscilaciones en la fluorescencia de Fluo-4 que explicaban los incrementos en el Ca²⁺ intracelular (fig. 4.9; B). La medida del diferencial de fluorescencia con esta aproximación no detectó cambios entre ambas condiciones experimentales (fig. 4.9; C), indicando que el cambio en el reclutamiento de vesículas es un efecto independiente a un problema de manejo del calcio.

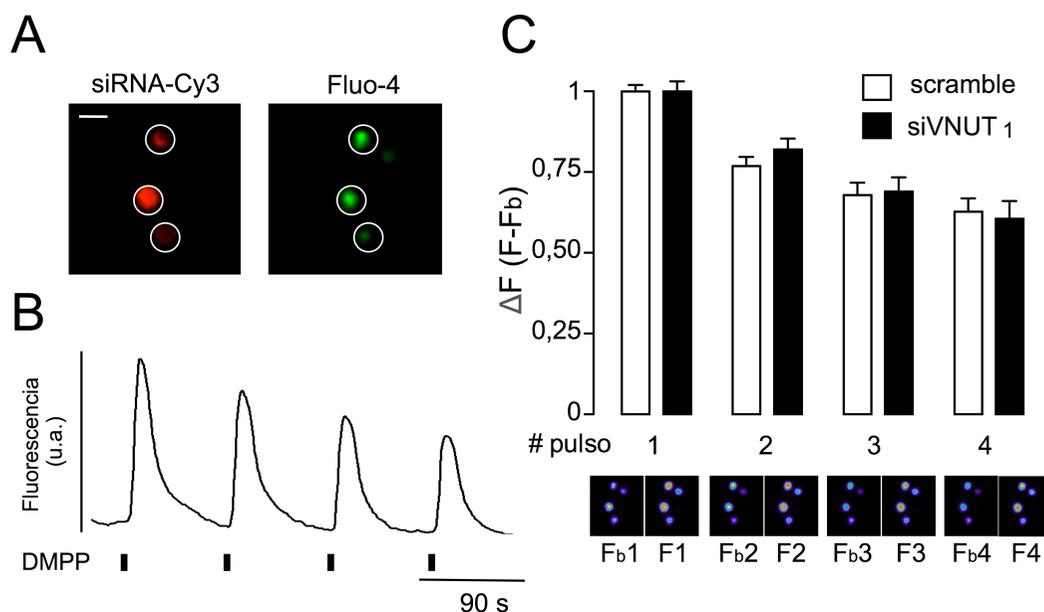


Figura 4.10. La magnitud del Ca^{2+} intracelular inducida por la estimulación con DMPP no se afecta con el silenciamiento del VNUT. **A.** Imágenes de epifluorescencia de células cromafines conteniendo los oligonucleótidos interferentes marcados con la Cy3. Se utilizó la sonda de Ca^{2+} Fluo4 para medir el incremento de Ca^{2+} inducido por la estimulación con DMPP. Barra de escala 15 μm . **B.** Ejemplo de registro representativo de la fluorescencia emitida por la sonda de Ca^{2+} Fluo4 tras aplicar 4 pulsos consecutivos de DMPP 10 μM (indicados con rectángulos) a una célula control (scramble). **C.** Cuantificación de la amplitud de los incrementos de Ca^{2+} inducidos por la estimulación nicotínica con DMPP en células control ($n=14$) vs siVNUT₁ ($n=11$). Medias \pm SE. En el *panel inferior* se muestran imágenes de la fluorescencia en células en condiciones basales (Fbn) o de estimulación (Fn) de los 4 pulsos de DMPP aplicados.

4.11. La biogénesis de gránulos secretores no está afectada por la carencia del ATP en las LCDVs.

Para explorar si la población de gránulos que contribuye al incremento de esta frecuencia de exocitosis podría estar inhibida en términos de biosíntesis, la biogénesis de SVs fue analizada en células control vs siVNUT₁. Para responder a esta pregunta la expresión del NPY-EGFP se cuantificó como la distribución en puntos y no se encontraron diferencias (fig. 4.11).

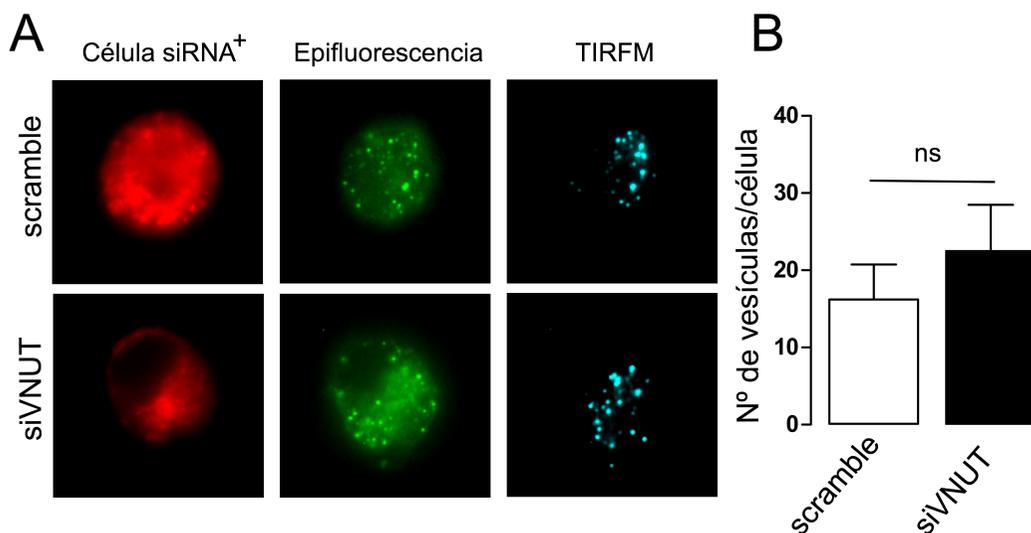


Figura 4.11. La biogénesis de gránulos permanece inalterada en células VNUT-KD. **A.** Imágenes de fluorescencia de los oligonucleótidos interferentes asociados a Cy3 (rojo) y de la proteína quimérica NPY-EGFP (verde). Las vesículas de nueva síntesis más próximas a la membrana celular se pueden observar por la adquisición de imágenes en microscopía TIRFM. **B.** Cuantificación del número de vesículas de nueva síntesis determinado por la expresión de NPY-EGFP en células control (scramble) comparadas con las de VNUT silenciado. Se representa la media \pm SE del número de spots presentes en el plano TIRFM de $n=5$. $p > 0,05$; U de Mann Withney.

4.12. El ATP vesicular promueve una mayor acumulación y secreción de la DA de las SVs.

En diversos laboratorios (Mosharov et al., 2003; Sombers et al., 2005; Trouillon and Ewing, 2013) así como en el nuestro (Díaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008) se utiliza la incubación con 100 μ M de L-DOPA de las células PC12 o de las células cromafines (durante 60-90 min) para incrementar la síntesis de catecolaminas, evitando el paso limitante marcado por la TH. La L-DOPA será transformada en DA por la enzima LAAD que es ubicua en el citosol de muchos tipos celulares.

Basándonos en el trabajo publicado por Dra. Domínguez (Domínguez N., et al 2014), la cinética de acumulación en células PC12 llega a un estado estacionario en un tiempo de 60 min. Por ello, para estudiar la capacidad del ATP intravesicular en la acumulación de aminas, las células cromafines control o silenciadas con el siVNUT₁ fueron incubadas durante

dicho tiempo con 100 μM de L-DOPA y 10 μM de pargilina para inhibir las degradación de las CAs. Las células fueron lavadas con solución Krebs-HEPES y estimuladas con DMPP como en los experimentos de secreción a punto final descritos anteriormente.

Solamente en las células que se trataron con L-DOPA y en las condiciones de estimulación por DMPP fue posible la detección de DA en los medios secretados. No obstante, en este punto temporal, no se observó variación de las catecolaminas producto de la ruta biosintética, noradrenalina y adrenalina, con la aplicación de la L-DOPA. Las células control fueron capaces de acumular 1,4 veces más cantidad de dopamina que las células en las que VNUT fue silenciado (fig. 4.12).

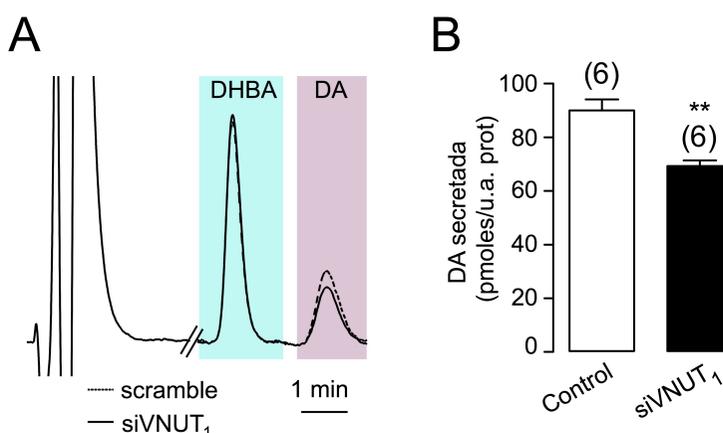


Figura 4.12. La acumulación de DA es más efectiva en células control que en aquellas en las que VNUT está interferido. A. Ejemplos de cromatogramas de HPLC de muestras secretadas por las células cromafines control (scramble; línea punteada) o interferidas (siVNUT₁; línea continua) estimuladas con DMPP. **B.** Cuantificación de la cantidad de DA por proteína (ratio entre los μmoles de DA / intensidad de bandas reveladas por Coomassie en un dot blot de los lisados celulares).

4.13. La amperometría en célula única revela una reducción en la cantidad de catecolaminas liberadas por cada vesícula en las células con VNUT el interferido.

La amperometría no sólo permite el estudio de la cantidad total de CAs liberadas y la frecuencia con la que las vesículas liberan su contenido, sino que también proporciona la resolución temporal necesaria para

analizar la forma en la que ese contenido es liberado por exocitosis (Wightman et al., 1991). El estudio de estas características es lo que se denomina cinética de la exocitosis y se aborda midiendo los parámetros que se muestran en la figura 4.13 (C) de cada una de las deflexiones de corriente o espigas amperométricas. Cada una de estas espigas corresponde con la oxidación del contenido liberado de forma cuántica por cada una de las vesículas secretoras.

Para investigar las características cinéticas de los eventos exocitóticos de forma individual, la secreción se estimuló por la inyección de BaCl_2 5 mM durante 5 s con una micropipeta localizada a $\approx 40 \mu\text{m}$ de la célula. Este secretagogo es especialmente útil dado que no requiere la activación de receptores y porque produce una baja frecuencia de exocitosis que permite la cuantificación de los eventos secretores individuales. La probabilidad de solapamiento de dos eventos independientes indistinguibles en estas condiciones experimentales es muy baja ($p=0,021$; $n=983$ eventos); (Montesinos et al., 2008).

El análisis amperométrico se realizó mediante el estudio comparativo y de forma individual de las exocitosis de cada vesícula en las células control o *knock-down* en el tiempo.

Con el fin de estudiar las características de carga y cinética de la liberación exocitótica de las primeras vesículas, las más nuevas, y donde esperábamos observar más claramente el efecto del silenciamiento del VNUT, decidimos comparar dos intervalos temporales desde el momento del estímulo secretagogo. El primero de ellos, hasta ≈ 1 min, desde este tiempo, el segundo hasta el final del registro.

Siguiendo este criterio observamos que la carencia del VNUT se tradujo en la reducción del $\approx 57\%$ del tamaño cuántico (ver Q, tabla 4.1) de las SVs fusionadas durante ≈ 1 min después de la estimulación. Después de ese tiempo, las diferencias en el segundo intervalo de tiempo analizado fueron menos evidentes (ver tabla 4.1).

Con el uso de este secretagogo comprobamos que la frecuencia de exocitosis, definida ésta como número de exocitosis por unidad de tiempo, se redujo en las células VNUT-KD en el primer intervalo de tiempo definido

(fig. 4.13; A). Como consecuencia de ello, se observa una reducción del $\approx 65\%$ de la secreción de CAs totales (fig. 4.13; B).

La cantidad de CAs liberadas por las SVs se mantiene constante en el tiempo tras un estímulo secretagogo. Esto es un fenómeno que ocurre tanto en células no transfectadas como en células scramble (fig. 4.13; C). Sin embargo, en las células VNUT-KD, observamos que el tamaño cuantales es significativamente más pequeño en los primeros intervalos de tiempo, poniendo de manifiesto el efecto de la carencia del VNUT y por lo tanto de la falta de ATP intravesicular (fig. 4.13; C).

Esta reducción del tamaño cuantales no está asociada a un cambio de la cinética de liberación (fig. 4.13; E).

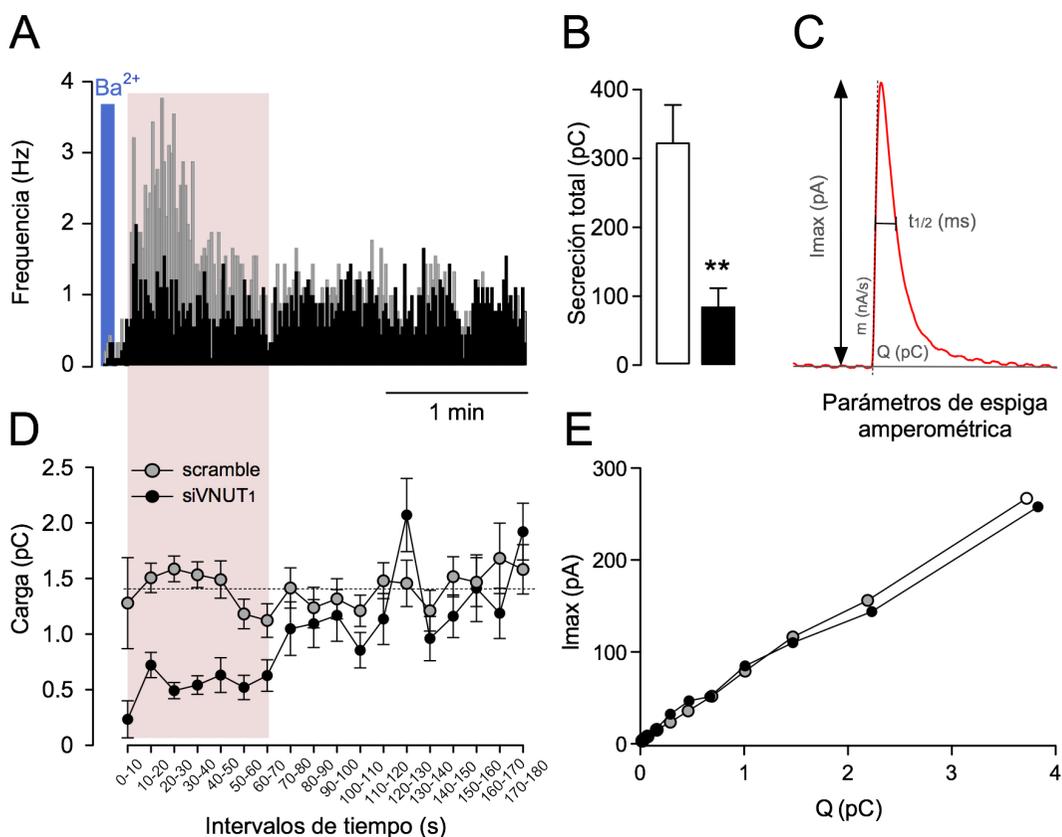


Figura 4.13. Características cuánticas de las vesículas deficientes en ATP. A. Análisis amperométrico de la frecuencia de eventos excitotóxicos en células control o con el

Resultados

oligonucleótido interferente de VNUT estimuladas durante 5 s con 5 mM de BaCl₂. Cada espiga representa las catecolaminas liberadas de una única vesícula. **B.** Secreción total de catecolaminas medida de los registros amperométricos (media ± SEM) comparando células nucleofectadas con oligonucleótidos scramble o siVNUT₁; las cargas acumuladas se midieron en 3 min después de la aplicación del estímulo y se expresa en picoculombios. **p<0.01. Test *t* de Student. **C.** Ejemplo de espiga amperométrica en la que se ilustran los parámetros cinéticos. **D.** Cuantificación de la carga de las espigas amperométricas en grupos de 10 s durante un período de 3 min. Cada círculo gris (scramble) y negro (siVNUT₁) representa la media de la carga (n=9, scramble; n=9 siVNUT₁). **E.** Amplitud de las espigas vs contenido cuántico de células control o VNUT-KD. Test de Mann Withney con la corrección de Bonferroni, **p<0,001. Datos medios en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Características de las espigas secretoras obtenidas en las células cromafines nucleofectadas con oligonucleótidos scramble o siVNUT₁

0-70 s	<i>I</i> _{max} (pA)	Q (pC)	<i>t</i> _{1/2} (ms)	<i>m</i> (pA/ms)	n (cél.)
scramble	117,7±15,1	1,68± 0,3	13,14± 1,2	36,86± 4,4	9
siVNUT₁	55,18± 21,1*	0,72± 0,3*	8,42± 1,1*	30,66±5,9	9
Change	-53,1%	-57,1 %	-64,1%	-	
70-180 s	<i>I</i> _{max} (pA)	Q (pC)	<i>t</i> _{1/2} (ms)	<i>m</i> (pA/ms)	n (cél.)
scramble	98,96±17,8	1,49± 0,3	13,04± 1,5	20,54± 8,3	9
siVNUT₁	68,69± 24,2	1,05± 0,5	10,3± 1,8	21,76± 5,9	9

Para más detalle, ver el apartado de material y métodos (Segura et al., 2000a). Los datos mostrados resultan de un experimento típico realizado en paralelo. Los experimentos fueron repetidos usando células de dos cultivos diferentes obteniéndose resultados similares. Los datos se expresan en las unidades indicadas entre paréntesis. El test estadístico utilizado fue la prueba U Mann-Whitney; *p<0.05; **p<0.01.

Inhibición farmacológica de la entrada de nucleótidos a las SVs.

