

Curso 2012/13
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS/40
I.S.B.N.: 978-84-15939-12-2

NATALIA DOMÍNGUEZ REYES

**Estudio del papel funcional
de las cromograninas A y B en el almacenamiento
de catecolaminas y en la exocitosis**

Directores

RICARDO BORGES JURADO
JOSÉ DAVID MACHADO PONCE



SOPORTES AUDIOVISUALES E INFORMÁTICOS
Serie Tesis Doctorales

A mi padre
A mi hermano
A mi marido

Agradecimientos:

Gracias al Dr. Ricardo Borges y al Dr José David Machado, mis directores de tesis, por acogerme en el laboratorio, por permitirme desarrollar este trabajo, por sentar las bases de mi carrera científica, por ayudarme a crecer en el plano personal y en el científico, por apoyarme, por animarme y por el trato respetuoso y cariñoso que me han brindado.

Gracias al Dr. Agustín Valenzuela, al Dr. Diego Álvarez y al Dr. Federico Díaz, por las discusiones científicas en los pasillos, por los consejos en las técnicas de biología molecular y celular, por el apoyo y el ánimo que me han demostrado. Gracias al Dr. Fera por las sonrisas y la música.

Gracias al personal del animalario, del servicio de genómica y del servicio de microscopía electrónica de la Universidad de La Laguna por su ayuda en el mantenimiento de los ratones, por la secuenciación y por la obtención de las imágenes de microscopía electrónica de las glándulas adrenales de ratón respectivamente. En especial gracias a M^a Rosa, Jorge, Ángel, Ana, Elena. Gracias Leandro por la cuantificación de las imágenes de microscopía electrónica.

Gracias al Dr. Joan Guinovart por permitirme hacer la estancia de un mes en Barcelona, a Delia Zafra por enseñarme a obtener adenovirus para la expresión de cromograninas en cultivos primarios de ratón y a todos los miembros de dicho laboratorio por acogerme con tanto afecto. Gracias al Dr. Christian Rosenmund por darme la oportunidad de hacer la estancia de tres meses en su laboratorio en Berlín, al Dr. Marcial Camacho por enseñarme a cultivar neuronas de hipocampo, patch-clamp e inmunocitoquímica, por abrirme camino en la maravillosa ciudad de Berlin y gracias a los compañeros del laboratorio de Charité por acogerme como una más.

Gracias a mis compañeros del laboratorio. A los que estuvieron: Jesi, Mónyka y Bea, por todo lo que me enseñaron, por las risas y el buen ambiente creado; Yezer y Jose por los programas de adquisición y análisis que me han facilitado mucho el trabajo, por la ayuda y la amistad brindada. A los que están: Dani, por estar pendiente en los primeros días en el laboratorio, enseñándome a hacer electrodos y haciéndome descubrir el

fascinante mundo de la electrofisiología, cuando funciona claro..., por las sobremesas variopintas y las excursiones que no lo son menos; Marta, por compartir tantos experimentos (que no voy a numerar porque darían para demasiadas páginas) y buenos ratos, por transmitir paz en los momentos difíciles; Judith, compañera de carrera y trabajo pero sobre todo amiga, por estar cerca siempre, por llenar el laboratorio de optimismo y alegría, por estar siempre disponible a ayudar; Josito, por soportarme en los días de invasión en el IUBO, por el respeto y apoyo; Josué, por la ayuda en los últimos meses con los quehaceres diarios del laboratorio y por las palabras de ánimo. Gracias también a Thomas, Miriam y Carmen.

Gracias a los compañeros del laboratorio nº 3 que estuvieron: Jony y Laura por ayudarme siempre que lo necesité, por los montajes fotográficos, por las fiestas del departamento y por las risas en el contuberniábulo; Ada, por las palabras de aliento y por enseñarme perseverancia, Serena, por la simpatía, alegría y dulzura que transmites por donde vas. Gracias a las compañeras del laboratorio nº 3 que están: Laura, Soledad, Chus, Maite y Estefanía por estar dispuestas a ayudar en lo posible, por la confianza y complicidad. Gracias Alberto e Iván por las divertidas historias en las sobremesas.

Gracias a mis amigos del colegio y a mis chicas de la facultad por estar siempre ahí dándome ánimos.

Gracias a mi gran familia, grande en número y grande de corazón, gracias por todo lo que me han aportado.

Gracias a mi hermano Jorge, por hacerme pasar tan buenos ratos de pequeña al volver a casa por Navidad y verano, por cuidarme siempre, por ayudarme siempre, por animarme siempre, por enseñarme humildad, por no hablarme demasiado de ciencia (tal vez gracias a eso he terminado aquí). Gracias a mi cuñada Pilar, por el cariño y el apoyo regalado desde el primer momento. Gracias a mis sobrinas Alicia y Marta por ser las estrellas que han metido luz y alegría en mi vida.

Gracias a mi padre por darme todo por mí, por cuidarme, por apoyarme y animarme en todos mis proyectos, por ayudarme en todo lo posible, por enseñarme a ser perseverante, a luchar por lo que se quiere, a dar sin esperar algo a cambio, por ser padre y madre.

Gracias a Fran, el amor de mi vida, mi marido. Gracias por estar cerca siempre en los buenos y en los malos momentos, por enseñarme a ver siempre el lado bueno de las cosas, por transmitirme optimismo y alegría, por enseñarme a tener sueños, por apoyarme y animarme siempre. Gracias por tu amor incondicional.

Gracias a ti lector que te aventuras a leer esta tesis por tu acogida. Gracias a todos los que han estado a mi lado en estos años, siento si me dejo a alguien en el tintero. ¡Gracias!

**“Locura es hacer la misma cosa una y otra vez esperando
obtener diferentes resultados”**

Albert Einstein

Este trabajo ha sido financiado a través de los proyectos BFU2007-64963, BFU2010-15822/FPI del Ministerio de Economía y Competitividad y C2008/01000239 de la Agencia Canaria de Investigación, Innovación y Sociedad de la Información (RB).

La autora de este trabajo, Natalia Domínguez Reyes, ha disfrutado de una beca de investigación AP2008-03035 del programa FPU del Ministerio de Educación.

Publicaciones:

1. **Dominguez N.**; Estevez-Herrera J.; Pardo MR.; Pereda D.; Machado JD.; Borges R. (2012) *The Functional Role of Chromogranins in Exocytosis*. J Mol Neuroscience, 48(2):317-22.
2. Borges R.; **Dominguez N.**; Estevez-Herrera J.; Pereda D.; Machado JD. (2012) *Vesicular Ca(2+) mediates granule motion and exocytosis*. Cell Calcium, 51(3-4):338-4.
3. Diaz-Vera J.; Camacho M.; Machado JD.; **Dominguez N.**; Montesinos MS.; Hernandez-Fernaund JR.; Lujan R.; Borges R. (2012) Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation, but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. FASEB Journal. 26(1):430-8.
4. Machado JD.; Diaz-Vera J.; **Dominguez N.**; Alvarez CM.; Pardo MR.; Borges R. (2010). *Chromogranins A and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis*. Cellular and Molecular Neurobiology. 30(8):1181-7.
5. Borges R.; Diaz-Vera J.; **Dominguez N.**; Arnau MR.; Machado JD. (2010) *Chromogranins as regulators of exocytosis*. Journal of Neurochemistry. 114(2):335-43.

Capítulos de libro:

Dominguez N.; Rodriguez M.; Machado JD.; Borges R. *Preparation and culture of adrenal chromaffin cells*. (2012) Methods Mol Biol. 846:223-34.

Índice

Índice

RESUMEN / ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	5
1. La exocitosis.	7
2. El estudio de la exocitosis.	8
3. La célula cromafín.....	12
4. Las células PC12 como modelo neurosecretor.....	14
5. Metabolismo de las catecolaminas.....	16
5.1. Síntesis de las catecolaminas.	16
5.2. Almacenamiento de las catecolaminas.....	17
5.3. Degradación de las catecolaminas.	18
6. El gránulo cromafín.....	20
6.1. Características de los gránulos cromafines.	20
6.2. Granulogénesis.....	22
6.3. Maduración de los gránulos cromafines.	24
7. Las etapas de la exocitosis.....	24
8. La maquinaria exocitótica.	26
8.1. Complejo proteico SNARE.	26
8.2. Sec-1/Munc18.....	27
8.3. Munc13, RIM y Rab.	28
8.4. Sinaptotagminas y complexinas.	28
8.5. NSF y α -SNAP.	29
8.6. Ca^{2+}	29
8.6.1. Canales de Ca^{2+} voltaje dependientes.....	29
9. Endocitosis y reciclado de vesículas	31
10. Regulación de la exocitosis	32
11. La matriz intragranular.	33
11.1. Características generales de la matriz.	33
11.2. Las cromograninas y secretograninas.....	34
11.3. La cromogranina A.	37

11.4.	La cromogranina B.	39
11.5.	La secretogranina II ó cromogranina C.	41
11.6.	Las otras graninas.	42
11.7.	La matriz vesicular y la exocitosis.	43
OBJETIVOS		47
MATERIAL Y MÉTODOS		51
12.	Mantenimiento en cultivo de las líneas celulares HEK293 y PC12	53
13.	Obtención del vector de expresión de CgA-EGFP.....	54
13.1.	Diseño de oligonucleótidos de DNA para clonaje y secuenciación.	54
13.2.	Obtención del cDNA codificante para la CgA.	55
13.3.	Clonaje de CgA en el vector pEGFPN3.....	55
13.4.	Obtención de bacterias DH5 α competentes y transformación	56
13.5.	Extracción del plásmido pCgA-EGFP.....	56
14.	Transfección de líneas celulares	57
15.	Western Blot.....	58
15.1.	Obtención de la muestra.	58
15.2.	Separación de proteínas por SDS-PAGE.....	58
15.3.	Transferencia a membrana, visualización y análisis.....	59
16.	Ensayos de secreción	60
17.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección electroquímica de catecolaminas.	61
17.1.	Obtención de las muestras	61
17.2.	Equipo cromatográfico (HPLC en fase reversa)	62
17.3.	Detección electroquímica	63
17.4.	Análisis de los datos cromatográficos	63
18.	Amperometría.....	64
18.1.	Introducción.....	64
18.2.	Detección amperométrica de la exocitosis.	64
18.3.	Elaboración de los electrodos de carbono y de pipetas para la administración de sustancias.	65
18.3.1.	Fabricación.	65
18.3.2.	Calibración.....	66
18.3.3.	Fabricación de pipetas para la administración de sustancias.	68
18.4.	Equipo electrofisiológico y procedimiento de registro de señales amperométricas	68
18.5.	Análisis de los datos amperométricos.	69
18.5.1.	Parámetros cinéticos de las espigas.....	70
18.5.2.	Criterios de selección de espigas.	71

18.5.3.	Análisis estadístico de las señales amperométricas.....	72
19.	TIRFM o microscopía de onda evanescente.....	72
19.1.	Introducción.....	72
19.2.	Conceptos teóricos del T.I.R.F.	73
19.3.	Equipo TIRFM y adquisición de imágenes	75
19.4.	Procesamiento y análisis de imágenes	75
RESULTADOS		77
20.	La expresión de CgA-EGFP en células HEK293 presenta un patrón vesicular.....	79
21.	La entrada de Ca²⁺ extracelular aumenta la secreción de CgA-EGFP en células HEK293.....	80
22.	La microscopía de onda evanescente permite la visualización de vesículas de CgA-EGFP con alta resolución en z y alta velocidad de adquisición	81
23.	La CgA-EGFP es liberada por exocitosis en las células HEK293.....	86
24.	Tamaño y movimiento de las vesículas de CgA-EGFP en células HEK293.....	87
25.	Las células HEK293 que expresan CgA-EGFP acumulan más L-DOPA o serotonina que las células control	89
26.	La cinética de acumulación de L-DOPA en células HEK293 que expresan CgA-EGFP es más rápida que en las células control.....	90
27.	Análisis del ruido eléctrico en el equipo electrofisiológico de amperometría	91
28.	Las células HEK293 que expresan CgA-EGFP incubadas con L-DOPA la liberan de manera cuántica	94
29.	Caracterización de diferentes líneas de células PC12.....	95
30.	La expresión de CgA-EGFP en células PC12 tiene un patrón de expresión vesicular.....	97
31.	La CgA-EGFP es liberada por exocitosis dependiente de estímulo en las células PC12	98

32. El sustrato al que se adhieren las células modifica la cinética de la liberación de la CgA-EGFP	100
33. Tamaño y movimiento de las vesículas de CgA-EGFP en células PC12 ..	100
34. La CgA-EGFP promueve una mayor acumulación de DA en células PC12.....	102
35. La cantidad de catecolaminas liberadas por cada vesícula secretora es mayor en las células PC12 que expresan CgA-EGFP	103
36. Las vesículas de células PC12 que expresan CgA-EGFP tienen una capacidad de acumular catecolaminas mayor que las células control.....	105
37. La distribución de las vesículas secretoras en función de su carga se desplaza hacia valores mayores en las células que expresan CgA-EGFP. ...	105
38. La relación entre los parámetros I_{max} y Q está modificada en las células que expresan CgA-EGFP cuando han sido incubadas con LDOPA. .	108
DISCUSIÓN	111
39. ¿Son los gránulos inducidos por CgA-EGFP similares a los gránulos cromafines?	113
40. La cinética de la exocitosis de proteínas y péptidos	114
41. ¿Puede afectar la matriz extracelular a la exocitosis de péptidos?	117
42. ¿Es posible detectar liberación cuántica de catecolaminas en células carentes de la vía de secreción regulada?.....	118
43. El papel de la matriz intravesicular en la acumulación de CA	119
44. La modulación de la exocitosis por la matriz intravesicular	121
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	125
BIBLIOGRAFÍA	129