Las alternativas farmacológicas para el bloqueo de la entrada de ATP a las LDCVs que conocemos hasta el momento implican por un lado; la inhibición de la producción celular de esta forma de energía de la que dependen múltiples procesos importantes para la supervivencia de la célula; y por otro lado, la aplicación de fármacos que se han descrito que actúan bloqueando el transporte de nucleótidos usando preparaciones de vesículas aisladas.

4.14. La depleción de la producción celular de ATP afecta selectivamente la exocitosis de catecolaminas en las células cromafines bovinas.

Una alternativa farmacológica para bloquear la entrada de los nucleótidos a las LDCVs implicaría la inhibición de la producción celular de ATP. Con el objetivo de reducir la cantidad de sustrato para el transportador de nucleótidos vesicular y observar la consecuencia de la falta de ATP en el interior de las SVs sobre la exocitosis de CA, aplicamos 2 conocidas aproximaciones para la reducción de ATP citosólico sobre las células cromafines cultivadas: la ausencia de glucosa; a la que además se añadió la inhibición de la producción mitocondrial de ATP, con el uso de la oligomicina A; o el bloqueo de la ruta de síntesis de ATP por glicolisis, empleando la inhibición por el ácido iodoacético (IAA).

Para ello, las células cromafines fueron pre-incubadas durante 30 min a 37°C con la solución Krebs-HEPES con 11 mM de glucosa (condición control) o sin glucosa en presencia o ausencia de 2,5 µM del inhibidor oligomicina o de 100 µM de IAA. A continuación, un estímulo secretagogo fue aplicado y el ATP junto a las catecolaminas secretadas fueron analizadas.

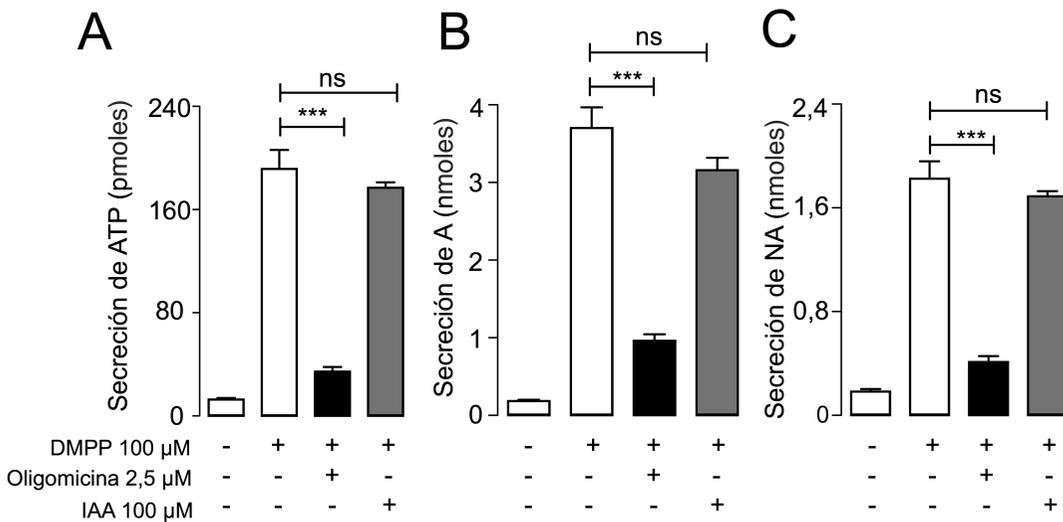


Figura 4.14. La producción mitocondrial de ATP es imprescindible para la actividad secretora de las células cromafines. **A.** Cuantificación del ATP secretado en condiciones basales o de estimulación con DMPP 100 μ M en condiciones control o en presencia de los inhibidores de la producción de ATP oligomycin y ácido iodoacético. **B** y **C** muestran las medias de la secreción de catecolaminas; adrenalina y noradrenalina respectivamente, medidas de forma paralela en las mismas muestras de secreción. Se representan las medias \pm SEM de $n=6$. Test Mann Withney; *** $p<0,001$.

La privación de glucosa durante 30 min no produjo cambios en la secreción de ATP o de CA (datos no mostrados). Sin embargo, el tratamiento con la oligomycin A desveló la importancia de la fuente de ATP mitocondrial en la exocitosis. La gran reducción de la purina secretada se vio además acompañada de una depleción de la misma amplitud en las CA. No obstante, el IAA no produjo cambios en la secreción (fig. 4.14).

La reducción específica de la exocitosis por la inhibición de la producción mitocondrial de ATP pone en evidencia la importancia del acoplamiento de las organelas mitocondrias-SVs en la efectividad de la secreción de neurotransmisores.

4.15. El tratamiento farmacológico con Evans blue, produjo un aumento de la secreción de catecolaminas.

Para conocer el efecto de la inhibición farmacológica del VNUT sobre la exocitosis, células cromafines bovinas fueron tratadas con una solución de Evans blue (EB) a 10 μ M en el buffer Krebs-HEPES durante 30 min o 2

h. La secreción catecolaminas estimulada por la aplicación de un pulso de DMPP 100 μM durante 5 min fue entonces analizada por HPLC-ED y comparada con las células en las que no se aplicó el inhibidor.

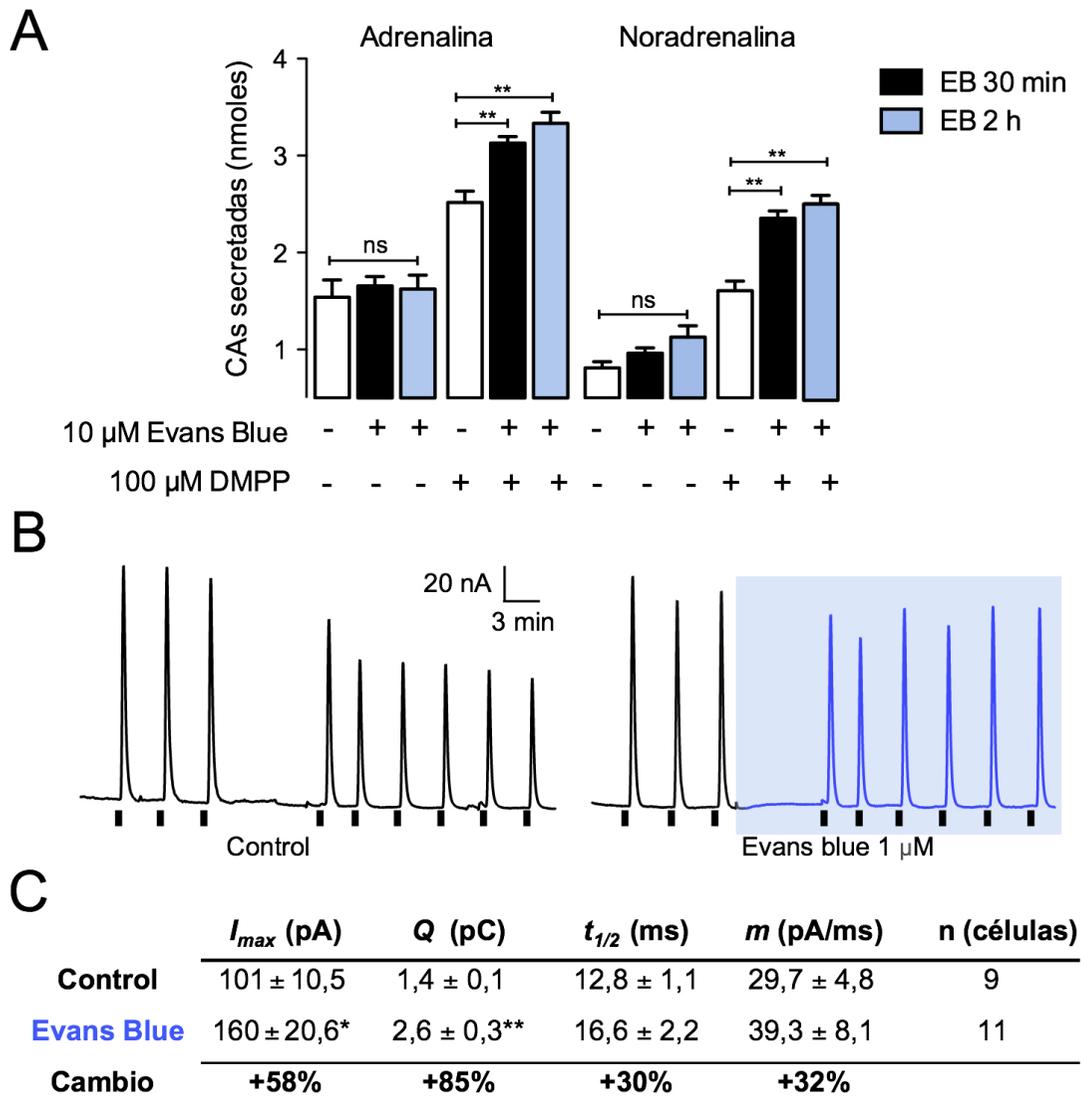


Figura 4.15. Aumento de la secreción de las células cromafines por el Evans Blue. **A.** Análisis de las CA secretadas en condiciones basales o de estimulación por DMPP por las células cromafines control (medio de cultivo sin suero) o tratadas con EB (fármaco en medio de cultivo sin suero). Se muestra un experimento representativo de un total de $n=3$. Cada barra representa la media \pm SE de 6 réplicas. ** $p<0,01$. Test de Mann Withney. **B.** Trazos amperométricos de la secreción de CA de células cromafines estimuladas de forma repetitiva con alto potasio (35 mM KCl). En el *panel izquierdo* se muestra un registro

control en el que se mantiene la perfusión con Krebs-Hepes. En el panel derecho, el área de color azul representa el cambio de perfusión a la misma solución junto al EB. **C.** Tabla resumen de las características cinéticas de las espigas amperométricas registradas en células control o tratadas con EB 100 μM . Tras el tratamiento las células fueron lavadas en buffer Krebs-Hepes y estimuladas con 5 mM BaCl_2 durante 5 s. El test estadístico utilizado fue la prueba U Mann-Whitney; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

La figura 4.15 (panel A) muestra cómo las CAs secretadas en condiciones basales (no estimulación) no muestran variaciones dependientes del tratamiento; tanto para la adrenalina como para la noradrenalina. Sin embargo, un incremento del $\approx 25\%$ y del $\approx 40\%$ fue observado en la A y NA secretadas bajo la estimulación nicotínica tras el tratamiento de 30 min con EB. Una incubación más prolongada con el inhibidor del transportador de nucleótidos vesicular a 2 h no produjo cambios significativos sobre los observados a los 30 min de incubación.

Tras observar estos resultados quisimos comprobar, que el incremento de las CA secretadas por el tratamiento con EB en un sistema de flujo continuo acoplado a la detección a tiempo real de la oxidación de las CA secretadas tras la aplicación de estímulos. La comparación de las señales iniciales de secreción con las evocadas a partir de la perfusión continua de las células cromafines con el EB 1 μM durante 15 min, revelaron un incremento de las CA secretadas, acorde a los experimentos de secreción a punto final (fig. 4.16, B).

Con estos experimentos, hemos observado que el uso de una herramienta que inhibe el transportador de nucleótidos vesicular sobre las células cromafines; y no sobre gránulos aislados, produce un aumento de su capacidad secretora.

4.16. Las células cromafines tratadas con EB mostraron un aumento significativo del contenido cuántico.

Realizamos experimentos de amperometría en célula única con las células cromafines ($50 \cdot 10^3$ células por pocillo) cultivadas sobre cubreobjetos en placas multipocillo fueron lavadas con medio de cultivo sin suero e incubadas en la misma solución con o sin 100 μM EB durante 30 min en el incubador a 37°C. El análisis de los registros amperométricos reveló sorprendentemente un aumento muy significativo del contenido de

CA liberadas, que se vio reflejado fundamentalmente en un aumento del \pm 85% de la carga Q; del 58% de la I_{max} y 32 % de la pendiente m (tabla 4.2). En cambio, la frecuencia de eventos exocitóticos no pareció verse alterada.

En conjunto, estos resultados ponen de manifiesto que el Evans blue; un inhibidor potente del transporte de nucleótidos empleado típicamente en preparaciones vesiculares aisladas; promueve tras una aplicación aguda, mecanismos que fomentan el almacenamiento de CA en las LCDVs en células cromafines bovinas. La secreción por estimulación nicotínica en ensayos de secreción a punto final, experimentos en perfusión continua y el análisis de las exocitosis individuales apuntan en el mismo sentido: la secreción está potenciada.

4.17. El VNUT se expresa diferencialmente en los dos fenotipos de células cromafines bovinas.

El protocolo de cultivo de separación de células adrenérgicas de las noradrenérgicas utilizando Percoll (Moro et al., 1989) se empleó para obtener fracciones enriquecidas en los dos fenotipos celulares cromafines. Tras la centrifugación del gradiente de densidad, se obtuvieron 3 poblaciones de células (fig. 4.17, B): una fracción ligera (fracción 1); una intermedia (fracción 2) y otra densa (fracción 3).

El análisis mediante HPLC-ED de las CAs contenidas en las células separadas en tales fracciones mostró que la adrenalina se distribuyó mayoritariamente en la fracción 3 (fig. 4.17, B). Además, en tal fracción apareció una cantidad residual de noradrenalina que, dado que esta catecolamina es la precursora de la adrenalina, sospechamos que podría proceder de células adrenérgicas las cuales deben contener pequeñas cantidades de noradrenalina como sustrato de la PNMT. Mientras, en la fracción 1, la cantidad de noradrenalina se asemejó a la de las otras fracciones, pero la A fue en mucha menor proporción. La fracción intermedia mostró características resultantes de la mezcla de ambas fracciones.

En términos de CA totales, la fracción 3 representó un \approx 60% frente al 40% restante que se distribuyó en las fracciones 1 y 2. Este resultado puso de manifiesto el predominio de células cromafines del tipo adrenérgico

obtenidas del aislamiento (fig. 4.17, B).

Observando estos datos, corroboramos la eficacia del método de separación de células noradrenérgicas (fracción 1) de las adrenérgicas (fracción 3) descrito por (Moro et al., 1989) y por tanto validamos su uso para el análisis de la distribución del transportador de nucleótidos vesicular.

Para ello, la misma cantidad de proteínas totales de los lisados de las células de las fracciones 1-3 fueron sometidos a *western blot* en los que se analizó la expresión del VNUT además de las dos principales proteínas contenidas en las SVs, la CgA y la CgB (fig. 4.17, C). El marcaje de tubulina permitió tener un control de la carga en cada carril. Además, dado que la fenil N-metil transferasa (PNMT) es una enzima específica para la biosíntesis de adrenalina y la tirosina hidroxilasa (TH) es la enzima limitante para la biosíntesis de catecolaminas, empleamos un anticuerpo contra la PNMT como marcador de células adrenérgicas y en su ausencia, el marcaje con un anticuerpo contra la TH indicó la carga de células cromafines, tanto adrenérgicas como noradrenérgicas.

La distribución de la TH en las 3 fracciones celulares fue similar entre sí y no dispar al contenido de tubulina, con lo que establecimos que el tipo celular principal de las células obtenidas por este tipo fraccionamiento es la cromafín. El marcaje de PNMT quedó prácticamente restringido a las fracciones 2 y 3; por lo que se reafirman los resultados obtenidos por el análisis de las catecolaminas; la fracción 3 está muy enriquecida en células adrenérgicas. El marcaje del VNUT en las fracciones reveló que la expresión del VNUT se diferenciaba en las fracciones noradrenérgicas de las adrenérgicas (55% vs 20%). Además, se observó que la CgA se expresaba también preferentemente en las células adrenérgicas a diferencia de la CgB, que se expresó mayoritariamente en el otro tipo celular.

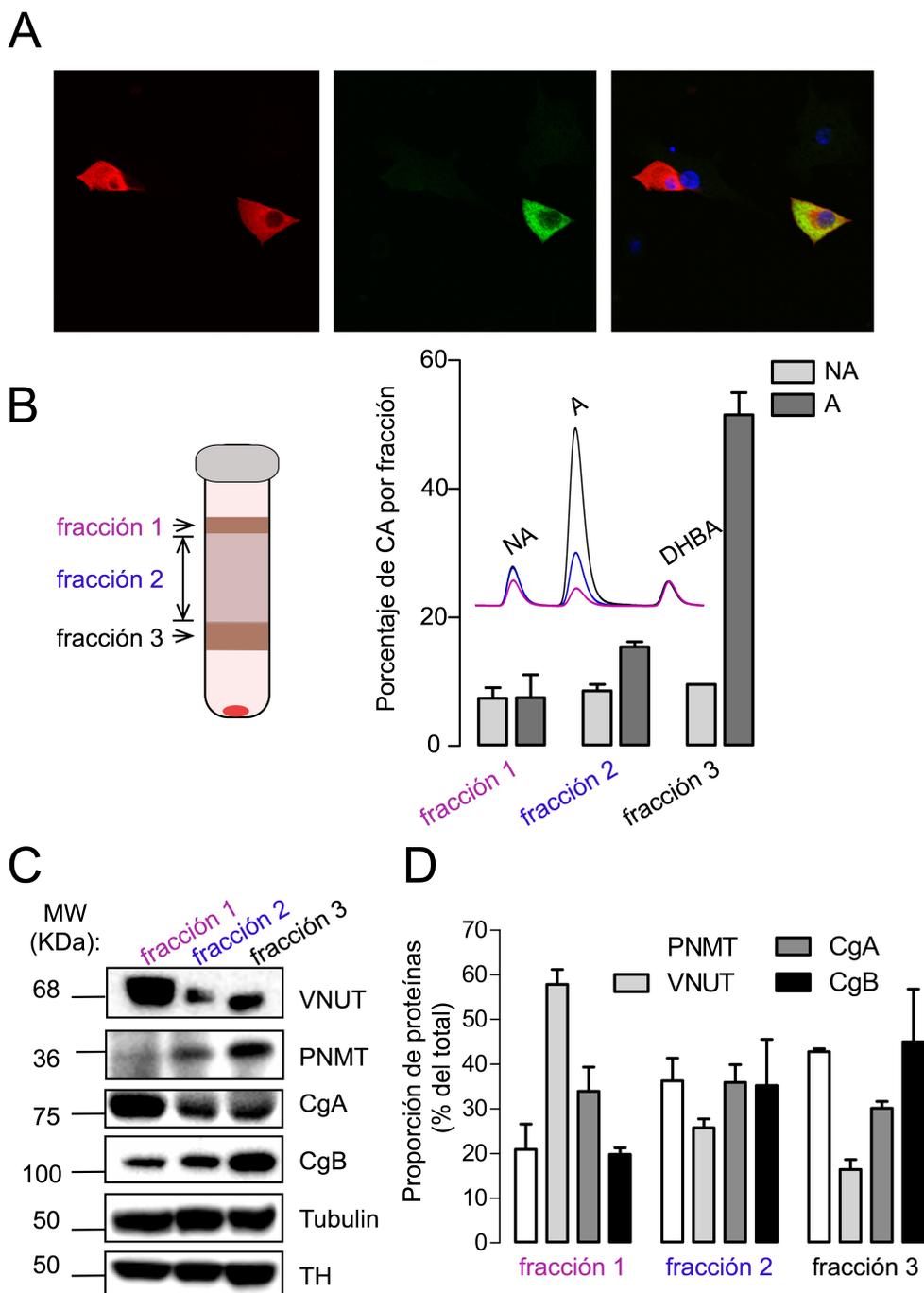


Figura 4.16. Caracterización de la expresión del VNUT en células adrenérgicas y noradrenérgicas de la médula adrenal bovina. A. Imágenes de microscopía confocal que muestran el inmunomarcaje de la TH (rojo) y el VNUT (verde) en una preparación de

Resultados

un cultivo primario que muestra que la totalidad de las células cromafines no es positiva para el transportador de nucleótidos vesicular. **B.** En el panel izquierdo se muestra una representación esquemática del resultado de la centrifugación de células cromafines aisladas de las médulas de glándulas adrenales bovinas en un gradiente autoformado de Percoll[®]. Tras la aplicación de 15000 g durante 30 min se extrajeron y analizaron las 3 fracciones que se indican mediante flechas. En el panel derecho se muestra el análisis del contenido en catecolaminas representado como porcentaje. La suma de la A y NA de todas las fracciones es el 100%. **C** y **D.** Imágenes y cuantificación de los marcajes por *western blot* de las proteínas vesiculares VNUT, CgA y CgB. Como control de carga se empleó la tubulina. El análisis de la TH se realizó con el fin de comparar la igualdad en carga en células cromafines y evitar la posible contribución de otros tipos celulares en el cultivo primario.

Discusión

5. DISCUSIÓN.

En el presente trabajo hemos investigado la influencia del ATP intravesicular sobre la secreción de CAs en las células cromafines bovinas mediante la modulación de la expresión del transportador de nucleótidos vesicular (Sawada et al., 2008). El principal hallazgo de nuestros resultados es que la presencia de ATP en las vesículas secretoras, al margen de su papel como neurotransmisor, es crucial en el control del tamaño cuántico de CA, fundamentalmente de adrenalina. Esta sería la primera demostración en células del tan hipotetizado papel de los nucleótidos, enriquecido en todas las vesículas secretoras conocidas, como ayudante en la acumulación de transmisores previniendo su lisis osmótica (Kopell et al., 1982).

5.1. ¿Es factible el silenciamiento del VNUT por siRNAs en las células cromafines bovinas?

La expresión del VNUT en la médula adrenal de ratón se describió asociada a las SVs siendo responsable del transporte de ATP y otros nucleótidos hacia el interior del gránulo (Sakamoto et al., 2014; Sawada et al., 2008). Para demostrar la asociación de esta proteína a los gránulos cromafines de nuestro modelo celular, las células bovinas, analizamos la distribución del VNUT endógeno comparada con la de la CgB (fig. 4.1), una de las principales proteínas componente de la matriz de las LDCV. Nuestros resultados reflejan un porcentaje de co-distribución del 75% indicando que el transportador de nucleótidos se encuentra principalmente ubicado en los gránulos cromafines.

A pesar de que la presencia del VNUT como componente en las SVs de numerosos tipos celulares son cada vez más numerosas, como por ejemplo los gránulos de zimógeno de las células pancreáticas (Haanes et al., 2010), las vesículas sinápticas de las neuronas de hipocampo (Larsson et al., 2012) así como los gránulos de insulina de líneas celulares β pancreáticas (Geisler et al., 2013), VNUT también ha sido identificado como componente de otras organelas como los lisosomas (Tsuboi et al., 2013; Jung et al., 2013). Según nuestros resultados existe una alta proporción de gránulos en los que co-existen CgB y el VNUT. Sin embargo, es posible encontrar estructuras con sólo uno de los marcadores por lo que

no descartamos la presencia del VNUT sobre otras estructuras subcelulares.

En el presente trabajo hemos empleado una estrategia de modulación de la expresión del VNUT basada en la interferencia del RNA codificante del VNUT. Esta técnica experimental requiere efectividad y especificidad en la reducción de la expresión del gen diana. Para optimizar la eficacia de la interferencia del VNUT realizamos un curso temporal del efecto del silenciamiento. La aplicación de los siRNAs redujo de forma efectiva, a alrededor de la mitad, la expresión del transportador entre las 24 h y 48 h mientras que a las 72 h la expresión fue incrementada (fig. 4.3; C)., efecto que podría estar explicado por la degradación de estos oligonucleótidos con el tiempo y la recuperación de la expresión habitual del VNUT. Este poder en la reducción del VNUT expresado en las células cromafines podría estar infravalorado ya que no todas las células adquirieron el oligonucleótido interferente ($\approx 40\%$ de células positivas); la eficacia podría ser escalada entonces a valores muy superiores de interferencia.

En las células neuroendocrinas sólo una pequeña fracción de las vesículas (1-3% del total de vesículas) están ancladas a la membrana y son capaces de ser liberados rápidamente en respuesta a una elevación en las concentraciones de Ca^{2+} citosólico (*“Readily Releasable Pool”* o grupo de vesículas de liberación rápida; RRP). El grupo mayoritario de vesículas que permanece sin ser liberado o que se liberan bajo la estimulación continua y/o repetitiva se ha asumido como el grupo citosólico de reserva (*“Reserve pool”, RP*) del cual pueden reclutarse vesículas al RRP (Duncan. et al., 2003; Giner et al., 2005).

A pesar de que existen muchas evidencias de que solamente unas pocas vesículas secretoras contenidas en las células neuroendocrinas están cualificadas para fusionarse con la membrana plasmática y liberar su contenido al espacio extracelular, los mecanismos que regulan su exocitosis no quedan del todo claros. Las posibilidades planteadas han generado controversia enfrentando la exocitosis secuencial (*“oldest first”*), la exocitosis aleatoria (*“random release”*) o la exocitosis preferencial (*“youths jumps the queue”*) de las vesículas recién formadas (Duncan et al., 2003).

El uso de proteínas quiméricas fluorescentes cuyo destino final específico se encuentra en las SVs ha sido de gran utilidad durante los últimos años para la identificación de los grupos vesiculares, la secreción de acuerdo a la edad, la distinción de la localización intracelular, la movilidad y la prioridad en su reclutamiento para la exocitosis (Duncan et al., 2003; Tsuboi T. et al., 2010). En estos trabajos se defiende que las vesículas secretoras de nueva síntesis experimentan un transporte rápido hacia la membrana plasmática donde son preferentemente seleccionados para su exocitosis. Las SVs que no sufren fusión son, con el tiempo (menos de 16 h), eliminadas de la membrana, transportadas hacia el interior de la célula y equilibradas con el grupo de vesículas de, convirtiéndose en indistinguibles entre los SVs pre-existentes (Duncan et al., 2003).

El impacto funcional de la modulación de la expresión de los transportadores vesiculares ha sido clarificado durante los últimos años en modelos transgénicos de ratón. Así, SVs de ratones *knock-down* VACHT (Prado et al., 2006), *knock-out* heterocigóticos de VGAT (Wojcik et al., 2006) o de VMAT-2 (Patel et al., 2003) muestran una reducción del contenido cuántico.

A diferencia de los modelos transgénicos *knock-out*, cuya preparación requiere de tiempos prolongados, la estrategia de silenciamiento es una herramienta rápida, dado que implica el diseño de oligonucleótidos y su aplicación inmediata. Sin embargo, el uso de estas estrategias de modulación *in vitro* de la expresión génica sobre proteínas cuyo destino final es la SV son difícilmente traducidos dado que comprometen la integridad de solamente una pequeña parte de la población total de las mismas, las SV de nueva génesis. Sólo una pequeña proporción de estas organelas, las de nueva síntesis, incorporarán la variación introducida.

Ante esta dificultad, hemos considerado la posibilidad de promover la secreción de grupos vesiculares viejos, antes de la intervención de los siRNAs, para activar la biogénesis de nuevos gránulos. De acuerdo con esto, la aplicación de un estímulo despolarizante con alto potasio antes de la nucleofección de los siRNAs de VNUT resultó en una mayor efectividad en el silenciamiento (Anexo II).

Además, hemos diseñado una estrategia experimental novedosa para la identificación de la aportación del contenido secretado por las SV de nueva síntesis empleando como trazador el NPY-EGFP: El análisis del NPY-EGFP y CgA secretados por las células cromafines en nuestro sistema de detección de CAs a tiempo real refleja que las vesículas de nueva síntesis son preferencialmente exocitadas en los primeros pulsos de estimulación con DMPP (fig. 4.8), resultado que confirma, de forma directa, lo reportado por el grupo del Dr. Chow (Duncan et al., 2003). Esta evidencia es de gran importancia ya que nos aporta información para atribuir las consecuencias de la modulación de la falta de VNUT sólo a las SVs que realmente están afectadas por la carencia de transportador.

5.2. VNUT: una diana necesaria en la regulación del almacenamiento y secreción del ATP.

Todas las estrategias desarrolladas desde varias décadas atrás para la depleción del contenido intravesicular de nucleótidos sobre células vivas han resultado ser prácticamente un fracaso. A diferencia de las CAs, cuyo contenido cuántico es fácilmente alterable por la concentración citosólica de transmisor, por ejemplo por la aplicación de L-DOPA (Mosharov et al., 2003; Sombers et al., 2005; Montesinos et al., 2008; Diaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Trouillon and Ewing et al., 2013), o de anfetaminas u otros falsos neurotransmisores, el ATP posee una baja tasa de recambio del ATP en las SVs (Corcoran et al., 1986; Corcoran et al., 1986) de forma que el contenido en purinas se opone a los cambios citosólicos que puedan ser inducidos por inhibidores del metabolismo energético, dificultando así el estudio de la falta de este componente intravesicular sobre la exocitosis, además de la vida de la célula, que también es importante. Este comportamiento se repite cuando las células cromafines son tratadas de forma crónica con reserpina o tetrabenazina durante varios días en las que ocurre una depleción abrupta de las catecolaminas y una reducción más leve de los reservorios de ATP granulares (Caughey et al., 1987).

Ante estas pruebas, nos hemos preguntado: ¿Cómo podemos modificar el ATP intragranular? En el desarrollo de esta tesis hemos ensayado 3 estrategias diferentes dirigidas contra la carga de los nucleótidos por los gránulos secretores: 1) la inhibición de la producción celular de energía por glucólisis o por la disfunción mitocondrial promovida

por el uso de desacopladores de la cadena de transporte de electrones, como estrategia experimental tradicional 2) el bloqueo del VNUT mediante la aplicación del EB, un fármaco ampliamente usado para la inhibición de los transportadores de la familia Slc17a9 sobre SVs aisladas; y 3) la reducción de la expresión del transportador de nucleótidos vesicular mediante siRNAs.

Como muestran nuestros resultados, la secreción de ATP en las células cromafines es un fenómeno que depende de forma predominante de la exocitosis, dada la potente disminución de la secreción de ATP mediante el uso de bloqueantes tradicionales de la secreción regulada, el bloqueo de NSF y el bajo Ca^{2+} extracelular (fig. 4.5). Por ello, hemos considerado como residuales los mecanismos de liberación no exocitótica como la salida por proteínas ABC, las conexinas o las recientemente descritas panexinas en las células cromafines (Momboisse et al., 2015).

El bloqueo de la síntesis de ATP por las vías principales de producción de energía de la célula fueron ensayadas en las células cromafines. De forma similar a lo ya previamente demostrado con el empleo de la 2-deoxiglucosa (Nakanishi et al., 1988), la inhibición de la glucólisis no produjo cambios en la secreción de ATP (fig. 4.14) lo que puso de manifiesto la baja aportación de esta vía anaerobia en el nivel del ATP celular en condiciones basales. Este comportamiento de las células neuroendocrinas no parece estar en la línea con lo que ocurre en neuronas, en las que recientemente se ha descrito la enorme contribución que esta vía de producción de ATP en una maquinaria a bordo de las SVs tiene sobre su movimiento a través de los axones (Zala D et al., 2013). En cambio, la inhibición de la ATP sintetasa promovida por la incubación con la oligomicina A en las células cromafines produjo una depleción potente en el ATP secretado tras la estimulación con un agonista nicotínico (fig. 4.14). Los estudios con células permeabilizadas (Nakanishi et al., 1988) demostraban que los cambios sobre la secreción por la falta de ATP citosólico provenían más que de la falta de la purina dentro de la vesícula, del papel de esta molécula en sobre la maquinaria de exocitosis para la fusión vesicular, dada la recuperación de la secreción de CAs tras la adición de ATP en el medio extracelular. Esta evidencia, descartaba por

completo esta aproximación experimental para la modificación del contenido cuántico de purinas.

El EB como inhibidor del transporte vesicular de nucleótidos ha sido una herramienta ampliamente utilizada sobre SVs aisladas incluso antes de que el VNUT fuera identificado (Gualix J et al., 1999; Sawada et al., 2008; Miyaji et al., 2013). Sin embargo, pocos han sido los trabajos empleando este fármaco sobre células enteras. Nosotros hemos querido explorar si esta herramienta farmacológica es funcional en el bloqueo de la entrada de nucleótidos a los gránulos cromafines exponiendo durante tiempos entre 30 min y 2 h a las células cromafines en cultivo (fig. 4.15). Nuestros resultados, al contrario de las expectativas, reflejaron una secreción de ATP exacerbada. Si bien, el uso reciente de este tratamiento produjo un efecto completamente opuesto sobre células β y astrocitos (Geisler et al., 2013; Tsuboi et al., 2013) donde el ATP secretado fue reducido significativamente. En este sentido, es oportuno apuntar la necesidad de una optimización el protocolo de medición del ATP en los medios de secreción con el EB, ya que interfiere desmesuradamente con el método de detección enzimática de luminiscencia por lo que sin la substracción de esta interferencia es inevitable realizar mediciones infravaloradas.

Desde la identificación del transportador de nucleótidos vesicular (Sawada et al., 2008), los científicos han podido emplear una herramienta más adecuada para alterar el contenido de purinas en el interior de las SVs mediante la modulación de la expresión del VNUT (Sathe et al., 2011; Larsson et al., 2012; Geisler et al., 2013; Tsuboi et al., 2013; Sawada et al., 2008; Sakamoto et al., 2014). Es por ello que hemos seleccionado al transportador de nucleótidos vesicular como diana para la evitar la entrada del ATP a los gránulos cromafines. El silenciamiento del VNUT redujo de forma exitosa la secreción evocada de ATP en más de un 30% en presencia de 2 mM de Ca^{2+} extracelular. En cambio, la reducción de las concentraciones de calcio en el medio extracelular no produjo variaciones entre las condiciones control e interferidas con VNUT. Este resultado refuerza la especificidad en la modulación del componente purinérgico vesicular y no de otras vías no excitóticas.

La conjunción de estos resultados junto a las evidencias ya publicadas llevan al planteamiento de varias cuestiones: ¿Cómo el ATP vesicular puede mantenerse inalterable tras los cambios de concentración citoplasmáticos del transmisor?, ¿Es el ATP que entra dentro de las vesícula retenido por alguna fuerza intravesicular?, ¿Por qué son ineficaces los inhibidores del VNUT para el vaciado del ATP intravesicular?

Al pH del lumen vesicular ($\approx 5,5$) el ATP se encuentra predominantemente en la forma aniónica trivalente, dado su pK_a entre 6,95 y 0,9. El coeficiente de difusión en este estado ionizado dificulta muchísimo la salida por difusión de la purina a través de doble bicapa fosfolipídica vesicular. Sin embargo, las CA, poseen pK_a entre 8,55 a 8,93 que determinan fundamentalmente un estado catiónico más favorable a la salida por difusión (Edwards, 2007). Aceptando esta hipótesis, la actividad del VNUT para mantener ATP dentro de las vesículas no tendría que ser necesariamente muy alta, dado que como no hay difusión del transmisor, las SVs se mantendrían llenas, lo que explicaría la inefectividad de los inhibidores del transporte sobre células enteras. Un ejemplo de este mecanismo de retención por una baja difusión es la ACH, cuyo transportador inhibido por vesamicol no reduce el contenido cuántico de transmisores en ausencia de estimulación (Cabeza et al., 1988). Otra contribución que explicaría la baja tasa de recambio del ATP en la SV es su interacción con la CgA (Yoo et al., 1990). Las interacciones electrostáticas entre los residuos cargados positivamente de la CgA y los nucleótidos estarían a favor de la consideración del ATP como un componente inmóvil de las SVs (Machado et al., 2010). De esta manera se explicaría la reducción significativa de ATP en la médula adrenal de los ratones CgA-KO corroborada por el grupo del Dr. Mahata (Mahapatra et al., 2005).

5.3. ¿Es el ATP intravesicular más que un co-transmisor?

La atribución del papel del ATP dentro de las SVs como participante en la formación de un complejo intravesicular ayudante en la concentración de aminas es una vieja teoría (Hillarp et al., 1959; Winkler et al., 1980; Kopell et al., 1982). Sin embargo, la aceptación de la hipótesis de la transmisión purinérgica ha centrado la atención global del papel del ATP como neurotransmisor en la célula postsináptica o en la regulación

autocrina/paracrina, pero poco o nada se ha estudiado del viejo papel planteado del ATP dentro de estas organelas sobre la acumulación de CAs en los últimos 30 años.