Abreviaturas:

3-MT	3-metoxitiramina
A	Adrenalina
AD	Aldehído deshidrogenasa
AR	Aldehído reductasa
BSA	Bovine serum albumin. Albúmina de suero bovino.
CA	Catecolaminas
CgA	Cromogranina A
CgB	Cromogranina B
COMT	Catecol-O-metil-transferasa
DA	Dopamina
DHBA:	3,4-dihidroxibencilamina
DHMA	Ácido 3,4-dihidroximandelico
DHPG	Dihidroxifenilglicol
DOPAC	Ácido dihidroxifenilacético
DβH	Dopamina-β-hidroxilasa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGFP	Proteína fluorescente verde mejorada
FBS	Suero fetal bovino
Fig	Figura
HEK293	Human embrionic kidney 293
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxyetil)-1-piperazinetanosulfónico
HPLC	Cromatografía de alta eficacia
HS	Suero de caballo
HVA	Ácido homovanílico
HVA	Alto umbral de activación

LAAD	L-aminoácido-aromático-descarboxilasa
LDCV	Large Dense Core Vesicles. Vesículas de núcleo denso
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LVA	Bajo umbral de activación
MAO	Monoamino oxidasa
MHPG	3-metoxi-4-hidroxifenilglicol
NA	Noradrenalina
NGF	Nerve growth factor
OD	Densidades ópticas
PACAP	Péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria
PC1	Prohormona convertasa 1
PC12	Pheocromocytoma 12
PC2	Prohormona convertasa 2
PCA	Ácido perclórico
PKA	Proteína quinasa A
PKC	Proteína quinasa C
PNMT	Feniletanolamina-N-metil-transferasa
RER	Retículo endoplasmático rugoso
RRP	Grupo de vesículas listo para ser liberado
RVP	Grupo de vesículas de reserva
SDS	Dodecilsulfato sódico
SgII	Secretogranina II
SgIII	Secretogranina III o 1B1075
SgIV	Secretogranina IV o HISL-19
SgV	Secretogranina V o 7B2
SgVI	Secretogranina VI o NESP55
SgVII	Secretogranina VII o VGF

SgVIII	Secretogranina VII o pro-SAAS
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Protein Receptor
SRP	Slow releasable pool. Grupo de liberación lenta
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGN	Red trans-Golgi
TH	Tirosina Hidroxilasa
TIRFM	Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy. Microscopía de onda evanescente
UVP	Grupo de vesículas inmaduras
VAMP	Vesicle-associated membrane protein
VIP	Polipéptido intestinal vasoactivo
VMA	Ácido vanilmandélico
VMAT	Transportador vesicular de monoaminas
ω -Aga-IVA	w-agatoxina-IVA
ω -CTx-GVIA	ω -conotoxina GVIA
ω -CTx-MVIIC	ω -conotoxina MVIIC
ω -CTx-MVIID	ω -conotoxina MVIID

Resumen / Abstract

Resumen:

Las cromograninas/secretograninas son proteínas altamente ácidas localizadas fundamentalmente en vesículas de núcleo denso (LDCV) de células neuroendocrinas y neuronas donde se co-almacenan con neurotransmisores, hormonas y péptidos. En las células cromafines las más abundantes son la cromogranina A (CgA), la cromogranina B (CgB) y la secretogranina II (SgII). Son diversas las funciones atribuidas a estas proteínas: la biogénesis de LDCV (Huh et al., 2003; Kim et al., 2001), la clasificación y empaquetado de neuropéptidos (Courel et al., 2008; Montero-Hadjadje et al., 2009), el almacenamiento de transmisores como las catecolaminas (CAs) (Helle et al., 1985; Machado et al., 2010) y las acciones biológicas de sus péptidos derivados (Bartolomucci et al., 2011; Taupenot et al., 2003). En células cromafines de ratones carentes de cromograninas, hemos demostrado que la ausencia de CgA y CgB causa una importante disminución de la acumulación de CAs y modifican la cinética de la exocitosis (Diaz-Vera et al., 2012; Diaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008). Por lo tanto las cromograninas están directamente implicadas en la acumulación de monoaminas y en la cinética de la exocitosis.

Hemos estudiado la cinética de exocitosis de la proteína quimérica CgA-EGFP y su participación en la exocitosis de CAs en células HEK293 y células PC12. Utilizando la técnica de TIRFM hemos cuantificado la respuesta excitotóxica de la CgA-EGFP en ambas líneas celulares. Por medio del uso del HPLC hemos demostrado que las células HEK293 que expresan CgA-EGFP son capaces de almacenar 2,5 veces más de L-DOPA que las células control. Hemos sido capaces de detectar liberación cuántica en células HEK293 que expresan el constructo e incubadas con L-DOPA por medio de la amperometría. Los registros amperométricos en células PC12 mostraron que la cinética de la exocitosis estaba modificada en las células que expresan CgA-EGFP.

En conclusión la CgA-EGFP tiene la capacidad de generar vesículas que liberan su contenido por exocitosis. Estas vesículas tienen la capacidad de almacenar y liberar CAs por exocitosis. Además la CgA-EGFP modifica la cinética de la exocitosis de CAs.

Abstract:

Chromogranins/secretogranins are highly acidic secretory proteins mainly found in large dense-core secretory vesicles (LDCV) of neuroendocrine cells and neurons, co-stored with neurotransmitters, hormones and peptides. In chromaffin cells the most abundant are chromogranin A (CgA), chromogranin B (CgB) and secretogranin II. Their functions points to four main directions: LDCV biogenesis (Huh et al., 2003; Kim et al., 2001) prohormone sorting and packaging of neuropeptides (Courel et al., 2008; Montero-Hadjadje et al., 2009); storage of transmitters such as catecholamines (CAs) (Helle et al., 1985; Machado et al., 2010) and the biological activities of their derivative peptides (Bartolomucci et al., 2011; Taupenot et al., 2003). In chromaffin cells from Cgs-KO mice, we reported that the absence of CgA and CgB causes important decline in the CAs accumulation and modifies the kinetics of exocytosis (Diaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008). Therefore Cgs are a highly efficient system directly implicated in monoamine cargo and in the kinetics of exocytosis.

We have studied the CgA-EGFP exocytotic kinetics and its participation in the storage and exocytosis of CAs in HEK293 and PC12 cells. Using TIRFM, we quantified the exocytotic response of CgA-EGFP in both cell lines. With the HPLC technique we showed that HEK293 cells expressing CgA-EGFP are able to storage 2.5 times more L-DOPA than control. Also we have demonstrated that PC12 cells expressing CgA-EGFP are able to accumulate more dopamine than the controls. We were able to detect quantal release using amperometry in HEK293 cells expressing the construct and incubated with L-DOPA. Amperometric recordings in PC12 cells showed an alteration in the kinetics of CAs release by single exocytotic events in those cells expressing CgA-EGFP.

We conclude that CgA-EGFP has the capability to generate granule-like vesicles, which are able to undergo exocytosis thus releasing CgA-EGFP. These vesicles have the capability to storage and release CAs by exocytosis. And CgA-EGFP is able to modify the kinetics of exocytosis of CAs.

Introducción

1. La exocitosis.

La exocitosis consiste en la liberación de moléculas contenidas en vesículas secretoras hacia el espacio extracelular. Este proceso es esencial para la vida y permite la comunicación intercelular. La exocitosis ocurre de manera constitutiva en todas las células y permite renovar los componentes de la membrana plasmática y secretar moléculas extracelulares como proteínas del plasma, anticuerpos o componentes de la matriz extracelular. Además, en muchos tipos celulares, se da otra vía de exocitosis que está regulada por calcio y ocurre ante un determinado estímulo. 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 exocitosis regulada ha sido muy estudiada en las sinapsis donde los neurotransmisores son rápidamente liberados por las vesículas sinápticas. Existe un amplio abanico de células no neuronales con gránulos secretores de matriz densa que utilizan la vía regulada como células neuroendocrinas (ej. células cromafines), endocrinas (ej. células β -pancreáticas) y exocrinas (ej. células acinares pancreáticas).

Hasta finales de siglo XIX, muchos fisiólogos consideraban que existían conexiones físicas entre los nervios a través de las cuales se producía la transmisión del impulso nervioso. Sin embargo, estudios realizados entre otros por Ramón y Cajal convencieron a muchos histólogos de que estas conexiones celulares, a las cuales hoy denominamos sinapsis, estaban muy cercanas, pero no había continuidad celular.

Los trabajos de Langley y de Elliot, entre otros, a principios del siglo XX, proporcionaron datos que apuntaban hacia la naturaleza química de la transmisión nerviosa. Esta fue convincentemente demostrada por Otto Loewi en 1921. Él estimuló eléctricamente el nervio vago aislado de un corazón de rana que estaba conectado a otro corazón al cual le transfería el líquido que bombeaba. Observó que disminuían la fuerza y la frecuencia de sus contracciones en el primer corazón y después en el otro cuando el líquido emanado del primer corazón llegaba a él. Demostró así que el nervio vago liberaba una sustancia química “*el vagusstoff*” que enlentecía los latidos del corazón.

En los años 30 Henry Dale descubrió que la acetilcolina actúa como molécula mensajera en la unión neuromuscular, es decir, entre el nervio motor y la fibra muscular (Dale et al., 1936). Estos estudios dieron pie a que, en los años 50, Bernard Katz y sus colaboradores propusieran que la liberación de este neurotransmisor debía darse de manera discreta o en forma de “cuantitas” en la placa motora (Del Castillo and Katz, 1954; Fatt and Katz, 1952). Estos hechos se vieron apoyados por las evidencias bioquímicas que proponían el almacenamiento de catecolaminas (CA) en orgánulos subcelulares (Blaschko et al., 1955). El uso de la microscopía electrónica permitió tener una evidencia más convincente de la liberación del contenido de los gránulos secretores por la fusión de la membrana granular con la membrana plasmática (Coupland, 1965a). Esta propuesta fue apoyada por la aportación de los bioquímicos que detectaron por medio de anticuerpos proteínas intragranulares en el perfundido de glándulas adrenales bovinas tras su estimulación (Banks and Helle, 1965).

En 1961, William W. Douglas definió el concepto de acoplamiento estímulo-secreción como base de la secreción de neurotransmisores y hormonas, y además propuso que el Ca^{2+} es el ión esencial que media dicho acoplamiento (Douglas and Rubin, 1961b).

2. El estudio de la exocitosis.

Diversas aproximaciones experimentales han permitido estudiar la liberación de catecolaminas a partir de órgano aislado o en poblaciones celulares. Así se desarrollaron métodos de medición de tipo biológico (Douglas and Rubin, 1961a), fluorimétricos (Anton and Sayre, 1962) y de detección electroquímica (Borges et al., 1986; Green and Perlman, 1981). Aún aportando un conocimiento valioso acerca del proceso de la exocitosis, todas estas aproximaciones fueron de tipo indirecto.

La aparición de técnicas que permitieron permeabilizar la membrana plasmática utilizando descargas eléctricas (electroporación), hicieron posible modificar la composición del interior celular (Baker and Knight, 1978) y así dilucidar qué factores son cruciales en la exocitosis. Se demostró el papel indispensable del Ca^{2+} y se propuso la intervención de los nucleótidos de adenina en el proceso (Baker and Knight, 1979). También se realizaron otras aproximaciones para lograr la

permeabilización de las células con incubaciones con digitonina (Dunn and Holz, 1983), α -toxina (Bader et al., 1986) o saponina (Brooks and Carmichael, 1987). El uso de las células permeabilizadas permitió ampliar mucho los conocimientos de la fisiología de la neurosecreción como comprender el papel de distintas proteínas quinasas: C, A y G (Burgoyne and Handel, 1994; Knight and Baker, 1983).

El diseño de sondas fluorescentes sensibles al Ca^{2+} permitió realizar el seguimiento de los cambios en la concentración intracelular de dicho catión tras la estimulación de las células (Tsien et al., 1982) lo cual aportó una mayor información sobre la homeostasis del Ca^{2+} crucial para la función celular y para la exocitosis.