Las estrategias empleadas en este sentido han estado dirigidas a la reducción de la purina citosólica que conllevan a un déficit de esta molécula implicada en numerosos procesos celulares. La inhibición de la producción mitocondrial de ATP por la oligomicina, además de reducir el ATP secretado, produjo una depleción de ambas CA de la misma potencia (fig. 4.14). A pesar de la grave regulación a la baja de la secreción, resulta dudosa la implicación del contenido cuántico en este proceso. La atribución de esta reducción de la secreción de CA la achacamos principalmente a un mal funcionamiento de la maquinaria exocitótica (Nakanishi et al., 1988) y no al contenido cuántico de CA. Además, el tratamiento con el EB, imposibilitó realizar una medida coherente del ATP por la reacción luminiscente, por lo que no podemos considerar su actividad inhibidora del VNUT en nuestras células. Hemos observado una potenciación de la secreción de CA y del tamaño cuántico de la que aún no tenemos una explicación (fig. 4.15).

Desde que el grupo del Dr. Moriyama identificara al gen del VNUT (Sawada et al., 2008) se han publicado alrededor de una treintena de artículos científicos en los que el estudio de la transmisión purinérgica ha acaparado toda la atención pero, de nuevo, en ninguno de ellos se ha mostrado interés en conocer el papel del ATP como regulador presináptico del contenido cuantal de CAs desde dentro de la vesícula.

Basándonos en nuestra hipótesis: “la alteración de la composición intravesicular de ATP debería traducirse en diferencias en el manejo de las CA por parte de las vesículas secretoras”, nosotros hemos caracterizado la secreción de CAs en células cromafines con el VNUT silenciado por HPLC con detección electroquímica observándose una reducción en la cantidad de CAs secretadas, fundamentalmente de adrenalina. Sin embargo, el contenido total de CAs celulares parece permanecer invariable (fig. 4.6).

5.4. La eficacia cuántica de las SV carentes de ATP.

A pesar de que esta reducción de la capacidad secretora ya se estableció en las células cromafines de los ratones carentes de VNUT (Sakamoto et al., 2014), la eficacia de la transmisión sináptica en términos de tamaño cuántico, frecuencia de exocitosis y la cinética de liberación se desconocían. Nuestra aportación fundamental ha sido dilucidar que esta disminución de CAs por la falta de ATP vesicular está atribuida a una reducción de más de la mitad del tamaño cuántico de las espigas secretoras detectadas por amperometría en célula única, demostrándose así que la presencia de ATP en el interior de las SVs es crucial en la concentración de CAs (fig 4.13; tabla 4.1).

El tamaño cuántico se ha modelado durante mucho tiempo como invariable, aunque ahora está bien establecido que el número de moléculas transmisoras liberadas por las SVs durante la exocitosis puede ser modulada en las sinapsis centrales y periféricas. Las principales intervenciones conocidas que alteran tamaño cuántico son: 1) los factores que afectan el contenido vesicular de CAs: la biosíntesis de catecolaminas, el transporte y su almacenamiento; 2) la modulación del tamaño cuántico por el modo de fusión de las SVs.

Dada la reducción del tamaño cuántico observada tras la depleción de ATP de las SVs inducida por el silenciamiento del VNUT, en nuestro estudio, hemos tratado de discernir qué factores determinantes de la eficacia presináptica de la transmisión son los responsables.

Dado que el contenido de CAs totales en las células cromafines control e interferidas no reflejó diferencias significativas (fig. 4.6), hemos descartado la posibilidad de una regulación por una carencia de transmisores. Es más, la aplicación de L-DOPA, una estrategia que demuestra la importancia de la cantidad de transmisor disponible para ser introducido a las SVs crucial en el aumento del tamaño cuántico en células PC12 (Omiatek et al., 2013; Dominguez et al., 2014), células cromafines (Díaz-Vera et al., 2010; Díaz-Vera et al., 2012; Montesinos et al., 2008) y las neuronas dopaminérgicas (Pothos et al., 1998), no revertió los efectos observados en la reducción de CAs secretadas por las células VNUT-KD.

De hecho, la DA secretada sólo tras la incubación con L-DOPA fue superior en las células control que en las de VNUT interferido (fig. 4.12).

Además de la cantidad de transmisores disponibles, el gradiente electroquímico de las SVs, la cantidad de VMAT expresada por vesícula y la capacidad de almacenamiento de los gránulos secretores son los mecanismos fundamentales que controlan el transporte y el almacenamiento de los transmisores en las SV.

En papel del gradiente de protones vesicular en la determinación del tamaño de cuántico de monoaminas ha sido extensamente investigado en células cromafines utilizando agentes farmacológicos que se dirigen a la bomba de protones V-ATPasa y el canal de cloruro. El empleo de la bafilomicina, un inhibidor de la bomba V-ATPasa, ha demostrado la importancia del gradiente de pH por disminuir el tamaño cuántico de CAs en varios estudios independiente (Camacho et al., 2006; Pothos et al., 2002). Sin embargo, los efectos del inhibidor de los canales de cloruro 5-nitro-2-(3-fenilpropilamino) benzoico (NPPB) eran menos claros, ya que existe una controversia entre los datos que defienden un solo grupo encontrado un pequeño pero significativo efecto inhibitor sobre tamaño cuántico (Pothos et al., 2002), mientras que datos de nuestro laboratorio no mostraron ningún efecto (Camacho M. et al 2006).

Hasta el momento, no tenemos datos suficientes sobre si el pH de los gránulos carentes del VNUT ha sido modificado. Sin embargo, sabemos que sorprendente el transportador de glutamato vesicular VGLUT2 participa en la acidificación las vesículas sinápticas dopaminérgicas. El VGLUT2 es capaz de disminuir pH vesicular siendo capaz de regular el tamaño cuántico de DA (Hnasko et al., 2010). Al igual que el glutamato, el ATP proporciona cargas aniónicas al interior vesicular que podrían promover la acidificación de una forma similar. Sin embargo, no existen pruebas que demuestren que VNUT se comporta en la misma dirección. De forma opuesta, las vesículas sinápticas de cerebro de los ratones VNUT-KO mostraron niveles elevados de la subunidad A de la bomba de protones V-ATPasa, lo que indicaría que las vesículas carentes de ATP podrían tener un pH inferior (Sakamoto et al., 2014). Experimentos preliminares en nuestro laboratorio parecen tender a apoyar esta idea, pues la fluorescencia de la construcción NPY-EGFP, cuya intensidad es

inversamente proporcional al pH resultó ser mayor en las células control que en las de VNUT interferido (Anexo III). No obstante, los gránulos cromafines de ratones VNUT-KO no reflejaron diferencias en la expresión de la bomba de protones (Sakamoto et al., 2014). Todos estos resultados controvertidos llevan a pensar que el pH de las vesículas carentes de ATP sigue siendo una pregunta por resolver.

Diferentes grados de eficiencia del VMAT, debido a los cambios en expresión de la proteína o en la actividad de transporte, son factores que contribuyen a un impacto en el tamaño cuántico. Así, por medio de la amperometría se ha demostrado que inhibidores del transporte de VMAT, como la reserpina o la tetrabenazina reducen el tamaño cuántico entre 25 al 45 % de células cromafines control (Mundorf et al., 2000). Otro ejemplo de regulación se observó en los ratones transgénicos que expresan un 5% de VMAT-2 de tipo salvaje en los que se observó una fuerte reducción de DA secretada detectada por voltametría cíclica (Patel et al., 2003). En cambio, la sobreexpresión del VMAT-2 indujo un aumento en el tamaño cuántico en las células PC12 (Pothos et al., 2002).

Tanto las vesículas sinápticas como los gránulos cromafines de los ratones VNUT-KO presentaron una expresión de VMAT-1 y VMAT-2 inalterados con respecto a los ratones control (Sakamoto et al., 2014), lo que pondría en duda un control del tamaño cuántico a este nivel.

La acumulación de altas concentraciones de CAs dentro de las SVs no sólo depende en el gradiente de pH vesicular y en función de VMAT sino también de la capacidad de almacenamiento del lumen vesicular. Volviendo al modelo de difusión no específica propuesto por el Dr. Robert Edwards (Edwards, 2007) para explicar el funcionamiento del transportador VMAT en los gránulos cromafines, las monoaminas transportadas al interior de las SVs por el VMAT son fácilmente difundidas a través de la membrana vesicular hasta el citoplasma, dada la alta permeabilidad por la forma catiónica que prevalece al lado intravesicular. Así, las CAs que entran vuelven a salir de manera que incluso en equilibrio, el número de transportadores de CAs que median la entrada modularían el contenido cuántico (Fon et al., 1997; Pothos et al., 2000; Song et al., 1997). Si en este modelo de difusión introducimos factores que se asocian por interacciones a las CAs, la difusión se vería retrasada repercutiendo en un

aumento del contenido cuántico de las SVs (fig. 5.1, A). Ejemplos de la contribución de estos factores retardadores de la difusión se han demostrado en nuestro laboratorio con el estudio de la exocitosis de células cromafines sin los componentes mayoritarios de la matriz vesicular, las Cgs (Díaz-Vera et al., 2010; Díaz-Vera et al., 2012; Montesinos et al., 2008) (fig. 5.1, B). Pero no sólo las Cgs se han visto involucradas en la acumulación de CAs, el ATP forma parte del contenido intragranular formando complejos débiles con las CAs. Por medio de la microcalorimetría, otros investigadores al igual que nosotros, hemos podido comprobar que la fuerza con la que éstas interaccionan con el ATP son débiles (Weber et al., 1973), no obstante hemos comprobado que son importantes dado que el ATP reducido en el interior de las SVs conlleva a que las CAs libres sean más susceptibles de ser perdidas por difusión (fig. 5.1, C).

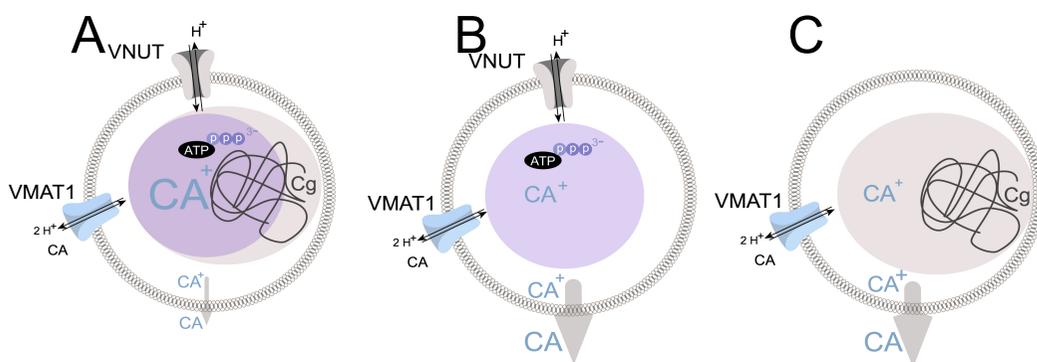


Figura 5.1. Modelo explicativo de los cambios en la capacidad de retención de las catecolaminas en los granulos secretorios VNUT-KD, CgAB-KO en comparación con un control. La difusión neta (flecha gris) de las CA a través de la membrana vesicular hacia el citosol es mayor en granulos afectados por la falta de Cgs (B) o por la carencia de VNUT y por tanto, ATP (C) que en granulos control (A). La interacción de las CA con los componentes intravesiculares previene la difusión aumentando el contenido cuántico de CA.

El segundo punto de control principal de la eficacia cuántica no depende de la cantidad de transmisor acumulado en las SVs sino más bien de la manera en la que éstos son liberados. La presencia de factores intravesiculares que retrasan la liberación de CA se pone de manifiesto tras observar las discrepancias que existen, entre la difusión predicha, dado el coeficiente de difusión de las CA, y la observada por amperometría

(Alvarez de Toledo et al., 1993; Wightman et al., 1995; Segura et al., 2000; Venton et al., 2002). La difusión es más lenta de lo esperado, lo cual indica que ésta debe estar regulada tras la fusión de las vesículas (Rahamimoff and Fernandez, 1997). Las dos posibilidades de regulación que se han propuesto son: la apertura del poro de fusión (Lindau and Alvarez de Toledo, 2003) y, el aspecto que se examina en el presente trabajo, el papel de los componentes intravesiculares, como la matriz vesicular (Alvarez de Toledo et al., 1993; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008; Venton et al., 2002; Wightman et al., 1995). La participación de la matriz en la exocitosis ha sido puesta de manifiesto hasta el momento de forma indirecta por medio de distintas técnicas, tales como la manipulación del pH extracelular y la composición iónica (Jankowski et al., 1994), la manipulación del pH intravesicular (Camacho et al., 2006) ó de la presión osmótica del medio extracelular (Borges et al., 1997) y mediante el uso de fármacos que desplazan las catecolaminas de la matriz (Machado et al., 2002). Así se ha visto que, pequeñas variaciones en la conformación de las cromograninas dan como resultado el cambio en su afinidad por las CAs (Borges et al., 1997; Leszczyszyn et al., 1990; Pihel et al., 1996; Rahamimoff and Fernandez, 1997; Schroeder et al., 1996).

Los parámetros cinéticos de la exocitosis nos proporcionan información acerca la liberación de CAs (Schroeder et al., 1996) proporcionándonos así, una estimación del efecto del cambio la composición del contenido intravesicular. Este análisis de la cinética de las espigas amperométricas de VNUT-KD muestra que no hay variaciones en la cinética de liberación (tabla 4.1). El análisis de cada evento exocitótico por separado de las células VNUT-KD, indica que la disminución en la carga (Q) se ve reflejada en la disminución de la I_{max} , pero no afecta a la pendiente (m), indicando que posiblemente el papel del ATP sea de un facilitador en la acumulación de CA (fig. 4.13; E).

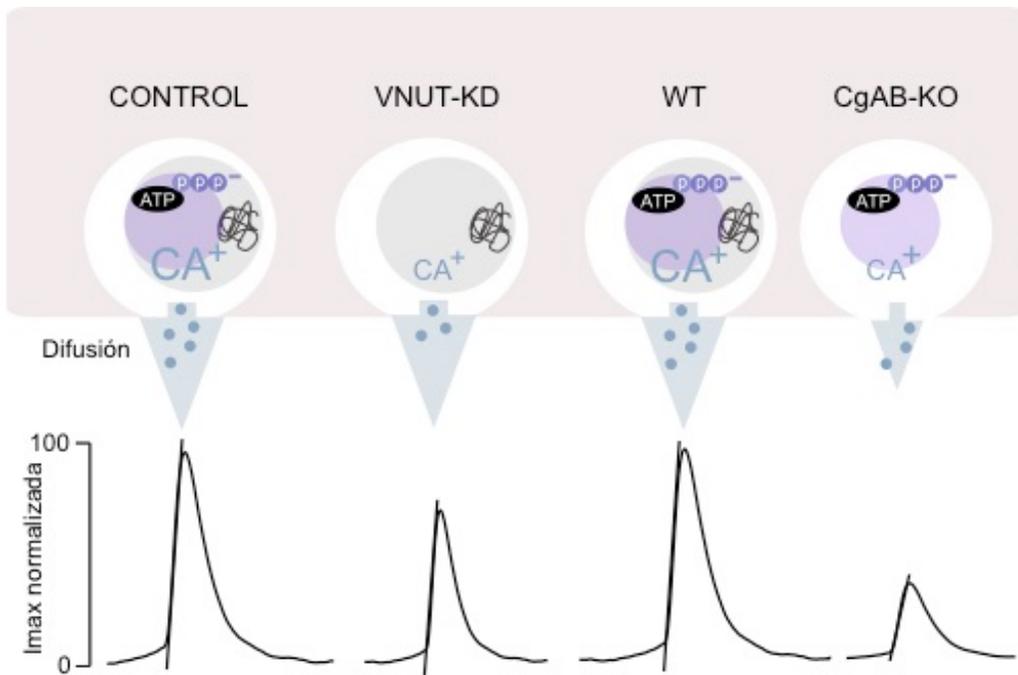


Figura 5.2. Modelo de los cambios en la cinética de la exocitosis en gránulos cromafines VNUT-KD y CgAB-KD respecto a sus controles *scramble* y WT respectivamente. Para la representación del proceso no se han respetado las escalas reales. Las espigas medias se han hallado mediante la normalización de su I_{max} . Se muestra la pendiente (m) con una línea de color negro.

5.5. ¿Es el ATP almacenado preferentemente en los gránulos cromafines adrenérgicos frente a los noradrenérgicos?

El efecto de regulación específica de sólo una de las CAs secretadas en las células con VNUT interferido, a diferencia del resultado de reducción similar de la A y la NA observado por el bloqueo de la maquinaria exocitótica por la oligomicina A (fig. 4.14), podría reflejar la repercusión peculiar de la falta de ATP en las SVs. Esta especificidad es un resultado cuya interpretación no está del todo clara. Por ello decidimos realizar una caracterización mediante purificaciones de los fenotipos celulares cromafines y en los gránulos secretores que contienen.

En la caracterización de la expresión del VNUT en los diferentes fenotipos celulares de la médula adrenal, las células noradrenérgicas y adrenérgicas, hemos detectado una mayor cantidad de transportador vesicular asociado a las células que almacenan noradrenalina (fig. 4.16;

C). Ante este hallazgo, cabe pensar en la posibilidad de que el silenciamiento del VNUT podría ser más eficiente en aquellas células donde se expresa con una menor potencia; de forma que la expresión del VNUT en células adrenérgicas podría ser interferida con mayor efectividad que en las células noradrenérgicas, repercutiendo así mayoritariamente sobre la secreción de adrenalina.

Además, es necesario considerar que aproximadamente un 80% de las CAs de las células aisladas a partir de la médula adrenal proviene de las células adrenérgicas (fig. 4.16; B). Este valor refleja la alta proporción de células de fenotipo adrenérgico en un cultivo celular bovino. La predominancia de adrenalina sobre la noradrenalina en este sentido, podría ser la explicación a la mayor reducción de la adrenalina secretada observada por el déficit de ATP intravesicular.

El grupo del Dr. Moriyama demostró por primera vez que el VNUT estaba asociado a las LDCVs de la médula adrenal de ratón mediante el inmunomarcaje de secciones observadas por microscopía electrónica (Sawada et al., 2008). A pesar de la importancia del hallazgo, este trabajo proporciona poca información sobre la relación del ATP con proteínas propias de las SVs o cotransmisores.

Para atribuir de una manera más elegante la relación de VNUT a los gránulos cromafines, las diferentes CAs almacenadas, las proteínas de las que están enriquecidos y el contenido de ATP, realizamos la separación de fracciones de SVs purificados en un gradiente de densidad continuo. El análisis bioquímico de las proteínas típicas y más abundantes de estas organelas, la CgA, la CgB, la SgII, el VNUT y el ATP, y electroquímico de las CAs, permitió conocer que el ATP se co-distribuye con las CAs en un intervalo promedio de ratios molares desde 4,5 hasta 10 en varios experimentos independientes, números que son coincidentes a los previamente publicados (Winkler et al., 1976; Terland et al., 1979; Bolstad et al., 1980; Winkler et al., 1980 y Corcoran et al., 1986b). Sin embargo, esta relación no fue de la misma manera para cada una de las CAs. En este sentido, hemos encontrado que a unos niveles de proteína total y de SgII equiparables, los gránulos cromafines menos densos, enriquecidos en A poseen una mayor cantidad de ATP que los más densos, enriquecidos en NA. A pesar de estas diferencias en el contenido de ATP, la cantidad

del transportador de nucleótidos fue similar entre ambas fracciones (fig. 4.6). Sin embargo, el contenido proteico de cromograninas se comportó de manera diferencial, siendo la CgB más abundante en la fracción más enriquecida en A y la CgA más evidente en la fracción enriquecida en NA. Estos resultados se ajustan con el perfil de expresión observado tras la purificación de los fenotipos cromafines (fig. 4.16) y además, son coincidentes con la evidencia de que los ratones carentes de CgB poseen una deficiencia en A en la médula adrenal (Díaz-Vera et al., 2010).

5.6. VNUT y la probabilidad de fusión.

La primera observación que hicimos mediante los estudios de secreción a punto final y la secreción a tiempo real bajo el estímulo con DMPP, fue una importante bajada de la secreción total de CA por las células cromafines con VNUT interferido, datos que se asemejaban a lo recientemente descrito para los ratones carentes del transportador de nucleótidos (Sakamoto et al., 2014). Por medio de la amperometría pudimos estudiar que la respuesta exocitótica explicaba, al menos en parte, la reducción de la secreción de CAs, dada la reducción en el número de eventos de fusión.

La eficacia de la transmisión sináptica está determinada por el fenómeno de la exocitosis y en ella influyen el tamaño cuántico, y la cinética con la que la liberación, así como la frecuencia de eventos de fusión.

Acorde con este esquema, un incremento de la neurosecreción se produciría por un incremento en el número de eventos. Esto implica que una modulación en la respuesta postsináptica se podría llevar a cabo con un cambio en el número de vesículas que van a llegar a realizar la exocitosis en los terminales nerviosos lo que se denomina modulación por frecuencia de la talla cuántica.

Existen 3 factores fundamentales que rigen probabilidad de liberación de una vesícula: 1) el número de vesículas preparadas para la liberación; 2) las interacciones moleculares que provocan que el anclaje, la activación y la fusión de las vesículas, lo que implica a los componentes de la maquinaria de liberación (Schneppenburger et al., 2002; von Gersdorff and

Borst, 2002; Rosenmund et al., 2003) y 3) el potencial de acción y las variaciones en la respuesta que disparará la exocitosis como los canales iónicos de Ca^{2+} .

El número de vesículas disponibles para el anclaje está regulado fundamentalmente por la biogénesis de SVs, además de por la sinapsina, una proteína asociada a las vesículas que provoca la unión de las mismas a los filamentos de la red de actina. La fosforilación de esta proteína provoca que las vesículas se desplacen hacia la zona donde se producirá el anclaje de las vesículas. Una alteración de esta fosforilación se admite como un método de modulación de la cantidad de vesículas liberadas. Así, experimentos con fármacos que disminuyen la fosforilación de la sinapsina, como la proteína fosfatasa 2A, reduce la disponibilidad de las vesículas para el anclaje. Además el uso mutantes de sinapsina I, ha mostrado que se produce una disminución en el número de vesículas ancladas (Li et al 1995).

Ante la posibilidad de una regulación a nivel la disponibilidad de las vesículas nosotros hemos estudiado si la biogénesis y la aproximación a la membrana plasmática de los gránulos secretores en las células con carencia de VNUT estaba modificada. Para ello realizamos una cuantificación de la expresión de la proteína quimérica NPY-EGFP en estructuras granulares (fig 4.11) mediante microscopía TIRFM. Hemos observado que la cantidad de SVs de nueva síntesis bajo la influencia de la falta de VNUT no es un factor limitante en la producción y la aproximación de gránulos secretores a la membrana plasmática por lo que hemos descartado esta posibilidad como factor limitante de la probabilidad de liberación.

La maquinaria básica bajo la cual se produce la fusión vesicular está muy bien estudiada y ha sido descrita en un largo número de revisiones (Sudhof 2004; Burgoyne et al. 2003). Las vesículas secretoras son atracadas, activadas y fusionadas a través de la formación del complejo SNARE. Obviamente, alteraciones en la formación del complejo SNARE, o su disrupción, impiden el paso de las vesículas desde la fase de anclaje hacia la activación y su posterior fusión, provocando de nuevo un cambio en el número de vesículas que van a llegar a realizar la exocitosis.

En este sentido, aún por el momento, nosotros no hemos estudiado la posibilidad de una regulación sobre la maquinaria de exocitosis. Si bien es cierto que según lo publicado por el grupo del Dr. Moriyama estudiando la expresión de las proteínas SNARE principales: SV2, VAMP2, sinaptofisina y sinaptotagmina; en las vesículas sinápticas de ratones VNUT-KO no se observaron variaciones respecto a las de ratones salvajes.

Por otra parte, el proceso exocitótico está controlado por la eficacia de disparo del incremento de Ca^{2+} intracelular. La vía más importante para incrementar el Ca^{2+} citosólico desde el exterior se realiza por entrada a través de canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje (VSCC) localizados en la membrana plasmática. Como los VSCC son cruciales para la regulación de la entrada de Ca^{2+} y su subsiguiente exocitosis, estos canales están sujetos a una modulación por muchos factores, incluyendo la autoinhibición y modulación autocrina (Villarroya et al., 1999; Carbone et al., 2001). Existen numerosos factores exógenos que pueden modular la entrada de Ca^{2+} a través de VSCC como ciertos fármacos, péptidos endógenos, etanol, así como el ATP que modulan los canales de Ca^{2+} y por ello la secreción de transmisores (Carbone et al., 2001; Baldelli et al., 2004; Tomé AR et al., 2007). Además, los canales de Ca^{2+} no sólo permiten la entrada de Ca^{2+} requerida para el disparo de la exocitosis, sino que en algunas neuronas del SNC incluso interactúan directamente con las proteínas SNARE (Hernandez-Guijo et al., 1999).

Dado que nuestros resultados de la señalización del Ca^{2+} en las células con carencia de VNUT no revelaron modificaciones en esta línea (fig. 4.10), también hemos descartado esta posibilidad de regulación que explique los cambios observados en la frecuencia de eventos exocitóticos.

El estudio de la exocitosis realizado por medio de la amperometría con la aplicación de Ba^{2+} en células control frente a las VNUT-KD (fig. 4.13) resultó en una disminución del contenido cuántico acompañado de la frecuencia de exocitosis fundamentalmente en los primeros eventos secretores, que hemos identificado provenientes de las SVs de nueva síntesis. Dado que los cambios de tanto el contenido cuántico y la probabilidad de fusión parecen estar asociados solamente a los primeros eventos exocitóticos, mientras que en el resto se restablecen los valores de

las células control, podemos sugerir que son las propias SVs carentes de VNUT o de ATP las que determinan la eficacia sináptica.

En trabajos publicados recientemente, se ha demostrado que participan, al margen de los factores que involucran la maquinaria de exocitosis, las propiedades de las propias SVs tales como el número de copias de transportadores vesiculares así como su contenido cuántico. Con este modo de regulación de la probabilidad de fusión se han descrito las vesículas que contienen VGLUT1, cuya interacción con la proteína endofilina 1 media la habilidad de la facilitación en la liberación, teniendo las SVs de ratones *knock-out* heterocigóticos VGLUT una menor probabilidad de liberación que las de los ratones control (Herman et al., 2014). Además, las SVs de GABA, cuya presencia de VIAAT fueron determinantes de la carga y la probabilidad de fusión (Wojcik et al., 2006).

Estas evidencias indican el contenido intravesicular afecta la probabilidad de fusión de la vesícula lo que sugiere otro mecanismo por el cual una célula podría modular su eficacia liberación. De esta manera, hipotetizamos la posibilidad de que la existencia de un control de la probabilidad de fusión relacionada con el número de transportadores VNUT y la carga de ATP de las SVs que explicaría el comportamiento secretor de las células carentes de transportador de nucleótidos vesicular.

Conclusiones/Conclusions

6. CONCLUSIONES.

1. El VNUT es la proteína responsable de la concentración de ATP en los gránulos cromafines.
2. El ATP es almacenado mayoritariamente en vesículas secretoras que contienen adrenalina.
3. El ATP vesicular es crucial para la regulación del contenido cuántico de catecolaminas, especialmente de la adrenalina.
4. Las vesículas de nueva síntesis son preferentemente liberadas frente a las más viejas.
5. La expresión del VNUT y la presencia del ATP vesicular contribuyen a facilitar el acoplamiento excitación-secreción mediante el incremento de la frecuencia de eventos exocitóticos.

6. CONCLUSIONS.

1. VNUT is the protein responsible for the concentration of ATP inside chromaffin granules.
2. ATP is preferentially stored in adrenaline-containing secretory vesicles.
3. The vesicular ATP is crucial for maintaining the catecholamine quantal size, being specially important to adrenaline.
4. The newly synthesized vesicles are released preferentially vs. the old ones.
5. The expression of VNUT and the presence of vesicular ATP facilitates the stimulus-secretion coupling by increasing the frequency of exocytotic events.

Anexos

7. ANEXOS.

ANEXO I. Soluciones de trabajo empleadas.

SOLUCIÓN	COMPOSICIÓN	APLICACIÓN
Locke	154 mM de NaCl; 5,6 mM de KCl; 3,6 mM de NaHCO ₃ ; 10 mM de HEPES y 11 mM de glucosa; pH 7,3. Solución esterilizada por el paso a través de filtro de Ø 0,02 µm. Tras ello se añaden 40 mg/L de gentamicina y 50 UI/L de penicilina.	Cultivos celulares
Colagenasa	2 mg/mL de colagenasa tipo IA (300-480 UI/mg) y 4 mg/mL de BSA	Cultivo primarios de células cromafines
TENT 1%	50 mM de Tris-HCl a pH 7,4, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 1% de Tritón-X100	Lisados celulares y vesiculares
LB	10g de Triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl, pH=7 y se autoclava	Medio de cultivo para bacterias
RF1	100 mM de RbCl, 50 mM de MnCl ₂ , 10 mM de CaCl ₂ , 30 mM de acetato sódico, 15% de glicerol y pH 5,8 con ácido acético	Preparación de bacterias competentes
RF2	10 mM de RbCl, 75 mM de CaCl ₂ , 10 mM de MOPS, 15% de glicerol, pH 6,8 ajustado con NaOH	Preparación de bacterias competentes
Laemmli 6X	10% de SDS; 20% de glicerol; 10% de 2-mercaptoetanol; 0,004% de	Tampón de carga SDS-

	azul de bromofenol; y 0,125 M de Tris-HCl	PAGE
Gel stacking	poliacrilamida al 4%, 0,13 M de tampón Tris-HCl a pH 6,8; 0,1% de SDS; 0,12% de APS; 0,13% de TEMED	SDS-PAGE
Gel resolving	poliacrilamida al 7,5%, 0,38 M de tampón Tris-HCl a pH 8,8; 0,1% de SDS; 0,08% de APS; 0,08% de TEMED	SDS-PAGE
PBS	136,9 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 8,1 mM de Na ₂ HPO ₄ , 1,76 mM de KH ₂ PO ₄	
Solución quenching	100 mM glicina en PBS 1x	
Solución de permeabilización	0,1 % de Tween-20 en PBS1x	
Solución de bloqueo	5% de FBS en solución de permeabilización	
Krebs-HEPES	140 mM de NaCl, 5,9 mM de KCl, 1,2 mM de MgCl ₂ , 2 mM de CaCl ₂ , 10 mM de HEPES y 11 mM de glucose a pH 7,4	Amperometría Secreción

ANEXO I. Densidad de siembra de las células cromafines según la superficie empleada.

EXPERIMENTO	DENSIDAD	PLACA DE CULTIVO
Amperometría	50.000	Cubreobjetos de 12 mm Ø tratados con 0,01% de poli-D-lisina en placas de cultivo de 24 pocillos

Inmunofluorescencia	300.000	Cubreobjetos de 12 mm Ø tratados con 0,01% de poli-D-lisina en placas de cultivo de 24 pocillos
TIRFM	300.000	Cubreobjetos de 18 mm Ø tratados con 0,01% de poli-D-lisina en placas de cultivo de 6 pocillos
Western blot y extracción de RNA	$3 \cdot 10^6$	Siembra sobre placas de cultivo de 90 mm Ø
Secreción a punto final	500.000	Siembra sobre placas de 24 pocillos tratadas con 0,01% de poli-D-lisina
Secreción a tiempo real	$3 \cdot 10^6$	Siembra sobre placas de cultivo de 90 mm Ø
Medidas de Ca²⁺ intracelular	500.000	Cubreobjetos de 18 mm Ø tratados con 0,01% de poli-D-lisina en placas de cultivo de 6 pocillos

ANEXO II. Optimización de la eficacia de interferencia de VNUT en cultivos primarios de células cromafines bovinas.

A diferencia de los modelos transgénicos, la aplicación de estrategias de modulación *in vitro* de la expresión génica sobre proteínas cuyo destino final es la SV son difícilmente traducidos dado que comprometen la integridad de solamente una pequeña parte de la población total de las mismas, las SV de nueva génesis. Sólo una pequeña proporción de estas organelas, las de nueva síntesis, incorporarán la variación introducida.

Con el fin de promover la biogénesis de gránulos y por ende, la síntesis del transportador de nucleótidos vesicular para ser incorporado en las mismas en las células cromafines nucleofectadas con los siRNA, ensayamos la eficacia de interferencia del VNUT en condiciones control o de estimulación durante 5 min en la solución despolarizante Krebs-HEPES con 35 mM de KCl estéril antes de realizar la electroporación.

La detección de VNUT mediante western blot determinó que la eficiencia de silenciamiento fue más eficaz aplicando este tratamiento (fig. AII), por lo que los experimentos de interferencia fueron realizados aplicando este tratamiento.

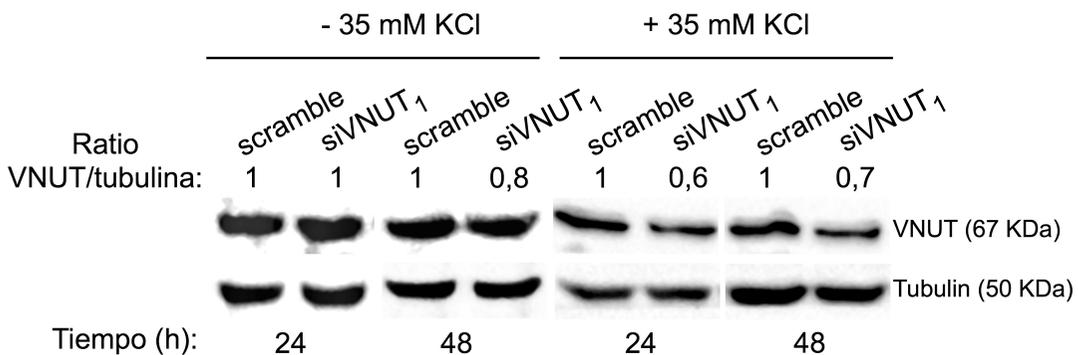


Figura AII. Eficacia del silenciamiento del VNUT bajo un estímulo despolarizante.

Western blot de lisados de células cromafines bovinas nucleofectadas con los siRNAs control o específico de VNUT después de la incubación durante 5 min con la solución Krebs-HEPES (5 mM potasio; indicado como -35 mM KCl) o Krebs-HEPES alto potasio (+35 mM KCl). La intensidad de la banda de tubulina se tomó como control de carga en cada carril y así determinar la relación VNUT/tubulina. Los valores fueron normalizados a la ratio de la condición control a las 24 y a las 48 h después de la nucleofección.

ANEXO III. El pH vesicular en células VNUT-KD.

Para realizar una valoración de la posibilidad de que la acidificación de las vesículas pudiera estar modificada en las células cromafines VNUT-KD, realizamos nucleofecciones simultáneas de los siRNAs junto al cDNA que codifica la proteína NPY-EGFP. Esta quimera ha sido ampliamente utilizada para medir oscilaciones de pH en vesículas secretoras (Taraska., et al 2003). Dado que la proteína EGFP sufre cambios conformacionales dependientes del pH que se traducen en modificaciones de la intensidad de fluorescencia, a pH más ácido la emisión es más baja que a pH alcalino, esta estrategia nos podría revelar la posibilidad de variaciones.

El análisis de fluorescencia de las estructuras granulares en células portadoras de los siRNA y en las proximidades de la membrana plasmática por medio de la microscopía de onda evanescente indicó que la intensidad es $\approx 30\%$ menor en las SV de células VNUT-KD (fig. AIII). Esto indicaría la posibilidad de una potenciación de la acidificación en estas SV afectadas por la falta de ATP y su transportador.