Un avance crucial en el estudio de la exocitosis y la neurotransmisión fue la aparición de las técnicas de *patch-clamp* ya que permitieron la medida de la conductancia al paso de iones a través de la membrana plasmática (canales iónicos) o los incrementos de capacidad de la membrana plasmática tras las fusiones de las vesículas secretoras (Hamill et al., 1981; Neher and Marty, 1982). Las diferentes configuraciones de *patch-clamp* permiten medir con alta resolución la conductancia de un único canal, la conductancia de la membrana plasmática completa o la cantidad de vesículas que se fusionan tras un determinado estímulo. Estas medidas se pueden realizar ya que la membrana plasmática actúa como un condensador en el que cada incorporación de una vesícula que se fusiona se traduce en un incremento del área (capacidad) de dicho condensador. Además, estas técnicas permiten una modificación mucho más controlada del medio intracelular.

A principios de los años 90 aparece la amperometría en célula única, lo que implicó un nuevo impulso en el estudio de la exocitosis. Esta técnica tiene una gran resolución temporal y consiste en la detección electroquímica, por medio de un electrodo de fibra de carbono, del contenido secretado por las vesículas. Permite medir directamente las CA (u otros transmisores oxidables) liberadas por las células (Neher and Marty, 1982). Así se pueden estudiar la cinética de la liberación del contenido de los gránulos secretores y, en consecuencia, los últimos pasos de la exocitosis.

Una técnica similar, la voltametría cíclica, permitió una mejor caracterización de las moléculas secretadas ya que es capaz de diferenciar químicamente neurotransmisores que posean diferencias en sus propiedades redox (Neher and Marty, 1982). En esta técnica se aplican ciclos de rampas de voltaje al electrodo (sobre la célula o de manera intracelular) en las que en el voltaje positivo de la rampa las moléculas son oxidadas y en la parte negativa son reducidas lo cual permite medir la concentración de las moléculas que han llegado al electrodo y distinguir diferentes moléculas de interés (Baur et al., 1988).

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. Dichas proteínas incluyen el complejo SNARE, las sinaptotagminas, las complexinas, la Munc18 y la Munc13. Además se estableció 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 aparición de la técnica de *patch-amperometry* o amperometría en parche (Albillos et al., 1997) permitió el estudio de los diferentes tipos de fusión (fusión completa o transitoria), así como el estudio del poro de fusión y su regulación (Fang et al., 2008; Tabares et al., 2003). Esta técnica electrofisiológica combina la medida de capacidad en parche de membrana y la amperometría, para lo cual se introduce un electrodo de carbono dentro de una pipeta de *patch-clamp*. Así, se realizan simultáneamente medidas de capacidad, que permiten estudiar la conductancia del poro de fusión y el tamaño de las vesículas, y medidas amperométricas, que miden el contenido liberado y la cinética de la liberación.

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) y de vesículas sinápticas (fig. 1) (Takamori et al., 2006). Uno de estos avances recientes es el descubrimiento del transportador vesicular de nucleótidos (Sawada et al., 2008).

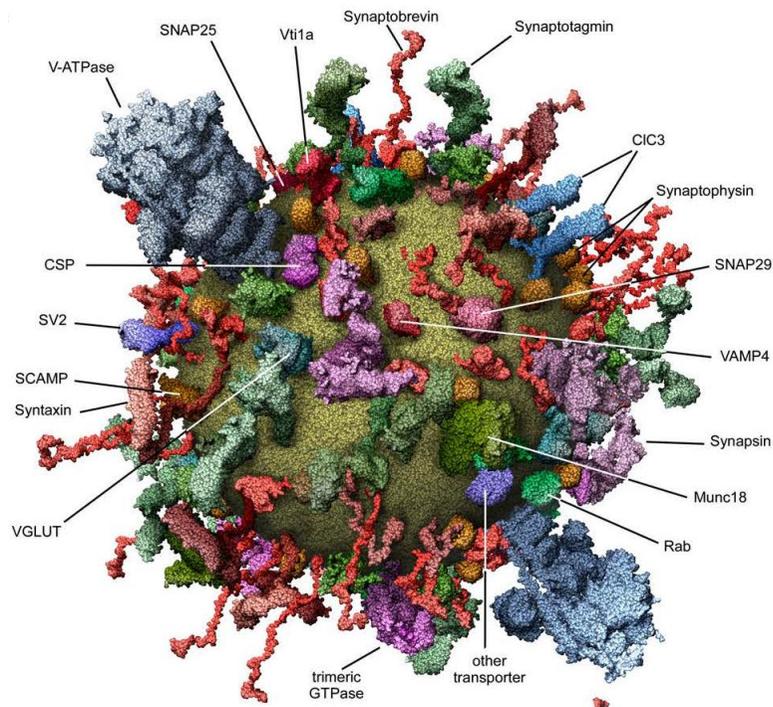


Figura 1: Modelo molecular de una vesícula sináptica media. (Tomado de Takamori et al. 2006).

A pesar de todos los avances alcanzados en los últimos años, hay muchos aspectos del proceso de la exocitosis que permanecen en discusión como: la participación de las diferentes proteínas del complejo SNARE y otras proteínas relacionadas (Jahn and Fasshauer, 2012), la implicación de la composición lipídica de la membrana (Darios et al., 2009), la existencia de zonas “calientes” de exocitosis (Schroeder et al., 1994), la procedencia del Ca^{2+} que da lugar al movimiento y exocitosis de las vesículas (Camacho et al., 2008; Garcia et al., 2006) y la participación de la matriz intravesicular en la liberación de neurotransmisores (Diaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008; Reigada et al., 2003; Tabares et al., 2003).

3. La célula cromafín.

Las glándulas adrenales (o suprarrenales) son glándulas endocrinas que se sitúan anatómicamente sobre los riñones y están irrigadas por la arteria suprarrenal. Constan de dos zonas histológica y funcionalmente diferentes: la médula (zona más interna) y la corteza adrenal (zona más externa y que envuelve a la médula) (fig. 2). La médula adrenal está formada predominantemente por células cromafines que se organizan en acinos en torno a los capilares. El término cromafín fue acuñado por el histólogo checo Alfred Kohn y deriva de su especial afinidad por las sales de cromo.

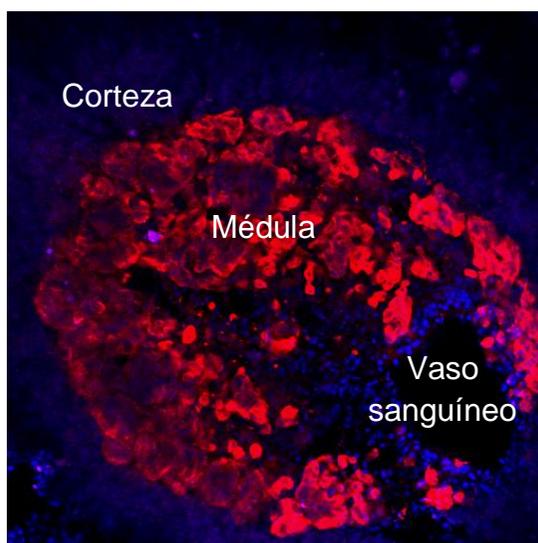


Figura 2: Inmunofluorescencia de rebanada de glándula adrenal de ratón. En rojo células tirosina hidroxilasa positivas y en azul marcaje de núcleos con DAPI. (Imagen cedida por Marta R. Pardo)

Las células cromafines son células neuroendocrinas excitables que sintetizan y liberan al torrente sanguíneo adrenalina y noradrenalina. En cuanto a su histogénesis, estas células derivan, al igual que las neuronas simpáticas, de la cresta neural. Se han descrito los diferentes factores proteicos implicados en la migración y diferenciación de dichas células. Sin embargo, en los últimos años se ha propuesto que aunque tanto las neuronas simpáticas como las células cromafines deriven de la cresta neural, las células progenitoras de cada tipo celular son diferentes con lo

que estrictamente no sería del todo correcto hablar de un linaje “simpato-adrenal” (Huber, 2006).

Se han descrito tres tipos de células cromafines: las adrenérgicas, las noradrenérgicas y las células cromafines de gránulos pequeños (fig. 3). Estas últimas suponen entre 1,8 - 4 % del total de las células cromafines y poseen gránulos cromafines secretores de núcleo denso y pequeñas vesículas sinápticas (Díaz-Flores et al., 2008). Los dos tipos celulares más abundantes (adrenérgicas y noradrenérgicas) se diferencian en abundancia y en localización en la glándula adrenal. Las cromafines noradrenérgicas se sitúan en el centro de la médula y las adrenérgicas lo hacen preferentemente en las áreas periféricas de la médula cercanas al córtex adrenal (Coupland, 1965a). Aunque cada célula cromafín suele tener un tipo de gránulo, también se ha descrito que en la misma célula puede haber dos poblaciones de vesículas (Grabner et al., 2005).

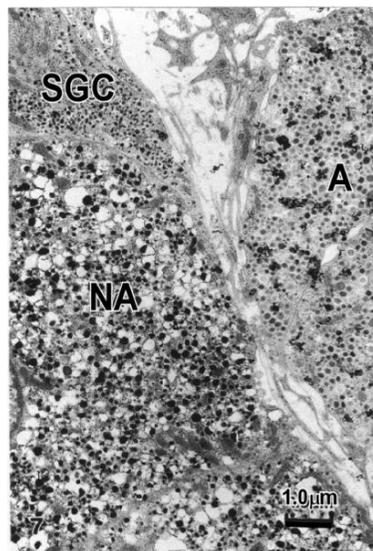


Figura 3. Imagen de microscopía electrónica de transmisión con los tres tipos de células cromafines. (Tomado de Kobayashi 1993). NA indica una célula noradrenérgica, A una célula adrenérgica y SGC una célula cromafín de gránulos pequeños.

Estas células reciben inervación de fibras preganglionares simpáticas, la mayor parte de ellas procedentes del nervio esplácnico mayor, en menor proporción de los esplácnicos menores y fibras procedentes de los

ganglios celíacos lumbares. La mayoría de las fibras son amielínicas aunque también se pueden observar células de Schwann (Coupland, 1965b). Los nervios espláncnicos son colinérgicos (Yoshizaki, 1974), aunque algunos secretan también encefalina (Kobayashi et al., 1985) y neuropéptidos como la sustancia P (Zhou et al., 1991); la somatostatina y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y el péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) (Kuri et al., 2009).

La posibilidad de aislar, mantener y manipular las células cromafines en cultivo ha hecho que se les considere un modelo excelente para el estudio del acoplamiento excitación-secreción, permitiendo el estudio de los mecanismos involucrados en la exocitosis como: el movimiento de vesículas hacia zonas especializadas de la membrana plasmática; las corrientes de Ca^{2+} que disparan la exocitosis regulada; la caracterización estructural y funcional de las proteínas implicadas en el anclaje vesicular y la regulación de la liberación de neurotransmisores.

Las células cromafines liberan CA en respuesta a un estrés agudo en lo que comúnmente se conoce como la respuesta de “lucha o huida” (concepto descrito por primera vez por Walter Cannon), la liberación de CA al torrente sanguíneo desencadena una serie de respuestas en el organismo para afrontar dicho estrés como: aumento del ritmo cardíaco y respiratorio, dilatación de vasos sanguíneos, dilatación de las pupilas, liberación de fuentes de energía metabólica, etc. (Kvetnansky et al., 2009). Por tanto, la función de las células cromafines es la síntesis, el almacenamiento y la liberación por medio de exocitosis a la sangre de adrenalina (A), noradrenalina (NA) y, en menor proporción dopamina (DA). También liberan otras sustancias como péptidos opioides, ATP, cromograninas y sus derivados peptídicos.

4. Las células PC12 como modelo neurosecretor.

En 1976, Greene y Tischler establecieron una línea celular denominada PC12 a partir de un feocromocitoma trasplantable de rata (Greene and Tischler, 1976). Estas células son capaces de sintetizar, almacenar y liberar por exocitosis CA (fundamentalmente DA).

El modelo de la célula cromafín ha sido y es ampliamente utilizado en el estudio de la exocitosis. Sin embargo, la aparición de la línea celular PC12 ha permitido abordajes tanto farmacológicos como de biología molecular de una manera más accesible, más sencilla y sin el uso de animales de laboratorio (Westerink and Ewing, 2008).

Por medio de la amperometría se han podido estudiar los últimos pasos de la exocitosis en estas células PC12 (Somers et al., 2007; Trouillon and Ewing, 2013; van Kempen et al., 2011). Estas células poseen receptores muscarínicos y nicotínicos cuya activación desencadena la exocitosis. También la aplicación de estímulos despolarizantes como altas concentraciones de K^+ (70 – 105 mM) y el Ba^{2+} inducen la liberación de catecolaminas en estas células, de una manera similar a lo que ocurre en las células cromafines. (Westerink and Ewing, 2008).

Se han utilizado diversas aproximaciones farmacológicas con esta línea celular. Los tratamientos con dexametasona durante 5-7 días incrementan la cantidad de catecolaminas liberadas por evento de exocitosis así como la excitabilidad de las células y el acoplamiento entre los canales de calcio y los lugares de exocitosis (Elhamdani et al., 2000; Xu et al., 2005). Por otro lado, la cantidad de catecolaminas liberadas puede incrementarse también mediante incubaciones de las células PC12 con L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) que es el precursor de la síntesis de dopamina (ver apartado 5.1), esta estrategia incrementa también el número de exocitosis detectadas por Amperometría (Somers et al., 2005; Westerink and Ewing, 2008).