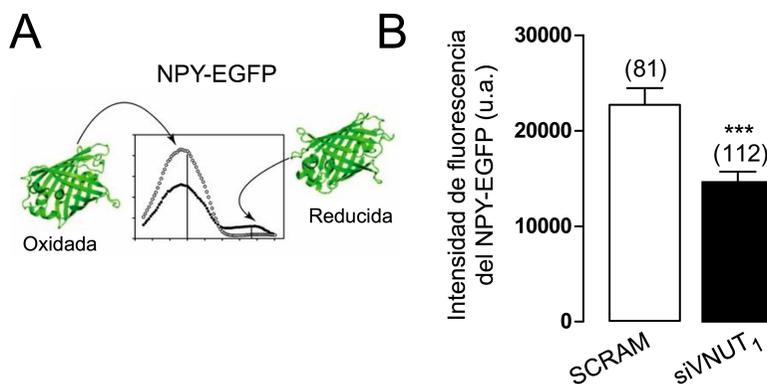


Figura AIII. Medida de fluorescencia del NPY-EGFP como indicador del pH intravesicular. **A.** Representación esquemática del espectro de emisión de la proteína GFP, dependiente del estado de oxidación (Tomado de Amy Palmer et al., 2011). **B.** Cuantificación de la intensidad de fluorescencia del NPY-EGFP mediante microscopía TIRFM en células positivas para el siRNA-Cy3 (fluorescencia superior a la media del ruido de fondo ± 3 veces las SD). Se representa la media \pm SE del número de spots presentes en el plano TIRFM de $n=5$. $p < 0,0005$; U de Mann Withney.

Anexo IV. Medidas de complejación entre ATP y catecolaminas.

I. La calorimetría isoterma de titulación (ITC).

La microcalorimetría, conocida también como calorimetría isoterma de titulación, es una técnica usada para cuantificar de manera directa los parámetros termodinámicos de una interacción en disolución.

Los parámetros termodinámicos que podemos medir con esta técnica son la constante de afinidad (K_a), los cambios de entalpía (ΔH), así como la estequiometría de la interacción (n). Además con estas medidas también podemos estimar las variaciones de los valores de la energía de Gibbs (ΔG) y de la entropía (ΔS).

Con el objetivo de clarificar la estequiometría de la reacción entre las CAs y el ATP, hemos aplicado esta técnica utilizando un microcalorímetro ITC200 (Malvern Instruments Ltd.). El ATP en la celda de trabajo se empleó a una concentración de 0,6 mM mientras que la DA en la jeringa de inyección a una concentración de 12 mM; ambos preparados en un tampón fosfato 0,066 M a pH 5,5. La titulación fue realizada a 25°C con inyecciones de 2 μ l en intervalos de \approx 0,5 min con una velocidad de agitación de 250 rpm. Los controles de interacción fueron realizados inyectando DA sobre el tampón de trabajo en ausencia de ATP, permitiendo la substracción del ruido de fondo no específica.

El área de las deflexiones de calor obtenidas en cada registro fue cuantificada, representada empleando el software Origin 7.0 y GraphPrism respectivamente.

Como se observa en la figura AIV; A, la inyección de DA sobre ATP produjo reacciones exotérmicas, indicativas de la reacción entre las moléculas. El valor de las áreas del calor desprendido tras cada inyección con respecto al cociente entre las concentraciones (ratio molar) fue representado y ajustado a una curva sigmoide con un valor de $R^2 > 0,95$ (fig. AIV; B).

De forma similar a los experimentos previos del estudio de la interacción entre las CAs y el ATP (Weder and Wiegand , 1976), la amplitud máxima de las interacciones, alcanzó valores próximos a 3 ($\Delta H=-$

2,8). Sin embargo, la estequiometría reflejó valores inferiores ($n=2,5$) respecto a 4 (Weder and Wiegand , 1976), sugiriendo que la mayoría de las CAs se pueden almacenar como un complejo con ATP. Estos datos reforzarían la relación encontrada entre las CAs y el ATP por los estudios de RMN, en los que se estima la estequiometría 2:1 o incluso 1:1(Granot et al., 1976).

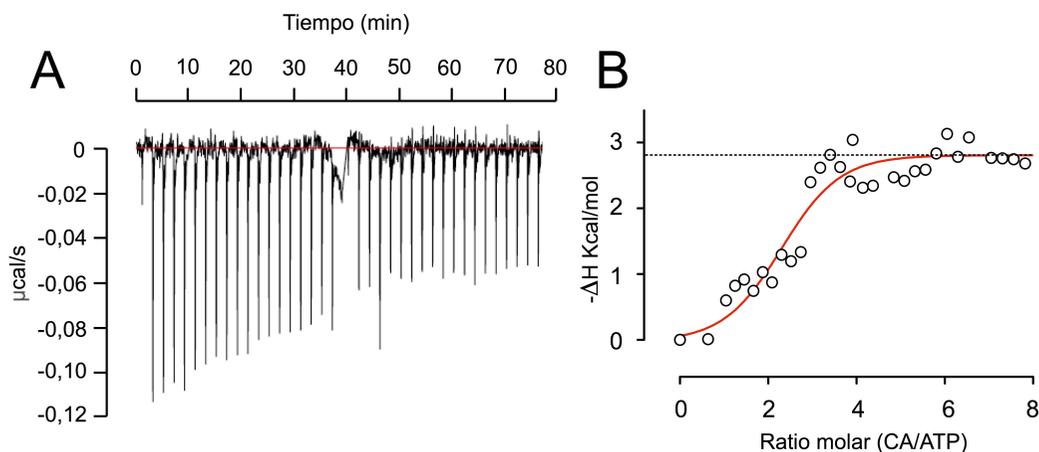


Figura AIV. El estudio de la interacción de DA y ATP mediante la microcalorimetría.
A. Datos crudos de un experimento de ITC. **B.** Calor desprendido de la reacción entre la DA y el ATP respecto a la relación molar.

II. La cronoamperometría.

La cronoamperometría es una técnica electroquímica en la que por medio de la modificación del potencial de un electrodo de trabajo en el tiempo, por la aplicación de pulsos cuadrados de voltaje, pueden ser detectadas las corrientes de oxidación-reducción de las moléculas que están en contacto con la superficie, después de la substracción de las corrientes farádicas. Las corrientes obtenidas resultan ser modificadas en el tiempo, siendo este comportamiento indicativo del coeficiente de difusión de las moléculas en solución.

Otra forma de acercarnos a la comprensión de la forma de interacción de las CAs con el ATP podría ser el estudio de estos coeficientes de difusión de las CAs con y sin la presencia del ATP, que hasta el momento no han sido explorados.

En este sentido, diseñamos un experimento en el que, utilizando un electrodo tradicional para el estudio de amperometría (ver apartado 3.x) y la aplicación de pulsos de voltaje de -400 a +400 mV mediante un potenciostato controlado por el software (LabChart 7.0) (fig. AV; A), pudimos registrar la corriente de oxidación y reducción de 50 μM de A en una solución Krebs-MES (pH 6,6) con la adición de ATP en diferentes relaciones (0 hasta 5, ATP:CA), (fig. AV; B). El coeficiente de difusión de la A, representado en la pendiente de las curvas de corriente frente a $1/t^{-1/2}$, no fue modificada con la adición de ATP (fig. AV; C). Sin embargo, la corriente de oxidación detectada por el electrodo de carbono fue sustancialmente disminuida (fig AV; D). No obstante, esta reducción de la oxidación no ocurrió tras el paso de la muestra por una columna cromatográfica (fig. AV; d).

Esta reducción de la corriente de oxidación podría por tanto, ser indicativa de la disponibilidad de moléculas de A a ser oxidadas, lo que refleja el fenómeno de interacción entre las CAs y el ATP.

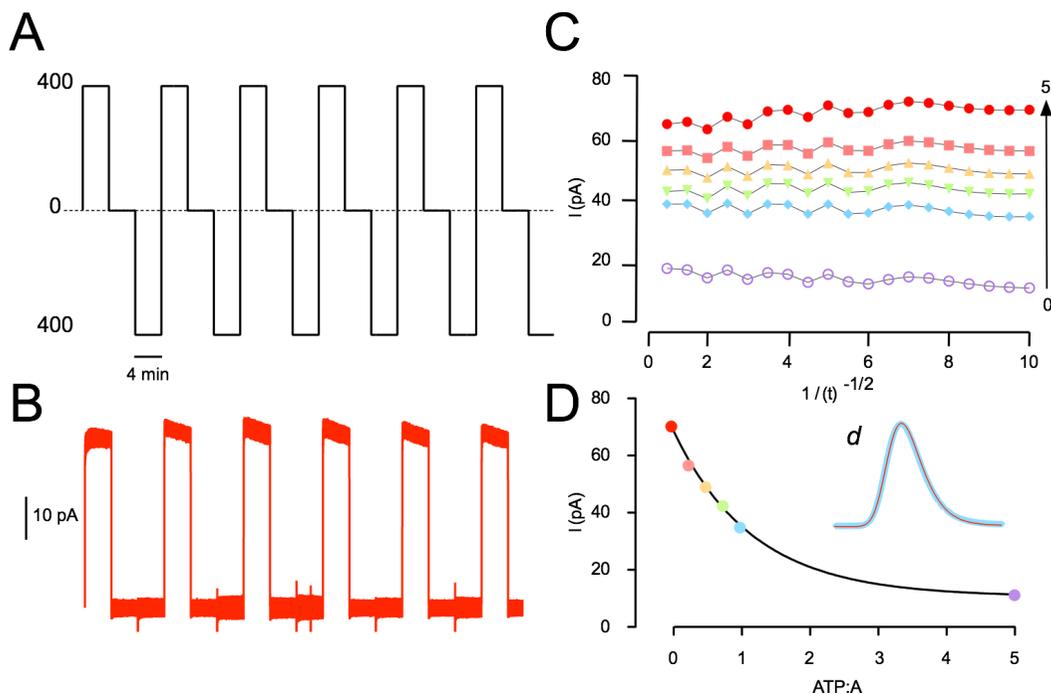


Figura AV. La cronoamperometría aplicada al estudio de la interacción de las CAs con el ATP. A. Pulsos cuadrados de voltaje aplicados en el tiempo. **B.** Corrientes de oxidación tras la substracción de las corrientes capacitativas resultantes de los cambio de

voltaje aplicados representados en (A). **C.** Corrientes de oxidación frente a $1/t^{-1/2}$ de soluciones de A en relaciones molares crecientes de ATP. **D.** La disminución de la capacidad de oxidación de la A en presencia de ATP obtenida del estudio de cronoamperometría es dependiente de la interacción de las moléculas, dado que la separación por una columna cromatográfica (**d**) no refleja variaciones en los perfiles oxidativos..

Bibliografía

8. BIBLIOGRAFÍA.

Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., De Toledo, G. A., & Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*, 389(6650), 509-512.

Aleu, J., Martín-Satué, M., Navarro, P., Lara, I. P., Bahima, L., Marsal, J., & Solsona, C. (2003). Release of ATP induced by hypertonic solutions in *Xenopus* oocytes. *The Journal of physiology*, 547(1), 209-219.

Apps, D. K. (1997, April). Membrane and soluble proteins of adrenal chromaffin granules. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 8, No. 2, pp. 121-131). Academic Press.

Arvan, P., & Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem. J*, 332, 593-610.

Ashery, U., Varoqueaux, F., Voets, T., Betz, A., Thakur, P., Koch, H., ... & Rettig, J. (2000). Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *The EMBO journal*, 19(14), 3586-3596.

Aunis, D., & Langley, K. (1999). Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta physiologica scandinavica*, 167(2), 89-97.

Bahima, L., Aleu, J., Elias, M., Martín-Satué, M., Muhaisen, A., Blasi, J., ... & Solsona, C. (2006). Endogenous hemichannels play a role in the release of ATP from *Xenopus* oocytes. *Journal of cellular physiology*, 206(1), 95-102.

Baker, P. F., & Knight, D. E. (1978). Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes.

Baldelli, P., Hernández-Guijo, J. M., Carabelli, V., Novara, M., Cesetti, T., Andrés-Mateos, E., ... & Carbone, E. (2004). Direct and remote modulation of I-channels in chromaffin cells. *Molecular neurobiology*, 29(1), 73-96.

Bankston, L. A., & Guidotti, G. (1996). Characterization of ATP Transport into Chromaffin Granule Ghosts SYNERGY OF ATP AND SEROTONIN ACCUMULATION IN CHROMAFFIN GRANULE GHOSTS. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17132-17138.

Barroso-González, J., Machado, J. D., García-Expósito, L., & Valenzuela-Fernández, A. (2009). Moesin regulates the trafficking of nascent clathrin-coated vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 284(4), 2419-2434.

Becherer, U., & Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell and tissue research*, 326(2), 393-407.

Bevington, A., Briggs, R. W., Radda, G. K., & Thulborn, K. R. (1984). Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of pig adrenal glands. *Neuroscience*, 11(1), 281-286.

Blaschko, H., & Welch, A. D. (1953). Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, 219(1-2), 17-22.

Blaschko, H., Born, G. V. R., D'iorio, A., & Eade, N. R. (1956). Observations on the distribution of catechol amines and adenosinetriphosphate in the bovine adrenal medulla. *The Journal of physiology*, 133(3), 548-557.

Bolstad, G., Helle, K. B., & Serck-Hanssen, G. (1980). Heterogeneity in the adrenomedullary storage of catecholamines, ATP, calcium and releasable dopamine β -hydroxylase activity. *Journal of the autonomic nervous system*, 2(4), 337-354.

Borges, R. (2013). The ATP or the natural history of neurotransmission. *Purinergic signalling*, 9(1), 5-6.

Borges, R., Sala, F., & Garcia, A. G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *Journal of neuroscience methods*, 16(4), 289-300.

Borges, R., Travis, E. R., Hochstetler, S. E., & Wightman, R. M. (1997). Effects of external osmotic pressure on vesicular secretion from bovine

adrenal medullary cells. *Journal of Biological Chemistry*, 272(13), 8325-8331.

Borisovska, M., Zhao, Y., Tsytsyura, Y., Glyvuk, N., Takamori, S., Matti, U., ... & Bruns, D. (2005). v-SNAREs control exocytosis of vesicles from priming to fusion. *The EMBO journal*, 24(12), 2114-2126.

Bornstein, S. R., Ehrhart-Bornstein, M., & Scherbaum, W. A. (1997). Morphological and functional studies of the paracrine interaction between cortex and medulla in the adrenal gland. *Microscopy research and technique*, 36(6), 520-533.

Bruns, D., & Jahn, R. (2002). Molecular determinants of exocytosis. *Pflügers Archiv*, 443(3), 333-338.

Bulenda, D., & Gratzl, M. (1985). Matrix-free calcium in isolated chromaffin vesicles. *Biochemistry*, 24(26), 7760-7765.

Burgess, T. L., & Kelly, R. B. (1987). Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual review of cell biology*, 3(1), 243-293.

Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (1995). Ca²⁺ and secretory-vesicle dynamics. *Trends in neurosciences*, 18(4), 191-196.

Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological reviews*, 83(2), 581-632.

Burgoyne, R. D., & Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. *Physiological reviews*, 83(2), 581-632.

Burnstock, G. (1972). Purinergic nerves. *Pharmacological reviews*, 24(3), 509-581.

Cabeza, R., & Collier, B. (1988). Acetylcholine Mobilization in a Sympathetic Ganglion in the Presence and Absence of 2-(4-Phenylpiperidino) Cyclohexanol (AH5183). *Journal of neurochemistry*, 50(1), 112-121.

Camacho, M., Machado, J. D., Montesinos, M. S., Criado, M., & Borges, R. (2006). Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 96(2), 324-334.

Carbone, E., Carabelli, V., Cesetti, T., Baldelli, P., Hernández-Guijo, J., & Giusta, L. (2001). G-protein-and cAMP-dependent L-channel gating modulation: a manyfold system to control calcium entry in neurosecretory cells. *Pflügers Archiv*, 442(6), 801-813.

Carmichael, S. W., & Winkler, H. (1985). The adrenal chromaffin cell. *Scientific American*, 253, 40-49.

Caughey, B., & Kirshner, N. (1987). Effects of reserpine and tetrabenazine on catecholamine and ATP storage in cultured bovine adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 49(2), 563-573.

Chen, Y. A., & Scheller, R. H. (2001). SNARE-mediated membrane fusion. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2(2), 98-106.

Chow, R. H., Klingauf, J., & Neher, E. (1994). Time course of Ca²⁺ concentration triggering exocytosis in neuroendocrine cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(26), 12765-12769.

Chow, R. H., von Rüden, L., & Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells.

Colliver, T. L., Pyott, S. J., Achalabun, M., & Ewing, A. G. (2000). VMAT-mediated changes in quantal size and vesicular volume. *The Journal of Neuroscience*, 20(14), 5276-5282.

Corcoran, J. J., Korner, M., Caughey, B., & Kirshner, N. (1986). Metabolic pools of ATP in cultured bovine adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of neurochemistry*, 47(3), 945-952.

Coupland, R. E., & Hopwood, D. (1966). The mechanism of the differential staining reaction for adrenaline-and noreadrenaline-storing granules in tissues fixed in glutaraldehyde. *Journal of anatomy*, 100(Pt 2), 227.

Crivellato, E., Nico, B., & Ribatti, D. (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle. *The Anatomical Record*, 291(12), 1587-1602.

Currie, K. P., & Fox, A. P. (1996). ATP serves as a negative feedback inhibitor of voltage-gated Ca²⁺ channel currents in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *Neuron*, 16(5), 1027-1036.

Dale, H. H., Feldberg, W., & Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *The Journal of physiology*, 86(4), 353-380.

Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Archives of biochemistry and biophysics*, 508(1), 1-12.

Del Castillo, J., & Katz, B. (1957). Interaction at end-plate receptors between different choline derivatives. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 146(924), 369-381.

Díaz-Vera, J., Camacho, M., Machado, J. D., Domínguez, N., Montesinos, M. S., Hernández-Fernaud, J. R., ... & Borges, R. (2012). Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation, but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. *The FASEB Journal*, 26(1), 430-438.

Díaz-Vera, J., Morales, Y. G., Hernández-Fernaud, J. R., Camacho, M., Montesinos, M. S., Calegari, F., ... & Machado, J. D. (2010). Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *The Journal of Neuroscience*, 30(3), 950-957.

Díaz-Flores, L., Gutiérrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Argüelles, H., & Borges, R. (2008). Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta physiologica*, 192(2), 145-163.

Dominguez, N., Estevez-Herrera, J., Borges, R., & Machado, J. D. (2014). The interaction between chromogranin A and catecholamines governs exocytosis. *The FASEB Journal*, 28(11), 4657-4667.

Domínguez, N., Rodríguez, M., Machado, J. D., & Borges, R. (2012). Preparation and culture of adrenal chromaffin cells. In *Neurotrophic Factors* (pp. 223-234). Humana Press.

Douglas, W. W. (1968). Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *British journal of pharmacology*, 34(3), 451-474.

Douglas, W. W., & Poisner, A. M. (1966). On the relation between ATP splitting and secretion in the adrenal chromaffin cell: extrusion of ATP (unhydrolysed) during release of catecholamines. *The Journal of physiology*, 183(1), 249-256.

Duncan, R. R., Greaves, J., Wiegand, U. K., Matskevich, I., Bodammer, G., Apps, D. K., ... & Chow, R. H. (2003). Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature*, 422(6928), 176-180.

Dunn, L. A., & Holz, R. W. (1983). Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 258(8), 4989-4993.

Edwards, R. H. (2007). The neurotransmitter cycle and quantal size. *Neuron*, 55(6), 835-858.

Eltzschig, H. K., Eckle, T., Mager, A., Küper, N., Karcher, C., Weissmüller, T., ... & Colgan, S. P. (2006). ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circulation research*, 99(10), 1100-1108.

Ensafi, A. A., Taei, M., & Khayamian, T. (2009). A differential pulse voltammetric method for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, and uric acid using poly (3-(5-chloro-2-hydroxyphenylazo)-4, 5-dihydroxynaphthalene-2, 7-disulfonic acid) film modified glassy carbon electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 633(1), 212-220.

Erickson, J. D., Schafer, M. K., Bonner, T. I., Eiden, L. E., & Weihe, E. (1996). Distinct pharmacological properties and distribution in neurons and endocrine cells of two isoforms of the human vesicular monoamine

transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(10), 5166-5171.

Fabbro, A., Skorinkin, A., Grandolfo, M., Nistri, A., & Giniatullin, R. (2004). Quantal release of ATP from clusters of PC12 cells. *The Journal of physiology*, 560(2), 505-517.

Feldberg, W., Minz, B., & Tsudzimura, H. (1934). The mechanism of the nervous discharge of adrenaline. *The Journal of physiology*, 81(3), 286-304.

Fernandez-Chacon, R., Königstorfer, A., Gerber, S. H., García, J., Matos, M. F., Stevens, C. F., ... & Südhof, T. C. (2001). Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature*, 410(6824), 41-49.

Gandia, L., Garcia, A. G., & Morad, M. (1993). ATP modulation of calcium channels in chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 470(1), 55-72.

García, A. G., García-De-Diego, A. M., Gandía, L., Borges, R., & García-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiological Reviews*, 86(4), 1093-1131.

Geffen, L. B., & Livett, B. G. (1971). Synaptic vesicles in sympathetic neurons. *Physiol. Rev*, 51(1), 98-157.

Geisler, J. C. (2013). *Physiological Role of Vesicular Nucleotide Transporter in Regulating Pancreatic Beta Cell Function*. University of Virginia.

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R. E., Li, C., Rosahl, T. W., Stevens, C. F., & Südhof, T. C. (1994). Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell*, 79(4), 717-727.

Gerber, S. H., & Südhof, T. C. (2002). Molecular determinants of regulated exocytosis. *Diabetes*, 51(suppl 1), S3-S11.

Gillis, K. D. (1995). Techniques for membrane capacitance measurements. In *Single-channel recording* (pp. 155-198). Springer US.

Giner, D., Neco, P., del Mar Francés, M., López, I., Viniegra, S., & Gutiérrez, L. M. (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton

during secretion from chromaffin cells. *Journal of cell science*, 118(13), 2871-2880.

Giner, D., Neco, P., del Mar Francés, M., López, I., Viniestra, S., & Gutiérrez, L. M. (2005). Real-time dynamics of the F-actin cytoskeleton during secretion from chromaffin cells. *Journal of cell science*, 118(13), 2871-2880.

Goldstein, M., Fuxe, K., Hökfelt, T., & Joh, T. H. (1971). Immunohistochemical studies on phenylethanolamine-N-methyltransferase, dopa-decarboxylase and dopamine- β -hydroxylase. *Experientia*, 27(8), 951-952.

Granot, J., & Rosenheck, K. (1978). On the role of ATP and divalent metal ions in the storage of catecholamines: 1H NMR studies of bovine adrenal chromaffin granules. *FEBS letters*, 95(1), 45-48.

Green, D. J., & Perlman, R. L. (1981). On-line measurement of catecholamine secretion. *Analytical biochemistry*, 110(2), 270-276.

Gualix, J., Abal, M., Pintor, J., Garcia-Carmona, F., & Miras-Portugal, M. T. (1996). Nucleotide vesicular transporter of bovine chromaffin granules evidence for a mnemonic regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 271(4), 1957-1965.

Gualix, J., Fideu, M. D., Pintor, J. E. S. U. S., Rotllán, P., Garcia-Carmona, F., & Miras-Portugal, M. T. (1997). Characterization of diadenosine polyphosphate transport into chromaffin granules from adrenal medulla. *The FASEB journal*, 11(12), 981-990.

Gualix, J., Pintor, J., & Miras-Portugal, M. T. (1999). Characterization of nucleotide transport into rat brain synaptic vesicles. *Journal of neurochemistry*, 73(3), 1098-1104.

Gupta, N., Bark, S. J., Lu, W. D., Taupenot, L., O'Connor, D. T., Pevzner, P., & Hook, V. (2010). Mass spectrometry-based neuropeptidomics of secretory vesicles from human adrenal medullary pheochromocytoma reveals novel peptide products of prohormone processing. *Journal of proteome research*, 9(10), 5065-5075.

Haanes, K., & Novak, I. (2010). ATP storage and uptake by isolated pancreatic zymogen granules. *Biochem. J*, 429, 303-311.

Han, X., Wang, C. T., Bai, J., Chapman, E. R., & Jackson, M. B. (2004). Transmembrane segments of syntaxin line the fusion pore of Ca²⁺-triggered exocytosis. *science*, 304(5668), 289-292.

Haynes, C. L., Siff, L. N., & Wightman, R. M. (2007). Temperature-dependent differences between readily releasable and reserve pool vesicles in chromaffin cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(6), 728-735.

Heinemann, C., von Rüden, L., Chow, R. H., & Neher, E. (1993). A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. *Pflügers Archiv*, 424(2), 105-112.

Helle, K. B., & Serck-Hanssen, G. (1969). Chromogranin: the soluble and membrane-bound lipoprotein of the chromaffin granule. *Pharmacological Research Communications*, 1(1), 25-29.

Helle, K. B., Reed, R. K., Pihl, K. E., & SERCK-HANSEN, G. (1985). Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules. *Acta physiologica scandinavica*, 123(1), 21-33.

Henry, J. P., Botton, D., Sagne, C., Isambert, M. F., Desnos, C., Blanchard, V., ... & Gasnier, B. (1994). Biochemistry and molecular biology of the vesicular monoamine transporter from chromaffin granules. *Journal of Experimental Biology*, 196(1), 251-262.

Herman, M. A., Ackermann, F., Trimbuch, T., & Rosenmund, C. (2014). Vesicular glutamate transporter expression level affects synaptic vesicle release probability at hippocampal synapses in culture. *The Journal of Neuroscience*, 34(35), 11781-11791.

Herrera, M., Kao, L. S., Curran, D. J., & Westhead, E. W. (1985). Flow-injection analysis of catecholamine secretion from bovine adrenal medulla cells on microbeads. *Analytical biochemistry*, 144(1), 218-227.

Heuser, J. E., & Reese, T. S. (1973). Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *The Journal of cell biology*, 57(2), 315-344.

Hillarp, N. Å. (1960). Different pools of catecholamines stored in the adrenal medulla. *Acta Physiologica Scandinavica*, 50(1), 8-22.

Hnasko, T. S., & Edwards, R. H. (2012). Neurotransmitter Co-release: mechanism and physiological role. *Annual Review of Physiology*, 74, 225.

Hnasko, T. S., Chuhma, N., Zhang, H., Goh, G. Y., Sulzer, D., Palmiter, R. D., ... & Edwards, R. H. (2010). Vesicular glutamate transport promotes dopamine storage and glutamate corelease in vivo. *Neuron*, 65(5), 643-656.

Hodel, A., Schäfer, T., Gerosa, D., & Burger, M. M. (1994). In chromaffin cells, the mammalian Sec1p homologue is a syntaxin 1A-binding protein associated with chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry*, 269(12), 8623-8626.

Holz, R. W., Bittner, M. A., Peppers, S. C., Senter, R. A., & Eberhard, D. A. (1989). MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 264(10), 5412-5419.

Hook, V., Bark, S., Gupta, N., Lortie, M., Lu, W. D., Bandeira, N., ... & Pevzner, P. (2010). Neuropeptidomic components generated by proteomic functions in secretory vesicles for cell-cell communication. *The AAPS journal*, 12(4), 635-645.

Huttner, W. B., & Natori, S. (1995). Regulated secretion: helper proteins for neuroendocrine secretion. *Current Biology*, 5(3), 242-245.

Huttner, W. B., Schiebler, W., Greengard, P., & De Camilli, P. (1983). Synapsin I (protein I), a nerve terminal-specific phosphoprotein. III. Its association with synaptic vesicles studied in a highly purified synaptic vesicle preparation. *The Journal of cell biology*, 96(5), 1374-1388.

Ikemoto, A., Bole, D. G., & Ueda, T. (2003). Glycolysis and Glutamate Accumulation into Synaptic Vesicles role of glyceraldehyde phosphate

dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 278(8), 5929-5940.

Iwatsuki, K., Ichikawa, R., Hiasa, M., Moriyama, Y., Torii, K., & Uneyama, H. (2009). Identification of the vesicular nucleotide transporter (VNUT) in taste cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 388(1), 1-5.

Jahn, R., & Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature*, 490(7419), 201-207.

Jahn, R., & Südhof, T. C. (1999). Membrane fusion and exocytosis. *Annual review of biochemistry*, 68(1), 863-911.

Jo, Y. H., & Role, L. W. (2002). Coordinate Release of ATP and GABA at In Vitro Synapses of Lateral Hypothalamic Neurons. *The Journal of neuroscience*, 22(12), 4794-4804.

Johnson, R. G., & Scarpa, A. (1976). Internal pH of isolated chromaffin vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 251(7), 2189-2191.

Johnson, R. G., Carty, S. E., & Scarpa, A. (1981). Proton: substrate stoichiometries during active transport of biogenic amines in chromaffin ghosts. *Journal of Biological Chemistry*, 256(11), 5773-5780.

Jung, J., Shin, Y. H., Konishi, H., Lee, S. J., & Kiyama, H. (2013). Possible ATP release through lysosomal exocytosis from primary sensory neurons. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(2), 488-493.

Kawagoe, K. T., Zimmerman, J. B., & Wightman, R. M. (1993). Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *Journal of neuroscience methods*, 48(3), 225-240.

Kibble, A. V., Barnard, R. J., & Burgoyne, R. D. (1996). Patch-clamp capacitance analysis of the effects of alpha-SNAP on exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Journal of cell science*, 109(9), 2417-2422.

Kopell, W. N., & Westhead, E. W. (1982). Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules. *Journal of Biological Chemistry*, 257(10), 5707-5710.

Kumakura, K., Ohara, M., & Satô, G. P. (1986). Real-Time Monitoring of the Secretory Function of Cultured Adrenal Chromaffin Cells. *Journal of neurochemistry*, 46(6), 1851-1858.

Kvetnansky, R., Sabban, E. L., & Palkovits, M. (2009). Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiological reviews*, 89(2), 535-606.

Lagercrantz, H., & Stajärne, L. (1974). Evidence that most noradrenaline is stored without ATP in sympathetic large dense core nerve vesicles.

Larsson, M., Sawada, K., Morland, C., Hiasa, M., Ormel, L., Moriyama, Y., & Gundersen, V. (2011). Functional and anatomical identification of a vesicular transporter mediating neuronal ATP release. *Cerebral Cortex*, bhr203.

Lazarowski, E. R. (2012). Vesicular and conductive mechanisms of nucleotide release. *Purinergic signalling*, 8(3), 359-373.

Lenartowski, R., & Goc, A. (2011). Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(8), 873-883.

Leszczyszyn, D. J., Jankowski, J. A., Viveros, O. H., Diliberto, E. J., Near, J. A., & Wightman, R. M. (1990). Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 265(25), 14736-14737.

Levine, M., Asher, A., Pollard, H., & Zinder, O. (1983). Ascorbic acid and catecholamine secretion from cultured chromaffin cells. *Journal of Biological Chemistry*, 258(21), 13111-13115.

Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., & Udenfriend, S. (1965). Elucidation of the rate-limiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused

guinea-pig heart. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 148(1), 1-8.

Lewis, R. V., Stern, A. S., Rossier, J., Stein, S., & Udenfriend, S. (1979). Putative enkephalin precursors in bovine adrenal medulla. *Biochemical and biophysical research communications*, 89(3), 822-829.

Li, L., Chin, L. S., Shupliakov, O., Brodin, L., Sihra, T. S., Hvalby, O., ... & Greengard, P. (1995). Impairment of synaptic vesicle clustering and of synaptic transmission, and increased seizure propensity, in synapsin I-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(20), 9235-9239.

Lindau, M., & de Toledo, G. A. (2003). The fusion pore. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1641(2), 167-173.

Livett, B. G. (1984). Adrenal medullary chromaffin cells in vitro. *Physiol. Rev.*, 64(4), 1103-1161.

Livett, B. G., Day, R., Elde, R. P., & Howe, P. R. C. (1982). Co-storage of enkephalins and adrenaline in the bovine adrenal medulla. *Neuroscience*, 7(5), 1323-1332.

Loewi, O. (1921). Über humorale übertragbarkeit der Herznervenwirkung. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 189(1), 239-242.

Luqmani, Y. A. (1981). Nucleotide uptake by isolated cholinergic synaptic vesicles: evidence for a carrier of adenosine 5'-triphosphate. *Neuroscience*, 6(6), 1011-1021.

Machado, D. J., Montesinos, M. S., & Borges, R. (2008). Good practices in single-cell amperometry. In *Exocytosis and Endocytosis* (pp. 297-313). Humana Press.

Machado, J. D., Morales, A., Gomez, J. F., & Borges, R. (2001). cAMP modulates exocytotic kinetics and increases quantal size in chromaffin cells. *Molecular Pharmacology*, 60(3), 514-520.

Machado, J. D., Segura, F., Brioso, M. A., & Borges, R. (2000). Nitric oxide modulates a late step of exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(27), 20274-20279.

Mahapatra, N. R., O'Connor, D. T., Vaingankar, S. M., Hikim, A. P. S., Mahata, M., Ray, S., ... & Mahata, S. K. (2005). Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *Journal of Clinical Investigation*, 115(7), 1942.

Maritzen, T., Keating, D. J., Neagoe, I., Zdebik, A. A., & Jentsch, T. J. (2008). Role of the vesicular chloride transporter CIC-3 in neuroendocrine tissue. *The Journal of neuroscience*, 28(42), 10587-10598.

Miyaji, T., Sawada, K., Omote, H., & Moriyama, Y. (2011). Divalent cation transport by vesicular nucleotide transporter. *Journal of Biological Chemistry*, 286(50), 42881-42887.

Momboisse, F., Olivares, M. J., Báez-Matus, X., Guerra, M. J., Flores-Muñoz, C., Sáez, J. C., ... & Cárdenas, A. M. (2014). Pannexin 1 channels: new actors in the regulation of catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 8.

Montesinos, M. S., Machado, J. D., Camacho, M., Diaz, J., Morales, Y. G., de la Rosa, D. A., ... & Borges, R. (2008). The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *The Journal of Neuroscience*, 28(13), 3350-3358.

Morel, N., & Meunier, F. M. (1981). Simultaneous release of acetylcholine and ATP from stimulated cholinergic synaptosomes. *Journal of neurochemistry*, 36(5), 1766-1773.

Moriyama, Y., & Nelson, N. (1987). The purified ATPase from chromaffin granule membranes is an anion-dependent proton pump. *Journal of Biological Chemistry*, 262(19), 9175-9180.

Moro, M. A., Garcia, A. G., & Langley, O. K. (1991). Characterization of two chromaffin cell populations isolated from bovine adrenal medulla. *Journal of neurochemistry*, 57(2), 363-369.

Moro, M. A., López, M. G., Gandía, L., Michelena, P., & Garcia, A. G. (1990). Separation and culture of living adrenaline-and noradrenaline-containing cells from bovine adrenal medullae. *Analytical biochemistry*, 185(2), 243-248.

Morris, S. J., Schultens, H. A., & Schober, R. (1977). An osmometer model for changes in the buoyant density of chromaffin granules. *Biophysical journal*, 20(1), 33.

Morris, S. J., & Schovanka, I. (1977). Some physical properties of adrenal medulla chromaffin granules isolated by a new continuous iso-osmotic density gradient method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 464(1), 53-64.

Mosharov, E. V., Gong, L. W., Khanna, B., Sulzer, D., & Lindau, M. (2003). Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *The Journal of neuroscience*, 23(13), 5835-5845.

Mundorf, M. L., Troyer, K. P., Hochstetler, S. E., Near, J. A., & Wightman, R. M. (2000). Vesicular Ca²⁺ participates in the catalysis of exocytosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9136-9142.

Nakanishi, A., Morita, K., & Oka, M. (1988). Influence of reduction of cytoplasmic ATP on catecholamine secretion from intact and digitonin-permeabilized adrenal chromaffin cells. *The Japanese Journal of Pharmacology*, 46(2), 109-115.

Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron*, 20(3), 389-399.

Neher, E., & Augustine, G. J. (1992). Calcium gradients and buffers in bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 450(1), 273-301.

Neher, E., & Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(21), 6712-6716.

Neher, E., & Zucker, R. S. (1993). Multiple calcium-dependent processes related to secretion in bovine chromaffin cells. *Neuron*, 10(1), 21-30.