La posibilidad de la manipulación genética de las células PC12 ha favorecido el estudio de proteínas y factores implicados en la exocitosis, como las proteínas SNAREs (Knowles et al., 2010; Wu et al., 2012), el represor de la transcripción REST (D'Alessandro and Meldolesi, 2013) o incluso el papel de las graninas en la biogénesis de gránulos (Huh et al., 2003; Kim et al., 2001).

Por todos estos motivos, en esta tesis se ha utilizado esta línea celular PC12 ya que posee una mayor accesibilidad para manipular la expresión de proteínas, para administrar tratamientos farmacológicos y por la capacidad de liberación de catecolaminas que conservan estas células.

5. Metabolismo de las catecolaminas.

5.1. Síntesis de las catecolaminas.

Las CA tienen función como hormonas y 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 las vesículas 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.

Las CA son sintetizadas a partir del aminoácido precursor L-tirosina (fig. 4). 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 una 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 del 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 (feedback negativo), 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 prácticamente por todos los procesos reguladores: a nivel transcripcional, post-traducciona l y epigenético (Lenartowski and Goc, 2011).

El paso siguiente es catalizado por la DOPA descarboxilasa o L-aminoácidoaromático 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.

La DA es introducida en el interior de las vesículas por medio de los transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs). En el interior del gránulo ocurre el tercer paso de la síntesis, mediado por la dopamina- β -

hidroxilasa ($D\beta H$), 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 adrenalina 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 almacenaje y posterior liberación (Kvetnansky et al., 2009).

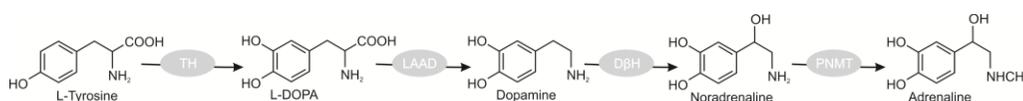


Figura 4: Ruta biosintética de las catecolaminas. TH, tirosina hidroxilasa, LAAD, L-aromático aminoácido descarboxilasa; $D\beta H$, dopamina- β -hidroxilasa; PNMT, feniletanolamina-N-metil-transferasa.

No siempre coexisten 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 $D\beta H$ y PNMT serán células dopaminérgicas.

5.2. Almacenamiento de las catecolaminas.

Las CA pueden alcanzar concentraciones intragranulares de 0,6 a 1 M dependiendo de la especie (Albillos et al., 1997; Jankowski et al., 1993; Montesinos et al., 2008). El interior granular mantiene un pH 5,5 - 5,7, por lo que el 99% de las CA presentes se encuentran en su forma protonada (Winkler and Westhead, 1980).

Para introducir tal cantidad de CA dentro de las vesículas es necesaria la presencia de los transportadores vesiculares de monoaminas (VMATs). Existen dos isoformas: VMAT1 que es la isoforma neuroendocrina y VMAT2 que es la isoforma neuronal. Las células cromafines expresan ambas isoformas siendo VMAT1 más abundante en roedores y VMAT2 más abundante en humanos. Todas las catecolaminas (AD, NA y DA) son susceptibles de ser transportadas por ambos

transportadores aunque son mejores sustratos de VMAT2 que de VMAT1. El gradiente de protones establecido por la bomba de protones vesicular dependiente de ATP (V-ATPasa) genera la energía para el transporte de monoaminas por los VMATs, los cuales actúan como antiportadores de protones y CA. Los VMATs son sensibles a ambos componentes de la fuerza protón-motriz, el gradiente de pH y el potencial transmembrana creado, y son altamente eficientes. El gradiente que se alcanza es de 5 órdenes de magnitud con respecto al citoplasma. Los VMATs son inhibidos farmacológicamente por la reserpina, la tetrabenazina, y la ketanserina (Wimalasena, 2011).

5.3. Degradación de las catecolaminas.

El 98% de las CA intracelulares se encuentran en el interior de los gránulos (Chien et al., 1990), esto las protege de los mecanismos degradativos que mantienen la homeostasis de CA en el citoplasma. Las catecolaminas son catabolizadas por 3-O-metilación por la catecol-O-metil transferasa (COMT) o por desaminación oxidativa por la monoamino oxidasa (MAO) (fig. 5). Ambas enzimas están presentes en diversos tejidos entre ellos la médula adrenal y las neuronas catecolaminérgicas.

La MAO desamina las catecolaminas formando aldehídos que luego son metabolizados a ácidos carboxílicos por la aldehído deshidrogenasa (AD) o a alcoholes por la aldehído reductasa (AR). Existen dos subtipos de MAO, la MAO-A tiene gran afinidad por la A y NA y está altamente localizada en cerebro, la MAO-B es la responsable de la degradación de la DA. La COMT es fundamentalmente extraneuronal y se expresa abundantemente en las células cromafines.

La DA puede ser catabolizada por la MAO y la AD produciendo ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) que posteriormente puede ser transformado en ácido homovanílico (HVA) por la COMT. Además, la DA también puede ser catabolizada directamente por la COMT formando 3-metoxitiramina (3-MT) que posteriormente puede ser transformada por la MAO y la AD en HVA.

La NA y la A pueden ser catabolizadas por la MAO y la AR dando dihidroxifenilglicol (DHPG) que luego puede ser metabolizado por la COMT

en 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y que finalmente puede ser metabolizado a ácido vanilmandélico (VMA) por la AD. También la NA y la A pueden ser catabolizadas por la MAO y la AD dando ácido 3,4-dihidroximandélico (DHMA) que la COMT convertirá en VMA.

Por otro lado, la COMT puede catabolizar la NA y la A en normetanefrina y metanefrina respectivamente. La normetanefrina y la metanefrina serán transformadas en VMA por acción de la MAO y la AD (Kvetnansky et al., 2009).

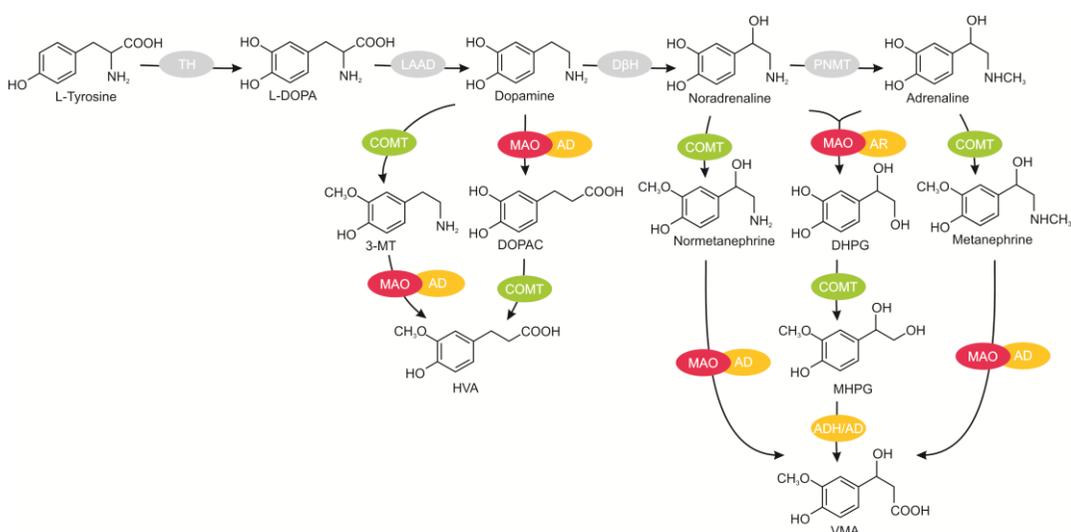


Figura 5: Metabolismo de las catecolaminas. TH, tirosina hidroxilasa; LAAD, L-aromático-aminoácido-descarboxilasa; DβH, dopamina-β-hidroxilasa; PNMT, feniletanolamina-N-metil-transferasa; COMT: catecol-O-metil-transferasa; MAO: monoaminooxidasa; AD: aldehído deshidrogenasa; AR: aldehído reductasa; 3-MT: 3-metoxitiramina; DOPAC: ácido dihidroxifenilacético; HVA: ácido homovanílico; DHPG: dihidroxifenilglicol; MHPG: 3-meoxi-4-hidroxifenilglicol; VMA: ácido vanilmandélico; DHMA: ácido 3,4-dihidroximandélico. (Cedido por Marta R. Pardo)

Aunque clásicamente se había considerado el hígado como el principal órgano responsable del catabolismo de las catecolaminas y de la mayoría de los metabolitos derivados circulantes en el plasma, actualmente se conoce que el 90% de la metanefrina y entre el 23% y el 40% de la normetanefrina circulante son producidas por la degradación que tiene lugar en la glándula adrenal (Eisenhofer et al., 1998). La concentración citosólica de catecoles totales ha sido medida por medio de

electroquímica intracelular y se ha calculado que se encuentra entre 50 y 500 μM , de los cuales el 10% son CA (Mosharov et al., 2003).

6. El gránulo cromafín.

6.1. Características de los gránulos cromafines.

Los gránulos o vesículas cromafines son orgánulos secretores especializados, se denominan también vesículas de núcleo denso grande (LDCV) debido a la matriz muy electrodensa que se observa en microscopía electrónica. Cada célula cromafín contiene entre 10.000 - 20.000 gránulos, esto supone del 13 al 30% del volumen del citoplasma aproximadamente (Crivellato et al., 2008).

La microscopía electrónica ha mostrado que hay diversidad de tamaño, forma y densidad en los gránulos cromafines (fig. 6) (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). Los gránulos adrenérgicos varían entre un diámetro de 50 y 350 nm según la especie (en ratón está entre 170 -350 nm) presentan morfología circular, electrodensidad moderada con un contenido interior granulado, el halo suele ser reducido y uniforme. Por otro lado, los gránulos noradrenérgicos tienen un diámetro mayor entre 185 y 495 nm (en ratón), poseen morfología irregular, forma ovalada o elíptica, un núcleo denso excéntrico y un halo amplio (Diaz-Flores et al., 2008).

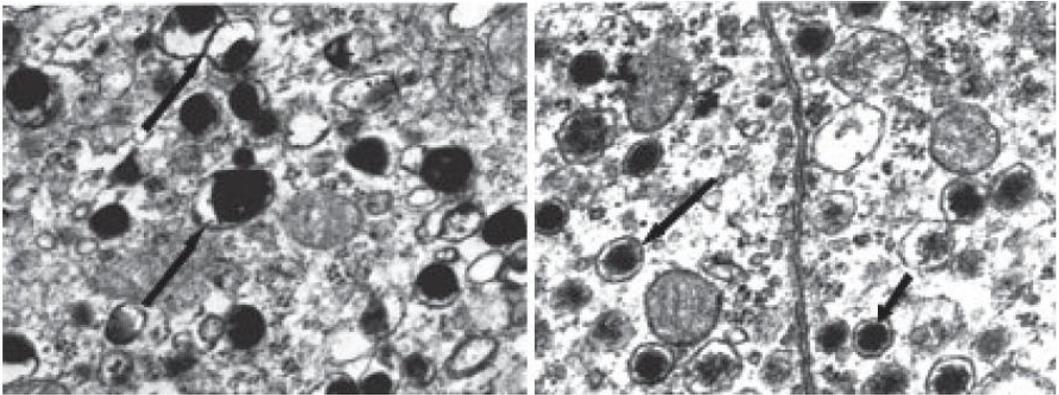


Figura 6: Micrografías electrónicas de gránulos noradrenérgicos y adrenérgicos. A, las flechas indican gránulos típicamente noradrenérgicos con el núcleo muy electrodenso y excéntrico y el halo amplio. B, las flechas indican gránulos típicos adrenérgicos, de menor tamaño, matriz menos electrodensa y halo reducido. (Tomado de Díaz-Flores 2008)

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

Las membranas de los gránulos cromafines son ricas en colesterol y lisofosfatidilcolina, en menor cantidad contienen esfingomiélin y glicoesfingolípidos (Thiele and Huttner, 1998). Se ha propuesto que el colesterol y la lisofosfatidilcolina pueden agruparse en determinadas zonas de las membranas granulares formando estructuras denominadas *lipid raft* o balsas de lípidos. Parece ser que los *raft* proporcionan el ambiente adecuado para que se concentren proteínas implicadas en el proceso de la exocitosis. Asimismo, se ha sugerido la participación activa de estos dos lípidos en la fusión de membrana ya que sus características físico-químicas favorecen el proceso (Salaün et al., 2004).

6.2. Granulogénesis.

El inicio de la biogénesis de los gránulos ocurre con la síntesis de los precursores peptídicos así como de las endoproteasas que posteriormente procesaran proteolíticamente dichos péptidos. Se inicia en el retículo endoplasmático rugoso (RER) y 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).

Se han propuesto dos mecanismos para el proceso de granulogénesis y clasificado o *sorting* de los gránulos. Las dos hipótesis que se barajan actualmente se denominan *sorting for entry* y *sorting by retention* (Arvan and Castle, 1998; Bartolomucci et al., 2011) que no tienen por qué ser excluyentes entre sí (fig. 7). El modelo de *sorting for entry* se basa en que la TGN actúa como controlador de la clasificación de los gránulos en base a la existencia de receptores capaces de unirse a proteínas de secreción regulada. Se ha propuesto que la carboxipeptidasa E y/o la secretogranina III podrían actuar como receptores (Koshimizu et al., 2010). En el modelo de *sorting by retention* la clasificación de los gránulos no se realiza en la TGN sino en el gránulo inmaduro, con lo que cualquier proteína entraría en dicho gránulo y posteriormente ocurrirá la “retención” de proteínas de secreción regulada en el gránulo y la “eliminación” de proteínas de la vía constitutiva o lisosomales. Las proteínas que permanecen en el gránulo que irá por la vía regulada generalmente forman un agregado proteico o matriz debido al ambiente ácido y la presencia de Ca^{2+} . Mientras que las proteínas que no irán por la vía regulada de secreción son eliminadas por medio de la escisión de pequeñas vesículas por su baja capacidad de retención y/o por la mediación de un receptor (se ha descrito el receptor de manosa-6-fosfato que une enzimas lisosomales en la célula β -pancreática y las redirige a los lisosomas) (Dikeakos and Reudelhuber, 2007).

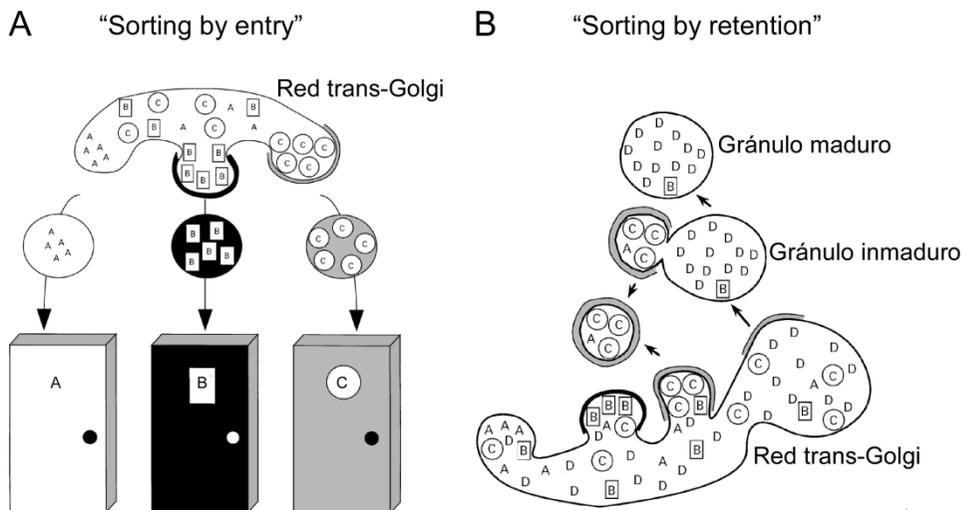


Figura 7: Esquema de los dos modelos para el proceso de granulogénesis y clasificación de gránulos. A, modelo de "sorting for entry": las proteínas son clasificadas y empaquetadas en cada tipo de gránulo en un mecanismo mediado por receptor. B, modelo de "sorting by retention": el contenido definitivo 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).

Diversos trabajos han propuesto que una o varias proteínas de la matriz intragranular pueden ser las promotoras de la granulogénesis. La cromogranina A (CgA) (Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005; Stettler et al., 2009), la cromogranina B (CgB) (Chanat et al., 1993; Huh et al., 2003), la secretogranina II (SgII) (Beuret et al., 2004; Courel et al., 2008) o la secretogranina (SgIII) (Prasad et al., 2008) han mostrado capacidad de formar gránulos. Además se han relacionado varios dominios de estas proteínas con la granulogénesis. En la zona N-terminal de la CgA y la CgB, común a ambas proteínas, existe un lazo formado por un puente disulfuro que podría actuar como determinante proteico responsable de la formación de gránulos (Courel et al., 2006; Chanat et al., 1993; Kromer et al., 1998; Stettler et al., 2009). Sin embargo otros trabajos atribuyen que las estructuras inducidas por la CgA podrían ser lisosomas y no vesículas secretoras (Malosio et al., 2004). Asimismo, hay otros trabajos que proponen que la expresión y consiguiente agregación de estas proteínas en el aparato de Golgi puede ser suficiente para su entrada pasiva en estructuras granulares (Beuret et al., 2004; Chanat and Huttner, 1991). Por lo tanto, el papel en la granulogénesis de las cromograninas se encuentra

aún en discusión (Dikeakos and Reudelhuber, 2007; Koshimizu et al., 2010).

6.3. Maduración de los gránulos cromafines.

La formación de los gránulos cromafines inmaduros ocurre en la TGN. Posteriormente comienza su proceso de maduración en el que se produce la acumulación de catecolaminas y nucleótidos, el procesamiento proteolítico de las proteínas intravesiculares y la acidificación.

Del total de vesículas en una célula solo el 1-2% es capaz de liberarse rápidamente en milisegundos (aprox. 10 ms) ante un estímulo, esto es lo que se conoce como el *Readily Releasable Pool* (RRP). Mientras que el resto de vesículas forman parte del grupo de reserva que serán reclutadas por el RRP cuando sea necesario. En muchas células los gránulos existen en una variedad de estados intermedios entre estos dos grupos (Burgoyne and Morgan, 2003).

Diferentes trabajos apoyan la existencia de diferentes grupos (*pools*) de vesículas secretoras. El primer grupo, el RRP citado anteriormente es liberado en pocos milisegundos ante el aumento de Ca^{2+} intracelular (Neher, 1998; Trifaro et al., 1997). El segundo grupo se denomina grupo de liberación lenta (*Slow Releasable Pool*, SRP) (Stevens et al., 2011; Voets et al., 1999), comprende las vesículas que tienen que pasar por una etapa rápida de maduración antes de ser liberadas. Se ha descrito también un pool 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).

7. Las etapas de la exocitosis.

Como hemos descrito anteriormente, las células cromafines se encuentran inervadas por fibras preganglionares simpáticas. La acetilcolina, liberada por éstas, activa el receptor nicotínico permitiendo la despolarización de la membrana plasmática. Esta despolarización promueve la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje por los que entra Ca^{2+} desde el espacio extracelular. El incremento en la

concentración de Ca^{2+} en la región subplasmalema es la señal que inicia la exocitosis de las vesículas cromafines.

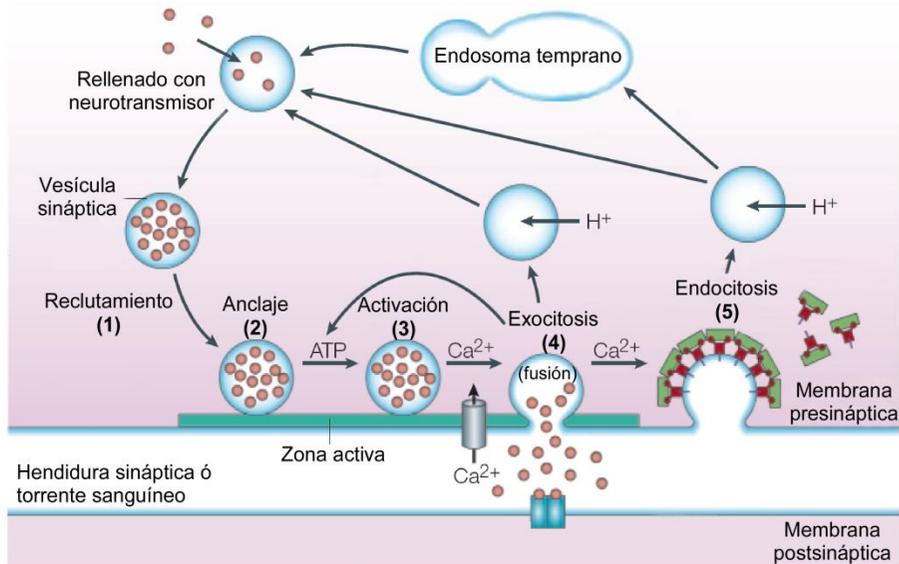


Figura 8: Esquema de las etapas de la exocitosis. Las vesículas son reclutadas (1) hacia la membrana donde ocurre el anclaje (2) y posterior activación (3) en un proceso dependiente de ATP. La entrada de Ca^{2+} desencadena la fusión (4) de la vesícula con la membrana plasmática. Por último ocurre la endocitosis como mecanismo de recuperación de membrana. (Modificado de Gundelfinger 2003)

Las etapas que forman el proceso de liberación por exocitosis han sido funcionalmente definidas y se ha visto que varios pasos son dependientes de ATP y/o Ca^{2+} : 1) movimiento de las vesículas hacia la membrana plasmática, 2) anclaje en la membrana plasmática (*docking*), 3) activación o conversión al estado de “liberables” (*priming*), 4) fusión con la membrana plasmática y liberación del contenido de gránulo y 5) recuperación de la membrana por endocitosis. (fig. 8)

El Ca^{2+} es el factor promotor fisiológico de este proceso, siendo necesario para el ensamblaje de los filamentos de actina que conducen a las vesículas hacia la membrana, la fusión y también la recuperación posterior de la membrana por endocitosis (Neher, 1998; Smith and Neher, 1997). Así mismo, 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 excitotico (Machado, 2008).

La etapa de reclutamiento de vesículas es dependiente de ATP y de Ca^{2+} y comprende la reorganización de la red de actina para reclutar los gránulos hacia las zonas cercanas a la membrana plasmática (Trifaro et al., 2008).

Posteriormente ocurre el anclaje a la membrana plasmática. El concepto de “docking” fue definido fundamentalmente por la observación de fotografías de microscopía electrónica en las que se observaba un grupo de vesículas muy próximas a la membrana plasmática. Podríamos considerar que este proceso de anclaje (“docking”) consiste en el reclutamiento de vesículas del grupo de reserva al UVP. Se ha propuesto que en esta etapa están involucradas las proteínas Munc18 y el complejo RIM-Rab3.

La siguiente fase consiste en la activación de las vesículas o *priming*, que consiste en el paso al grupo de vesículas liberables ya sean SRP o RRP. En esta etapa se forma el complejo SNARE al que se une la proteína Munc13. Este proceso requiere ATP y Ca^{2+} y además están involucradas las proteínas quinasas A y C (Becherer and Rettig, 2006).

Por último es el Ca^{2+} , sin intervención del ATP, el que desencadena la fusión de los gránulos con la membrana plasmática (Degtyar et al., 2007).

8. La maquinaria excitotica.

8.1. Complejo proteico SNARE.

Las proteínas sinaptobrevina o VAMP (*vesicle-associated membrane protein*), sintaxina 1 y SNAP25 pertenecen a la familia SNARE. Las proteínas de esta familia se caracterizan por tener motivos SNARE conservados. La VAMP se localiza en la membrana vesicular, mientras que la sintaxina 1 y la SNAP25 se localizan en la membrana plasmática (Gundelfinger et al., 2003; Jahn and Fasshauer, 2012; Rizo and Rosenmund, 2008).

El ensamblaje del complejo SNARE ocurre por la unión de las zonas N-terminales de los motivos SNAREs en trans de manera que se forma un complejo helicoidal paralelo a las dos membranas y que permite su acercamiento para la fusión. Un cambio conformacional en la sintaxina 1 produce la interacción de ésta con la VAMP y con la SNAP25 desencadenando la fusión de las dos membranas.

Diversos estudios moleculares han demostrado que las SNAREs son esenciales para la fusión de las membranas (Nonet et al., 1998; Schoch et al., 2001). Por otro lado, el uso de neurotoxinas también ha permitido estudiar el papel esencial que tiene el complejo SNARE en la exocitosis (Blasi et al., 1993; Schiavo et al., 1992).

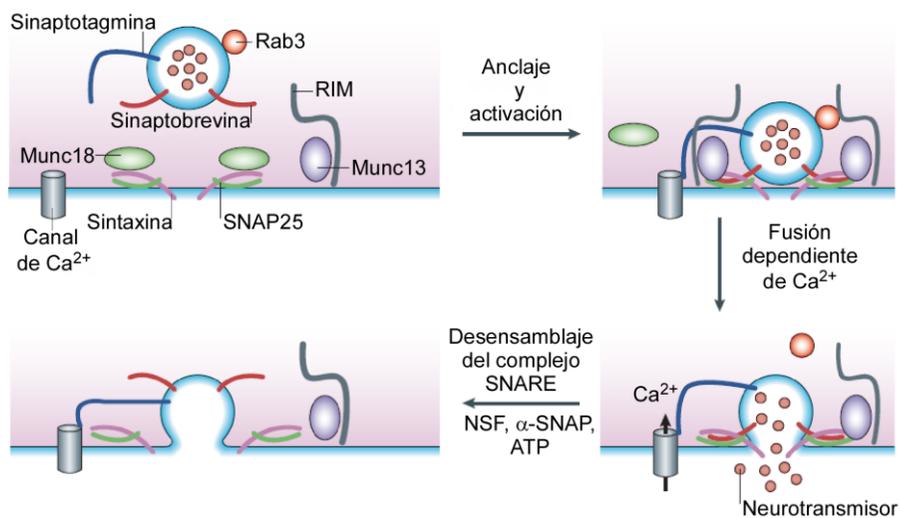


Figura 9: Esquema del proceso de anclaje y fusión. El complejo SNARE acerca las membranas venciendo las fuerzas electrostáticas y posibilitando la fusión (Modificado de Gundelfinger 2003).