Nelson, N. (1992). The vacuolar H⁺-ATPase--one of the most fundamental ion pumps in nature. *The Journal of experimental biology*, 172(1), 19-27.

Njus, D., & Radda, G. K. (1978). Bioenergetic processes in chromaffin granules a new perspective on some old problems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics*, 463(3), 219-244.

Nowinski, S. A., & Anjo, D. M. (1989). Determination of the diffusion coefficients of catecholamines by potential step chronoamperometry. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 34(3), 265-268.

O'Connor, D. T., & Frigon, R. P. (1984). Chromogranin A, the major catecholamine storage vesicle soluble protein. Multiple size forms, subcellular storage, and regional distribution in chromaffin and nervous tissue elucidated by radioimmunoassay. *Journal of Biological Chemistry*, 259(5), 3237-3247.

Omiatek, D. M., Bressler, A. J., Cans, A. S., Andrews, A. M., Heien, M. L., & Ewing, A. G. (2013). The real catecholamine content of secretory vesicles in the CNS revealed by electrochemical cytometry. *Scientific reports*, 3.

Oya, M., Kitaguchi, T., Yanagihara, Y., Numano, R., Kakeyama, M., Ikematsu, K., & Tsuboi, T. (2013). Vesicular nucleotide transporter is involved in ATP storage of secretory lysosomes in astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 438(1), 145-151.

Pankratov, Y., Lalo, U., Verkhatsky, A., & North, R. A. (2006). Vesicular release of ATP at central synapses. *Pflügers Archiv*, 452(5), 589-597.

Parsons, T. D., Coorsen, J. R., Horstmann, H., & Almers, W. (1995). Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron*, 15(5), 1085-1096.

Patel, J., Mooslehner, K. A., Chan, P. M., Emson, P. C., & Stamford, J. A. (2003). Presynaptic control of striatal dopamine neurotransmission in adult

vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) mutant mice. *Journal of neurochemistry*, 85(4), 898-910.

Pereira, D. B., & Sulzer, D. (2012). Mechanisms of dopamine quantal size regulation. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 17, 2740-2767.

Pevsner, J., & Scheller, R. H. (1994). Mechanisms of vesicle docking and fusion: insights from the nervous system. *Current opinion in cell biology*, 6(4), 555-560.

Phillips, J. H., Burridge, K., Wilson, S. P., & Kirshner, N. (1983). Visualization of the exocytosis/endocytosis secretory cycle in cultured adrenal chromaffin cells. *The Journal of cell biology*, 97(6), 1906-1917.

Pihel, K., Walker, Q. D., & Wightman, R. M. (1996). Overoxidized polypyrrole-coated carbon fiber microelectrodes for dopamine measurements with fast-scan cyclic voltammetry. *Analytical chemistry*, 68(13), 2084-2089.

Pletscher, A., Da Prada, M., Steffen, H., Lu, B., & Berneis, K. H. (1973). Mechanisms of catecholamine accumulation in adrenal chromaffin granules. *Brain research*, 62(2), 317-326.

Pothos, E. N., Davila, V., & Sulzer, D. (1998). Presynaptic recording of quanta from midbrain dopamine neurons and modulation of the quantal size. *The Journal of neuroscience*, 18(11), 4106-4118.

Pothos, E. N., Larsen, K. E., Krantz, D. E., Liu, Y. J., Haycock, J. W., Setlik, W., ... & Sulzer, D. (2000). Synaptic vesicle transporter expression regulates vesicle phenotype and quantal size. *The Journal of Neuroscience*, 20(19), 7297-7306.

Pothos, E. N., Mosharov, E., Liu, K. P., Setlik, W., Haburcak, M., Baldini, G., ... & Sulzer, D. (2002). Stimulation-dependent regulation of the pH, volume and quantal size of bovine and rodent secretory vesicles. *The Journal of physiology*, 542(2), 453-476.

Prado, V. F., Martins-Silva, C., de Castro, B. M., Lima, R. F., Barros, D. M., Amaral, E., ... & Prado, M. A. (2006). Mice deficient for the vesicular

acetylcholine transporter are myasthenic and have deficits in object and social recognition. *Neuron*, 51(5), 601-612.

Preobraschenski, J., Zander, J. F., Suzuki, T., Ahnert-Hilger, G., & Jahn, R. (2014). Vesicular glutamate transporters use flexible anion and cation binding sites for efficient accumulation of neurotransmitter. *Neuron*, 84(6), 1287-1301.

Pyle, J. L., Kavalali, E. T., Piedras-Rentería, E. S., & Tsien, R. W. (2000). Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron*, 28(1), 221-231.

Rahamimoff, R., & Fernandez, J. M. (1997). Pre- and postfusion regulation of transmitter release. *Neuron*, 18(1), 17-27.

Rettig, J., & Neher, E. (2002). Emerging roles of presynaptic proteins in Ca⁺⁺-triggered exocytosis. *Science*, 298(5594), 781-785.

Richardson, P. J., & Brown, S. J. (1987). ATP Release from Affinity-Purified Rat Cholinergic Nerve Terminals. *Journal of neurochemistry*, 48(2), 622-630.

Rizo, J., & Südhof, T. C. (2002). Snares and Munc18 in synaptic vesicle fusion. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(8), 641-653.

Rojas, E., Pollard, H. B., & Heldman, E. (1985). Real-time measurements of acetylcholine-induced release of ATP from bovine medullary chromaffin cells. *FEBS letters*, 185(2), 323-327.

Rosenmund, C., Rettig, J., & Brose, N. (2003). Molecular mechanisms of active zone function. *Current opinion in neurobiology*, 13(5), 509-519.

Roth, D., & Burgoyne, R. D. (1994). SNAP-25 is present in a SNARE complex in adrenal chromaffin cells. *FEBS letters*, 351(2), 207-210.

Sakamoto, S., Miyaji, T., Hiasa, M., Ichikawa, R., Uematsu, A., Iwatsuki, K., ... & Moriyama, Y. (2014). Impairment of vesicular ATP release affects glucose metabolism and increases insulin sensitivity. *Scientific reports*, 4.

Sathe, M. N., Woo, K., Kresge, C., Bugde, A., Luby-Phelps, K., Lewis, M. A., & Feranchak, A. P. (2011). Regulation of purinergic signaling in biliary epithelial cells by exocytosis of SLC17A9-dependent ATP-enriched vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 286(28), 25363-25376.

Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., ... & Moriyama, Y. (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(15), 5683-5686.

Sawynok, J., Downie, J. W., Reid, A. R., Cahill, C. M., & White, T. D. (1993). ATP release from dorsal spinal cord synaptosomes: characterization and neuronal origin. *Brain research*, 610(1), 32-38.

Schiavo, G., Matteoli, M., & Montecucco, C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiological reviews*, 80(2), 717-766.

Schneggenburger, R., Sakaba, T., & Neher, E. (2002). Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends in neurosciences*, 25(4), 206-212.

Schneggenburger, R., Sakaba, T., & Neher, E. (2002). Vesicle pools and short-term synaptic depression: lessons from a large synapse. *Trends in neurosciences*, 25(4), 206-212.

Schümann, H. J., & Philippu, A. (1962). Release of catechol amines from isolated medullary granules by sympathomimetic amines.

Segura, F., Brioso, M. A., Gomez, J. F., Machado, J. D., & Borges, R. (2000). Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *Journal of neuroscience methods*, 103(2), 151-156.

Sen, R., & Sharp, R. R. (1981). High-molecular-weight catecholamine--ATP aggregates are absent from the chromaffin-granule aqueous phase. *Biochemical Journal*, 195(1), 329.

Sesma, J. I., Kreda, S. M., Okada, S. F., van Heusden, C., Moussa, L., Jones, L. C., ... & Lazarowski, E. R. (2013). Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin

granules. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(10), C976-C984.

Sesma, J. I., Kreda, S. M., Okada, S. F., van Heusden, C., Moussa, L., Jones, L. C., ... & Lazarowski, E. R. (2013). Vesicular nucleotide transporter regulates the nucleotide content in airway epithelial mucin granules. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 304(10), C976-C984.

Sesti, C., Broekman, M. J., Drosopoulos, J. H., Islam, N., Marcus, A. J., & Levi, R. (2002). EctoNucleotidase in cardiac sympathetic nerve endings modulates ATP-mediated feedback of norepinephrine release. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 300(2), 605-611.

Seward, E. P., Chernevskaya, N. I., & Nowycky, M. C. (1995). Exocytosis in peptidergic nerve terminals exhibits two calcium-sensitive phases during pulsatile calcium entry. *The Journal of neuroscience*, 15(5), 3390-3399.

Smith, A. D., & Winkler, H. (1967). Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E., & Loh, Y. P. (2003). The role of chromogranin A and the control of secretory granule genesis and maturation. *cancer*, 952, 23-35.

Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., & Rothman, J. E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell*, 75(3), 409-418.

Somers, L. A., Maxson, M. M., & Ewing, A. G. (2005). Loaded dopamine is preferentially stored in the halo portion of PC12 cell dense core vesicles. *Journal of neurochemistry*, 93(5), 1122-1131.

Song, H. J., Ming, G. L., Fon, E., Bellocchio, E., Edwards, R. H., & Poo, M. M. (1997). Expression of a putative vesicular acetylcholine transporter facilitates quantal transmitter packaging. *Neuron*, 18(5), 815-826.

Sørensen, J. B. (2004). Formation, stabilisation and fusion of the readily releasable pool of secretory vesicles. *Pflügers Archiv*, 448(4), 347-362.

Sørensen, J. B., Nagy, G., Varoqueaux, F., Nehring, R. B., Brose, N., Wilson, M. C., & Neher, E. (2003). Differential control of the releasable

vesicle pools by SNAP-25 splice variants and SNAP-23. *Cell*, 114(1), 75-86.

Sørensen, J. B., Wiederhold, K., Müller, E. M., Milosevic, I., Nagy, G., de Groot, B. L., ... & Fasshauer, D. (2006). Sequential N-to C-terminal SNARE complex assembly drives priming and fusion of secretory vesicles. *The EMBO journal*, 25(5), 955-966.

Sreedharan, S., Shaik, J. H., Olszewski, P. K., Levine, A. S., Schiöth, H. B., & Fredriksson, R. (2010). Glutamate, aspartate and nucleotide transporters in the SLC17 family form four main phylogenetic clusters: evolution and tissue expression. *BMC genomics*, 11(1), 17.

Stjärne, L., & Lishajko, F. (1966). Comparison of spontaneous loss of catecholamines and ATP in vitro from isolated bovine adrenomedullary, vesicular gland, vas deferens and splenic nerve granules. *Journal of neurochemistry*, 13(11), 1213-1216.

Sudhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annual review of neuroscience*, 27, 509.

Südhof, T. C., & Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(12), a005637.

Sudhof, T. C., Lottspeich, F., Greengard, P., Mehl, E., & Jahn, R. (1987). A synaptic vesicle protein with a novel cytoplasmic domain and four transmembrane regions. *Science*, 238(4830), 1142-1144.

Sugita, S. (2008). Mechanisms of exocytosis. *Acta Physiologica*, 192(2), 185-193.

Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., & Brunger, A. T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, 395(6700), 347-353.

T O'Connor, D., Mahata, S. K., Mahata, M., Jiang, Q., Hook, V. Y., & Taupenot, L. (2007). Primary culture of bovine chromaffin cells. *Nature protocols*, 2(5), 1248-1253.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Grønborg, M., Riedel, D., ... & Jahn, R. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell*, 127(4), 831-846.

Terland, O., Flatmark, T., & Kryvi, H. (1979). Isolation and characterization of noradrenalin storage granules of bovine adrenal medulla. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 553(3), 460-468.

Tillinger, A., Sollas, A., Serova, L. I., Kvetnansky, R., & Sabban, E. L. (2010). Vesicular monoamine transporters (VMATs) in adrenal chromaffin cells: stress-triggered induction of VMAT2 and expression in epinephrine synthesizing cells. *Cellular and molecular neurobiology*, 30(8), 1459-1465.

Tokunaga, A., Tsukimoto, M., Harada, H., Moriyama, Y., & Kojima, S. (2010). Involvement of SLC17A9-dependent vesicular exocytosis in the mechanism of ATP release during T cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(23), 17406-17416.

Tomé, Â. R., Castro, E., Santos, R. M., & Rosário, L. M. (2007). Functional distribution of Ca²⁺-coupled P2 purinergic receptors among adrenergic and noradrenergic bovine adrenal chromaffin cells. *BMC neuroscience*, 8(1), 39.

Tomé, Â. R., Castro, E., Santos, R. M., & Rosário, L. M. (2007). Functional distribution of Ca²⁺-coupled P2 purinergic receptors among adrenergic and noradrenergic bovine adrenal chromaffin cells. *BMC neuroscience*, 8(1), 39.

Trifaró, J. M., & Lee, R. W. H. (1980). Morphological characteristics and stimulus-secretion coupling in bovine adrenal chromaffin cell cultures. *Neuroscience*, 5(9), 1533-1546.

Trifaró, J. M., Gasman, S., & Gutierrez, L. M. (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiologica*, 192(2), 165-172.

Trifaró, J. M., Glavinovic, M., & Rose, S. D. (1997). Secretory vesicle pools and rate and kinetics of single vesicle exocytosis in neurosecretory cells. *Neurochemical research*, 22(7), 831-841.

Tsuboi, T., Kitaguchi, T., Karasawa, S., Fukuda, M., & Miyawaki, A. (2010). Age-dependent preferential dense-core vesicle exocytosis in

neuroendocrine cells revealed by newly developed monomeric fluorescent timer protein. *Molecular biology of the cell*, 21(1), 87-94.

Van Weering, J. R., Toonen, R. F., & Verhage, M. (2007). The role of Rab3a in secretory vesicle docking requires association/dissociation of guanidine phosphates and Munc18-1. *PLoS One*, 2(7), e616-e616.

Venton, B. J., Troyer, K. P., & Wightman, R. M. (2002). Response times of carbon fiber microelectrodes to dynamic changes in catecholamine concentration. *Analytical chemistry*, 74(3), 539-546.

Videen, J. S., Mezger, M. S., Chang, Y. M., & O'Connor, D. T. (1992). Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation. *Journal of Biological Chemistry*, 267(5), 3066-3073.

Villarroya, M., Olivares, R., Ruíz, A., Cano-Abad, M. F., Pascual, R., Lomax, R. B., ... & García, A. G. (1999). Voltage inactivation of Ca²⁺ entry and secretion associated with N- and P/Q-type but not L-type Ca²⁺ channels of bovine chromaffin cells. *The Journal of physiology*, 516(2), 421-432.

Vitale, M. L., Seward, E. P., & Trifaro, 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(2), 353-363.

Viveros, O. H., Diliberto Jr, E. J., Hazum, E., & Chang, K. J. (1979). Enkephalins as possible adrenomedullary hormones: storage, secretion, and regulation of synthesis. *Advances in biochemical psychopharmacology*, 22, 191-204.

Voets, T., Neher, E., & Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*, 23(3), 607-615.

Voets, T., Toonen, R. F., Brian, E. C., de Wit, H., Moser, T., Rettig, J., ... & Verhage, M. (2001). Munc18-1 promotes large dense-core vesicle docking. *Neuron*, 31(4), 581-592.

Von Euler, U. S., & Lishajko, F. (1963). Effect of reserpine on the uptake of catecholamines in isolated nerve storage granules. *International Journal of Neuropharmacology*, 2(3), 127-134.

von Kügelgen, I., & Starke, K. (1991). Noradrenaline-ATP co-transmission in the sympathetic nervous system. *Trends in pharmacological sciences*, 12, 319-324.

Weber, A., & Winkler, H. (1981). Specificity and mechanism of nucleotide uptake by adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 6(11), 2269-2276.

Weber, A., Westhead, E. W., & Winkler, H. (1983). Specificity and properties of the nucleotide carrier in chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *Biochem. J*, 210, 789-794.

Weder, H. G., & Wiegand, U. W. (1973). The interaction of biogenic amines with adenosine-5'-triphosphate: A calorimetric study. *FEBS letters*, 38(1), 64-66.

Wegrzyn, J., Bark, S., & Hook, V. (2007, August). Neuroproteomics of chromaffin secretory vesicles reveals protein systems utilized for peptide neurotransmitter production and secretion. In *molecular & cellular proteomics* (vol. 6, no. 8, pp. 57-57). 9650 rockville pike, bethesda, md 20814-3996 usa: Amer Soc Biochemistry Molecular Biology Inc.

Wegrzyn, J., Bark, S., & Hook, V. (2007, August). Neuroproteomics of chromaffin secretory vesicles reveals protein systems utilized for peptide neurotransmitter production and secretion. In *molecular & cellular proteomics* (vol. 6, no. 8, pp. 57-57). 9650 rockville pike, bethesda, md 20814-3996 usa: Amer Soc Biochemistry Molecular Biology Inc.

Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., ... & Viveros, O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(23), 10754-10758.

Winkler, H. (1993). The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *Journal of anatomy*, 183(Pt 2), 237.

Winkler, H., & Westhead, E. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience*, 5(11), 1803-1823.

Wojcik, S. M., Katsurabayashi, S., Guillemin, I., Friauf, E., Rosenmund, C., Brose, N., & Rhee, J. S. (2006). A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron*, 50(4), 575-587.

Xu, T., Binz, T., Niemann, H., & Neher, E. (1998). Multiple kinetic components of exocytosis distinguished by neurotoxin sensitivity. *Nature neuroscience*, 1(3), 192-200.

Yoo, S. H. (1996). pH- and Ca²⁺-dependent aggregation property of secretory vesicle matrix proteins and the potential role of chromogranins A and B in secretory vesicle biogenesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(3), 1558-1565.

Yoo, S. H., & Albanesi, J. P. (1991). High capacity, low affinity Ca²⁺ binding of chromogranin A. Relationship between the pH-induced conformational change and Ca²⁺ binding property. *Journal of biological chemistry*, 266(12), 7740-7745.

Zala, D., Hinckelmann, M. V., Yu, H., da Cunha, M. M. L., Liot, G., Cordelières, F. P., ... & Saudou, F. (2013). Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell*, 152(3), 479-491.