8.2. Sec-1/Munc18.

La familia Sec/Munc es otra familia de proteínas importante en la ejecución y la regulación de este proceso, en especial Munc18.

El papel de la Munc18 ha sido controvertido ya que se une a la sintaxina impidiendo la formación del complejo SNARE (fig. 8). Lo cual es contradictorio con la completa pérdida de la exocitosis en mutantes deletados. La Munc18 se comporta como un regulador negativo a la

espera de la señal adecuada para liberar a syntaxina. Además, se ha descrito esta unión como necesaria para la correcta activación de la syntaxina (Dulubova et al., 1999). La Munc18 podría mantener a la syntaxina inactiva previniendo la formación del complejo SNARE prematura y posteriormente permitir la activación de la syntaxina (Jahn and Fasshauer, 2012).

8.3. Munc13, RIM y Rab.

La exocitosis es bloqueada totalmente en neuronas que carecen de Munc13. Se piensa que esta proteína puede participar en el desbloqueo de la syntaxina por la Munc18. La delección de la proteína RIM también bloquea la exocitosis. La RIM actúa como un organizador central de la zona activa, forma un complejo con la Munc13 y las pequeñas GTPasas Rab3 y Rab27 orquestando el sitio de unión de las vesículas (Jahn and Fasshauer, 2012).

Las proteínas Rab son GTPasas, se localizan en múltiples orgánulos y están involucradas en el tráfico de vesículas y orgánulos. Se ha propuesto que funcionan como “interruptores” moleculares, que determinan cuanto tiempo pueden permanecer las vesículas en el estado de ancladas y/o fusionadas, antes de que la hidrólisis del GTP inactive ese estado. Cuando se produce la activación, la Rab3 se separa de RIM y queda libre para activar a la proteína Munc13, ésta libera a la syntaxina provocando su separación de la Munc18 (fig. 8) (Gundelfinger et al., 2003).

8.4. Sinaptotagminas y complexinas.

La sensibilidad al Ca^{2+} de las proteínas integrantes de la maquinaria de la exocitosis ha sido ampliamente estudiada, sin embargo la sinaptotagmina, una proteína de la membrana del gránulo, parece ser la candidata más plausible desde que fue descubierta su condición de proteína de unión a fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} .

Las complexinas son pequeñas proteínas citoplasmáticas que se unen al complejo SNARE de manera dependiente al Ca^{2+} . Estas proteínas tienen un comportamiento dual excitatorio e inhibitorio de la exocitosis, mientras la zona N-terminal es necesaria para la facilitación de la fusión,

las zonas que flanquean la α -hélice central parecen tener un papel inhibitorio (Jahn and Fasshauer, 2012).

8.5. NSF y α -SNAP.

Tras la exocitosis, el NSF y la α -SNAP, dos proteínas solubles, entran en acción para desacoplar el complejo SNARE para que pueda ser reutilizado. Dada su alta estabilidad, se requieren grandes cantidades de energía proporcionada por la ATPasa NSF (Sudhof, 2012).

8.6. Ca^{2+} .

El aumento del Ca^{2+} intracelular es el principal estímulo para iniciar la exocitosis. El Ca^{2+} puede provenir del exterior celular, de determinados orgánulos celulares o de ambos lugares. En las células cromafines, la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares da lugar a unos niveles muy bajos de secreción (Cheek et al., 1989). En cambio, en las células pancreáticas exocrinas, la liberación del Ca^{2+} desde el retículo endoplásmico es esencial para provocar la exocitosis (Wasle and Edwardson, 2002). En otros tipos celulares, como en las células corticotropas (hipófisis), existe una situación intermedia, en la que la entrada de Ca^{2+} desde el exterior y la salida del mismo desde los reservorios provoca la exocitosis, pero ninguno de los dos mecanismos por separado da lugar a la máxima respuesta (Tse and Tse, 1999).

También se ha estudiado la relación que existe entre la existencia de microdominios de Ca^{2+} y la exocitosis que suele ocurrir en zonas ricas en canales de Ca^{2+} (Neher, 1998). Esta relación puede determinar la efectividad del incremento de la concentración de Ca^{2+} en zonas concretas y el inicio de la exocitosis (Monck et al., 1994).

8.6.1. Canales de Ca^{2+} voltaje dependientes.

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. Estos canales están formados por varias subunidades transmembrana entre las que cabe destacar la subunidad $\alpha 1$ que forma el poro iónico por el que

entra el Ca^{2+} . Se han identificado varios tipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, se han clasificado en dos grupos 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).

Los canales de bajo umbral de activación (LVA) se abren a voltajes por encima de los -50 mV. Sólo se ha identificado un tipo de canal de este grupo denominado T (*Transient* o *tiny*). Este canal presenta una rápida inactivación, un bajo umbral de activación (-60 a -50 mV) y una permeabilidad similar al Ba^{2+} y al Ca^{2+} .

Los canales de alto umbral de activación (HVA) se abren a voltajes superiores (de -30 a -20 mV). Se han identificado cuatro subtipos denominados L, N, P/Q y R son más permeables al Ba^{2+} que al Ca^{2+} y son más sensibles al bloqueo por Cd^{2+} que por Ni^{2+} .

Los canales del subtipo L (*Long lasting*) se caracterizan por su alta sensibilidad a las dihidropiridinas (DHP) tanto agonistas como Bay K 8644 o antagonistas como nifedipino o nitrendipino. Estos canales presentan una corriente de entrada de larga duración y lenta inactivación.

Los canales del subtipo N (*Neuronal*) son insensibles a las DHP y son bloqueados irreversiblemente por la toxina ω -conotoxina GVIA (ω -CTx-GVIA, toxina obtenida de *Conus geographus*) y de manera reversible por la ω -conotoxina MVIIC (ω -CTx-MVIIC, obtenida de *Conus magus*) Estos canales se inactivan más rápido que los L, aunque en algunas preparaciones como las células cromafines bovinas tienen un componente que no se inactiva, aunque en estas células se han descrito como canales N no clásicos.

Los canales subtipo P/Q, se caracterizan por su inactivación por voltaje y por las toxinas: ω -CTx-MVIIC, ω -conotoxina MVIID (ω -CTx-MVIID obtenida de *Conus magus*) y ω -agatoxina-IVA (ω -Aga-IVA, toxina del veneno de la araña *Agelenopsis aperta*)

Los canales del subtipo R (*Resistant*) farmacológicamente se caracterizan por su rápida inactivación y por su insensibilidad al bloqueo por DHP, ω -CTx-GVIA, ω -Aga-IVA y ω -CTx-MVIIC.

9. Endocitosis y reciclado de vesículas

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. Entre la exocitosis y la endocitosis se mantiene un equilibrio regulado que permite la integridad celular.

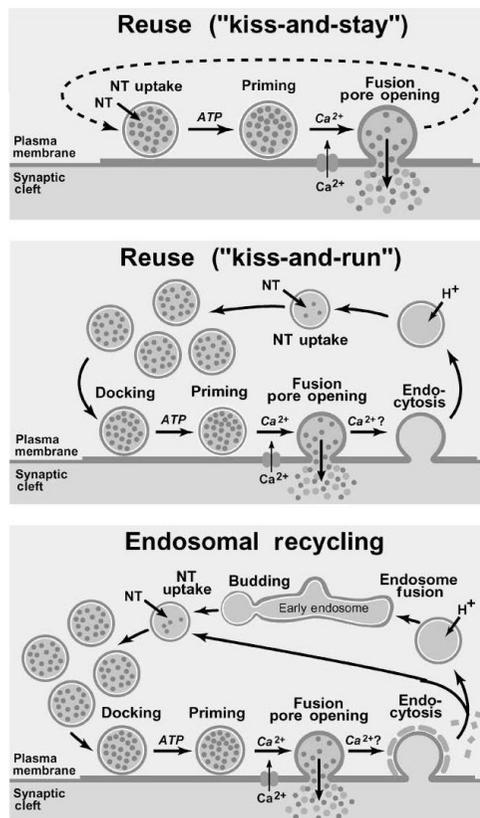


Figura 10: Vías de reciclado de vesículas secretoras. A, *kiss and stay*, las vesículas liberan parte de su contenido, se cierran, vuelven a rellenarse con neurotransmisor y vuelven estar listas para ser liberadas; B, *kiss and run*, las vesículas se fusionan, son endocitadas independientemente de clatrina y tienen que pasar por las fases de *docking* y *priming* antes de ser exocitadas; C, endocitosis mediada por clatrina en la que las vesículas son recicladas directamente o vía endosomas.

Se han propuesto 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 (fig. 10) (Sudhof, 2004). Estas vías de reciclado rápido han sido descritas en neuronas (Pyle et al., 2000) y también en gránulos neurosecretorios (Albillos et al., 1997).

10. Regulación de la exocitosis

La exocitosis es un proceso finamente regulado, lo cual no es de extrañar debido a los papeles clave que tiene en la liberación de hormonas y neurotransmisores que son esenciales para la vida de los organismos pluricelulares. En el caso de la médula adrenal, la cantidad total de CA presente es potencialmente mortal si llegase a liberarse, con lo cual los fenómenos regulatorios de la liberación son cruciales.

El Ca^{2+} , como hemos visto, actúa como mensajero; entra a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, generando transitoriamente un gradiente de Ca^{2+} en la región más adyacente a la membrana plasmática que disparará la fusión de vesículas. Se ha observado que localización de estos canales, así como la población de ellos que es activada, podría estar sujeta a regulación (García et al., 2006).

También, hay que considerar que los depósitos intracelulares tienen un papel importante en la regulación del Ca^{2+} citoplasmático y por consiguiente en la exocitosis. Tanto en el RER como en la mitocondria ocurre el secuestro y la salida de Ca^{2+} , con lo que se ha definido la tríada funcional formada por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, la mitocondria y el RER (Alonso et al., 1999). Así, los canales de Ca^{2+} actúan como los iniciadores del proceso; el receptor de rianodina del RER, como el amplificador de la señal; y el uniportador de la mitocondria disminuiría la concentración de Ca^{2+} citoplasmático (García et al., 2006).

Por otro lado, la propia vesícula acumula Ca^{2+} en concentraciones milimolares, comportándose como un almacén dinámico de Ca^{2+} (Mahapatra et al., 2004; Santodomingo et al., 2008). Recientemente se ha demostrado la implicación del Ca^{2+} intragranular en el movimiento de las vesículas en la región del subplasmalema y la exocitosis (Camacho et al., 2008).

También se han relacionado las proteínas quinasas, como la proteína quinasa C (PKC), con la regulación de la exocitosis (Burgoyne and Morgan, 2003). Ésta está implicada en la disrupción del citoesqueleto de actina para el reclutamiento de las vesículas (Vitale et al., 1995) así como en el anclaje y activación de éstas a la membrana plasmática (Smith et al., 1998). Otra proteína implicada es la proteína quinasa A (PKA), ya que se ha observado que el incremento del AMPc, aumenta el contenido vesicular y la exocitosis (Machado et al., 2001).

Asimismo, los filamentos de actina del citoesqueleto parecen tener una doble función reguladora, por un lado impiden la liberación de los gránulos no competentes para ello y por el otro, facilitan su llegada a la membrana y su anclaje (Berberian et al., 2009; Vitale et al., 1995). Además, recientemente se ha relacionado las miosinas del tipo II y V con la fusión y más concretamente con la expansión del poro de fusión. Se cree que actúan generando fuerzas mecánicas que intervienen en la liberación de las CA por parte de la matriz intragranular (Berberian et al., 2009; Ñeco et al., 2008).

11. La matriz intragranular.

11.1. Características generales de la matriz.

Los gránulos cromafines acumulan una alta concentración de solutos que en osmolaridad teórica ronda los 1,500 mOsm (Borges et al., 2010). Las CA pueden alcanzar concentraciones de entre 0,6-1M (Albillos et al., 1997; Jankowski et al., 1993; Montesinos et al., 2008); el ATP podría encontrarse entorno a 150 mM (Kopell and Westhead, 1982); el Ca^{2+} libre intragranular alcanza 50-100 μM (Santodomingo et al., 2008), pero el contenido total es de 20-40 mM, ya que la mayor parte se encuentra unido a la matriz proteica u otros componentes (Mahapatra et al., 2004); y por último, se calcula una concentración de 200 mg/mL de proteína (Videen et al., 1992). Esta cantidad de solutos lisaría los gránulos, sin embargo no es así probablemente gracias a la existencia de una matriz intragranular que compleja a estos componentes y disminuye la osmolaridad.

Se ha descrito la presencia de matriz en diferentes gránulos secretores. Por ejemplo, los mastocitos poseen una matriz formada por

heparán sulfato (Fernandez et al., 1991) y las vesículas sinápticas del órgano eléctrico del pez torpedo que contienen una matriz de proteoglicanos (Reigada et al., 2003). En ambos casos se ha demostrado la implicación de esta matriz en la liberación del contenido en cuestión. (Nanavati and Fernandez, 1993). En el caso de los gránulos cromafines los componentes proteicos principales son las cromograninas y secretograninas

11.2. Las cromograninas y secretograninas.

Las cromograninas y secretograninas, también llamadas graninas englobando a ambos grupos, son glucoproteínas solubles y acídicas ampliamente distribuidas en neuronas y células neuroendocrinas. El término cromograninas incluye a la cromogranina A (CgA) y la cromogranina B (CgB, o secretogranina I), mientras que el término secretograninas incluye a: secretogranina II (SgII, o cromogranina C), secretogranina III (SgIII o 1B1075), secretogranina IV (SgIV o HISL-19), secretogranina V (SgV o 7B2), secretogranina VI (SgVI o NESP55), secretogranina VII (VGF) and pro-SAAS (SgVIII) (Bartolomucci et al., 2011; Zhao et al., 2009). Las graninas suponen el 80% del contenido proteico del gránulo cromafín (Crivellato et al., 2008) y las tres graninas más abundantes y mejor estudiadas son la CgA, la CgB y la SgII.

La mayoría de las células endocrinas y neuroendocrinas expresan al menos un miembro de la familia de esta familia de proteínas. Las células de la hipófisis, las células C del tiroides, las células del paratiroides, las células neuroendocrinas gastrointestinales y pulmonares, y las células cromafines, producen y almacenan graninas en sus gránulos secretores. Las graninas también se expresan en determinadas zonas del sistema nervioso central, como el hipotálamo, hipocampo, amígdala y cerebelo y también se han descrito en el sistema nervioso periférico (Montero-Hadjadje et al., 2008; Taupenot et al., 2003). La expresión de unas u otras depende de diferentes agentes como AMPc, hormonas esteroideas, factores neurotróficos y esteres de forbol (Taupenot et al., 2003).

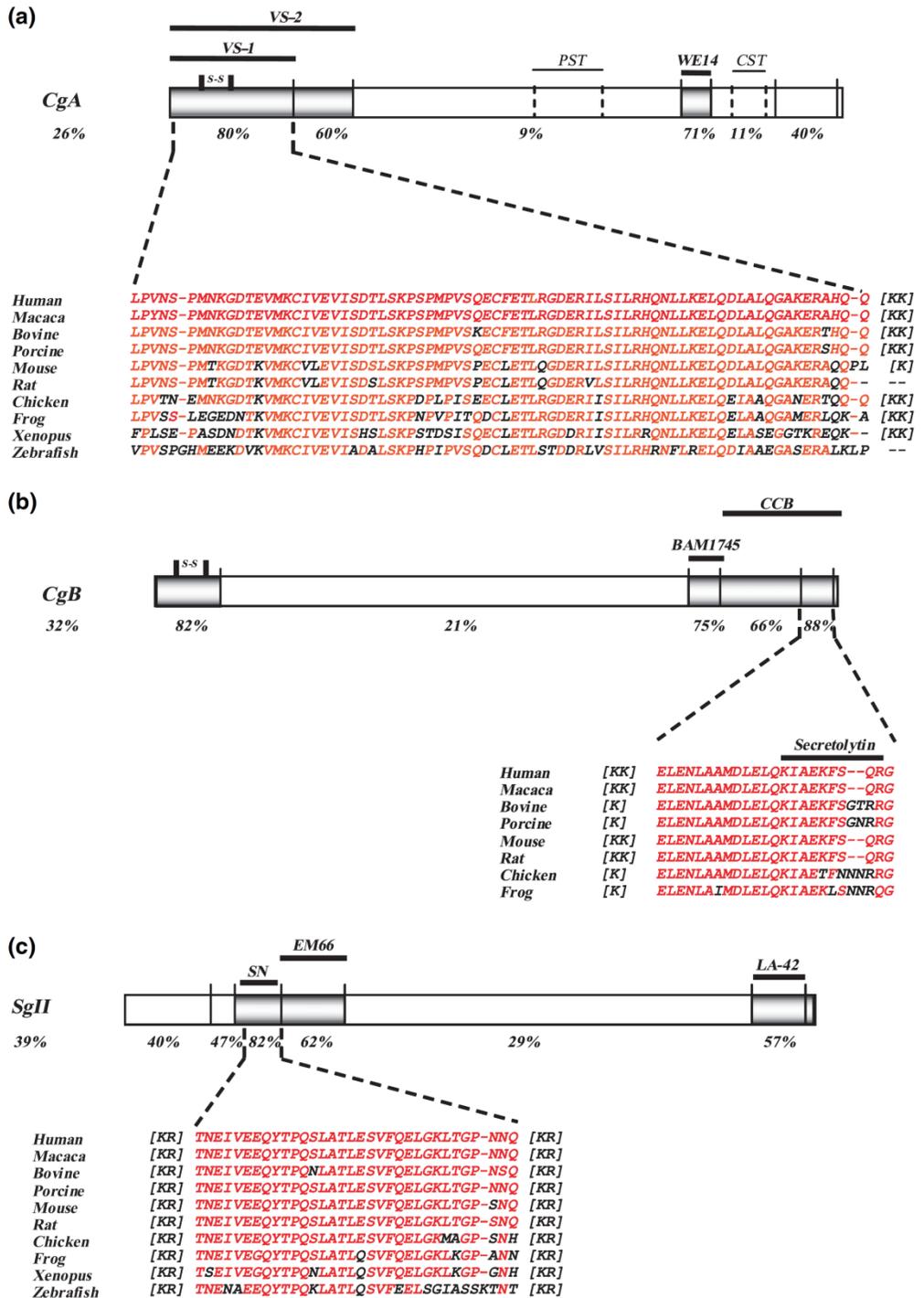


Figura 11: Representación esquemática de la homología de la secuencia de la CgA, la CgB y la SgII. Se muestran los porcentajes de homología en diferentes zonas de cada proteína. En gris se señalan los péptidos altamente conservados. En rojo se señalan los aminoácidos que coinciden con la secuencia humana y en negro los que divergen. Con líneas negras y acrónimos se señalan algunos de los péptidos que originan las diferentes graninas. VS-1: vasostatina 1; VS-2: vasostatina 2; PST: pancrestatina; WE14: péptido WE14; CST: catestatina; BAM1745: péptido BAM1745; CCB: crombacina; SN: secretoneurina; EM66: péptido EM66; LA-42: péptido LA-42. (Tomado de Montero-Hadjadje et al 2008)

Desde el punto de vista evolutivo la CgA y la CgB parecen pertenecer a un mismo grupo monofilético con, probablemente, un precursor ancestral (Montero-Hadjadje et al., 2008). Sin embargo, la SgII y el resto de componentes de la familia de las secretograninas parece que no tienen una relación evolutiva clara, con lo que la SgII tendría origen en un grupo monofilético distinto a la CgA y la CgB (Zhao et al., 2009). Al comparar la secuencia de estas proteínas entre distintos vertebrados se observa que la homología media no supera el 40%. Además se observa que existen zonas de mayor homología y zonas de menor homología. En el caso de la CgA el extremo N-terminal tiene un 80% de homología y en la CgB las zonas N-terminal y C-terminal tienen más de un 80% de homología (fig. 11). Mientras que en zonas centrales de la proteína se llega a homologías de entorno al 10-20%. En el caso de la SgII la zona de mayor homología es la que originará tras procesamiento proteolítico el péptido secretoneurina (SN).

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 pl de entre 4,5 a 6,1 (tabla 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, las CA y otras proteínas (Helle et al., 1985; Videen et al., 1992). Esta característica de agregación sugiere su papel en la granulogénesis, en el almacenamiento de altas concentraciones de

solos y en la participación de la liberación del contenido de los gránulos secretores. Además, poseen múltiples sitios de corte de tipo dibásico (arginina y/o lisina) que originarán varios péptidos con diversas actividades biológicas. Tanto la CgA como la CgB poseen en el extremo N-terminal dos residuos cisteína que forman un puente disulfuro que está implicado en el envío de los gránulos a la vía de exocitosis regulada (fig. 11) (Taupenot et al., 2003).

Tabla 1: Propiedades fisicoquímicas de las graninas. †, aminoácidos de la proteína madura; ‡, masa molecular calculada de la estructura primaria y la aparente fue determinada por SDS-PAGE; §, se refiere a dos o más Arg o Lys consecutivas; ND, no determinado (Tomado de Taupenot 2003).

Property	CgA	CgB	SgII	SgIII (1B1075)	SgIV (HISL-19)	SgV (7B2)	SgVI (NESP55)
Chromosome localization	14 (human), 21 (bovine), 6 (rat), 12 (mouse)	20 (human), 3 (rat), 2 (mouse)	2 (human), 9 (rat), 1 (mouse)	2 (mouse)	ND	15 (human), 2 (mouse)	20 (human)
Amino acid residues†	431–445	626–657	559–586	449–507	ND	185	241
Molecular mass (kD)‡:							
Calculated	49–52	48–52	67.5	51–57	ND	21	27.5
Apparent	74–80	100–120	86	57	35	23	55
Acidic residues (%)	25	24	20	19	ND	16	21
Isoelectric point (pHi)	4.5–5.0	5.1–5.2	5.0	5.1	5.6	5.2	4.4–5.2
Multibasic sites§	8–10	15–18	9	6–10	ND	3	5
Disulfide-bonded loop	Yes	Yes	No	No	ND	No	No
Calcium binding	Yes	Yes	Yes	ND	ND	Yes	ND
Thermostability	Yes	Yes	Yes	ND	ND	Yes	Yes
Phosphorylation	Yes	Yes	Yes	ND	ND	Yes	Yes
Sulfation	Yes	Yes	Yes	Yes	ND	Yes	ND
O-glycosylation	Yes	Yes	Yes	ND	ND	ND	Yes
N-glycosylation	No	Yes	No	No	No	No	No

11.3. La cromogranina A.

La cromogranina A es la proteína más abundante en los gránulos cromafines bovinos, constituye aproximadamente el 40% de sus proteínas solubles. Fue descrita por primera vez en el año 1967 (Blaschko et al., 1967) y se almacena y se secreta con la adrenalina y la noradrenalina en la médula adrenal (Helle et al., 1993). La localización del gen de la CgA en los cromosomas varía según las especies (tabla 1) y se organiza en 8 exones y 7 intrones (fig. 12). Posee entre 431-445 aminoácidos, su peso

molecular calculado ronda los 49 - 52 kDa y su punto isoeléctrico (pI) se encuentra entre 4,5 y 5 (Taupenot et al., 2003). En cuanto a su estructura proteica se trata de un polipéptido en configuración de espiral aleatoria en un 60-65% de su estructura y con conformaciones de hélice α y de lámina β en un 25-40% (Mosley et al., 2007; Yoo and Albanesi, 1990). La CgA es modificada postraduccionalmente por medio de fosforilaciones, glicosilaciones y sulfataciones lo cual hace que el peso molecular aparente (calculado mediante electroforesis) ronde los 74-80 kDa (tabla 1). Sin embargo, se desconoce la estructura tridimensional completa de la proteína, solo se ha obtenido por medio de resonancia magnética nuclear la estructura del péptido catestatina (Preece et al., 2004).

El Ca^{2+} y el pH bajo inducen cambios conformacionales en la estructura de la CgA; éstos se observan en las estructuras hélice α y lámina β . Estos cambios se traducen en el grado de agregación de la proteína. El aporte de cargas positivas de Ca^{2+} , Ca , H^+ y ATP permiten que la CgA se pliegue y compacte promoviendo la condensación del contenido vesicular. Esta condensación disminuye la presión osmótica y facilita el almacenaje de más sustancias (Yoo and Albanesi, 1990). Por otro lado, como ya se ha citado con anterioridad la capacidad de agregación y el descubrimiento de determinantes proteicos relacionados con la formación de vesículas (Courel et al., 2006; Kim et al., 2001; Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005; Stettler et al., 2009) la han implicado en la granulogénesis.

La CgA es una pro-hormona que tras ser procesada por endopeptidasas como las prohormona convertasas 1 y 2 (PC1 y PC2) origina péptidos con actividad biológica con acciones autocrinas, paracrinas y endocrinas muy variadas. Estos péptidos se generan en el interior del gránulo o una vez liberados por acción de proteasas (fig. 12).

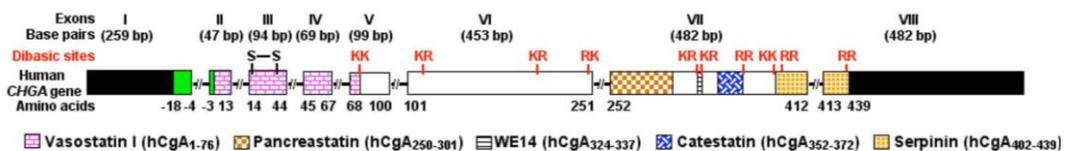


Figura 12: Organización genómica del gen de la CgA humana. Se señalan las zonas que originan los péptidos con actividad biológica. (tomado de Bartolomucci 2011)

La pancrestatina fue el primer péptido derivado de las graninas descrito, inhibe la liberación de insulina por las células β y la captación de glucosa por los adipocitos y hepatocitos, mientras que estimula la glucogenolisis y la liberación de glucagón e histamina. La catestatina se identificó inicialmente como el antagonista endógeno más potente del receptor nicotínico que inhibe la liberación de catecolaminas inducida por nicotina de una manera autocrina o paracrina, actúa como vasodilatador estimulando la liberación de histamina, también inhibe la desensibilización de la liberación de catecolaminas inducida por nicotina, además se ha observado que presenta acción antimicrobiana. Las vasostatinas I y II inhiben la vasoconstricción, modulan la adhesión celular, la liberación de hormona paratiroidea, la interacción de los fibroblastos y las células del músculo liso con la matriz extracelular, también actúan como agentes inotrópicos negativos en corazón aislado de rata e inducen apoptosis neuronal. La parastatina inhibe la secreción de hormona paratiroidea. Otros péptidos como la cromofungina y las cromacinas I y II tienen acción antibacteriana y antifúngica (Bartolomucci et al., 2011; Montero-Hadjadje et al., 2008). Recientemente se ha descrito la serpinina que se ha relacionado con la granulogénesis y la inhibición de la muerte celular (Koshimizu et al., 2010). Dada esta gran cantidad de funciones, se ha implicado a la CgA en diversos desórdenes, en especial se ha estudiado su papel en la hipertensión (Mahapatra et al., 2005; Takiyyuddin et al., 1990) y en la disponibilidad de glucosa (Gayen et al., 2009).

11.4. La cromogranina B.

La cromogranina B ó secretogranina I fue descrita por primera vez en 1985 (Falkensammer et al., 1985) y es otra de las proteínas abundantes en los gránulos cromafines. Al contrario que la CgA, que es la proteína mayoritaria en los gránulos cromafines bovinos, la CgB es la proteína más abundante en la rata y el humano (Gasnier et al., 2004). La localización del gen de la CgB en los cromosomas varía también según las especies (tabla 1) y se organiza en 5 exones y 4 intrones (fig 13). La secuencia consta de 626-657 aminoácidos y su punto isoeléctrico está entre 5,1 y 5,2. Su peso molecular aparente está entre 100 y 120 KDa, mientras que el calculado es 48-52 KDa (Taupenot et al., 2003). Esta divergencia se debe al gran número de modificaciones postraduccionales (glicosilaciones,

fosforilaciones y sulfataciones) que sufre esta proteína y la gran cantidad de residuos ácidos que provocan el retraso en su migración electroforética (Gasnier et al., 2004).

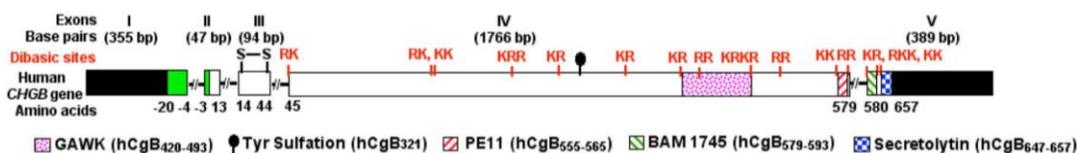


Figura 13: Organización genómica del gen de la CgB humana. Se señalan las zonas que originan los péptidos con actividad biológica. (tomado de Bartolomucci 2011)

La CgB comparte varias características con la CgA como la amplia expresión en el sistema endocrino y nervioso, ser una proteína ácida, tener estructura en hélice aleatoria, tener estabilidad térmica, la presencia de puentes disulfuro en la zona N-terminal y C-terminal, la gran cantidad de aminoácidos ácidos y de dianas de proteasas de carácter dibásico. En cuanto a su estructura también hay similitud con la CgA; la espiral aleatoria supone el 65-70% de la molécula y sólo un 15-20% se encuentra en conformación de α -hélice y un 10-15% de lámina β (Yoo, 1995). La CgB también presenta baja afinidad y alta capacidad por la unión a Ca^{2+} . Asimismo posee la capacidad de agregarse en presencia de Ca^{2+} y pH ácido teniendo una sensibilidad al Ca^{2+} de dos órdenes de magnitud mayor que en la CgA.

Por todas estas características, la CgB ha sido estudiada en base a su posible habilidad para inducir la granulogénesis, proponiéndose incluso como inductor más eficaz que la CgA ya que es capaz de inducir la formación de más del doble de gránulos en células no endocrinas NIH3T3 y COS-7 que la CgA (Huh et al., 2003). El puente disulfuro de la zona Nt de la CgB parece ser determinante para su propiedad granulogénica y para que sea correctamente introducida en gránulos secretores en el aparato de Golgi (Kromer et al., 1998). La CgA también posee un puente disulfuro, pero su eliminación parece no tener tal efecto (Taupenot et al., 2002). Algunos estudios apuntan a la participación tanto de la CgA como de la CgB en la movilización del Ca^{2+} intracelular ya que se unen al receptor de IP_3 de los gránulos y facilita la liberación del Ca^{2+} en respuesta al IP_3 (Yoo, 2000). También se ha detectado la presencia de CgB en el núcleo de

células PC12 sugiriendo un papel en la regulación de la expresión de determinados genes (Montero-Hadjadje et al., 2008; Yoo et al., 2002).

De los péptidos derivados de la CgB, el más conocido es la secretolitina con acción antibacteriana. También se ha descrito que la crombacina tiene actividad bacteriolítica. El resto de péptidos son: GAWK, BAM-1745, SR-17, HQ-34 y PE-11 (Montero-Hadjadje et al., 2008; Zhao et al., 2009). Algunos polimorfismos en el locus de la CgB la han relacionado con enfermedades como la esquizofrenia (Zhang et al., 2002), la enfermedad de Alzheimer (Marksteiner et al., 2000) y la epilepsia (Mahata et al., 1992).

11.5. La secretogranina II ó cromogranina C.

La secretogranina II o cromogranina C fue detectada por primera vez en la adenohipófisis (Rosa and Zanini, 1983) y posteriormente fue identificada en la glándula adrenal (Fischer-Colbrie et al., 1986). La localización del gen de la SgII varía según la especie (tabla 1) y se organiza en dos exones y un intrón. La secuencia de aminoácidos de esta proteína es de 559-586, su peso molecular calculado es de 67,5 KDa mientras que el peso molecular aparente es de 86 KDa. Como las otras graninas también sufre modificaciones postraduccionales. Tiene un pI de 5 (tabla 1) (Taupenot et al., 2003). Comparte con la CgA y CgB, su riqueza en aminoácidos ácidos, sin embargo carece de la estructura en lazo unido por un puente disulfuro que éstas poseen en su extremo N terminal. Se ha observado que esta granina tiene estructuras en enrollamiento al azar y láminas β a lo largo de su estructura, con una baja contribución de hélices α (Park et al., 2002). Además, se ha demostrado que en las condiciones de pH y de concentración del Ca^{2+} descritas en los gránulos, la SgII forma agregados (Gerdes et al., 1989), con lo cual podría estar implicada, como las CgA y CgB en la formación de la matriz intravesicular y en la granulogénesis.

También posee múltiples sitios de corte de tipo dibásico, que dan lugar a péptidos derivados de su procesamiento, como la secretoneurina (SN). A este péptido se le han atribuido una serie de funciones como atrayente de monocitos y eosinófilos; se ha detectado en el líquido cerebroespinal y se ha involucrado en la neurotransmisión y la regulación

paracrina del sistema nervioso y neuroendocrino; promueve la liberación de dopamina del estriado y participa en el crecimiento de neuritas en el cerebelo en desarrollo; actúa incrementando la permeabilidad del endotelio de las arterias coronarias y como citoquina, entre otras funciones (Montero-Hadjadje et al., 2008). Otro péptido derivado de la SgII, es el péptido EM66, implicado en el estrés derivado del ayuno y el control de la ingesta de alimento (Zhao et al., 2009).

La SgII se ha relacionado junto a la CgB con la enfermedad de Alzheimer en un modelo murino (Willis et al., 2008). Más recientemente se ha propuesto que la disminución de SgII, junto a CgA y CgB, en las neuronas motoras, puede estar implicado en la esclerosis amiotrófica lateral. También se ha vinculado a la SgII con la hipertensión (Bartolomucci et al., 2011).

11.6. Las otras graninas.

El resto de graninas descritas son las secretograninas III, IV, V, VI, VII y VIII, también conocidas como 1B1075, HISL-19, 7B2, NESP55, VGF y ProSAAS respectivamente (Bartolomucci et al., 2011; Montero-Hadjadje et al., 2008; Zhao et al., 2009).

La secretogranina III (SgIII) es una proteína de 57 KDa, con una importante cantidad de aminoácidos ácidos y un *pI* de 5,1. Esta proteína también ha sido relacionada con la granulogénesis. En células AtT-20 se une a membranas ricas en colesterol en la TGN (Hosaka et al., 2004) y también se ha propuesto la unión a la carboxipeptidasa E (CPE) (Hosaka 2005). La SgIII una vez anclada actúa como receptor de la CgA y otras prohormonas promovería la granulogénesis y la clasificación hacia la vía de secreción regulada (Hosaka and Watanabe, 2010; Prasad et al., 2008). Se ha descrito esta función de la SgIII en mastocitos, en células de la hipófisis y del páncreas endocrino (Hosaka et al., 2002) y en células PC12 y glándula adrenal (Han et al., 2008).

La SgV o 7B2, que también es procesada en péptidos y posee un *pI* de 4,9, está involucrada en la inhibición de las enzimas prohormona convertasas 1 y 2 (PC1 y PC2). La SgVI o NESP55, cuyo gen forma parte del complejo locus GNAS que codifica la subunidad α de la proteína G

estimuladora ($G_s\alpha$), consiste en una proteína de unos 244 aminoácidos cuyo péptido LSAL es antagonista del receptor de serotonina 5-HT_{1b}. La SgVII o VGF es un polipéptido ácido rico en prolina y glicina, que es procesado en varios péptidos involucrados en diversas actividades biológicas como: inhibición de la secreción de vasopresina; estimulación de la ingesta, de la actividad locomotora y de la temperatura corporal; antidepresivo; y regula balance energético. Y por último la SgVIII o ProSAAS que está involucrada como la 7B2 en la inhibición de la PC1, en la regulación del procesamiento de neuropéptidos en estadios fetales y en el peso y locomoción en adultos (Bartolomucci et al., 2011).

11.7. La matriz vesicular y la exocitosis.

A parte de las funciones atribuidas a las graninas en la granulogénesis y el gran número de funciones fisiológicas de sus péptidos derivados, se ha sugerido su implicación en el proceso de la exocitosis como componente activo en el mantenimiento del equilibrio entre la fracción libre/unida de las moléculas solubles de las vesículas (Schroeder et al., 1996). Las graninas unen CA y Ca^{2+} con baja afinidad y alta capacidad lo cual, como se ha citado anteriormente, favorece la agregación de las mismas a pH ácido. Haciendo uso de la amperometría se ha comprobado que la difusión del contenido vesicular es menor al esperado según el coeficiente de difusión de las CA (Alvarez de Toledo et al., 1993; Jankowski et al., 1993), con lo cual la unión de las CA a las graninas estaría retrasando la liberación de las CA a medio extracelular.

También se ha involucrado a la matriz no sólo en la acumulación de Ca^{2+} sino también en su salida desde los gránulos (Camacho et al., 2008) por medio de la interacción de la CgA y CgB con el receptor de IP3 (Yoo, 2009). Además la alcalinización o acidificación del interior granular afecta a la exocitosis, haciéndola más lenta o más rápida respectivamente (Camacho et al., 2006). La matriz se comporta como una matriz de intercambio iónico que retrasa la liberación del contenido intravesicular (Rahamimoff and Fernandez, 1997; Schroeder et al., 1996). Este fenómeno también ha sido descrito en las vesículas colinérgicas del órgano eléctrico de torpedo (Reigada et al., 2003). Además se ha demostrado que la matriz sufre un “hinchamiento” o *swelling* que facilita la disociación de solutos

(Nanavati and Fernandez, 1993). Los cambios osmóticos del medio extracelular modifican la cinética de liberación de los solutos indicando una acción directa sobre la matriz (Borges et al., 1997).

Hasta hace pocos años, no se había podido modificar la composición de la matriz intragranular. La aparición de los ratones modificados genéticamente en los que se ha eliminado alguna de las graninas de la matriz vesicular, (Hendy et al., 2006; Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005; Obermüller et al., 2010) ha permitido discriminar la función de cada componente de la matriz de forma diferencial (Diaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008). Se ha observado que la ausencia de una o más graninas altera los últimos pasos de la exocitosis.

Las funciones de las graninas aún continúan en discusión, pero las evidencias que tenemos hasta el momento apuntan en cuatro direcciones. Se ha observado el papel varios miembros de esta familia de proteínas en la biogénesis de gránulos secretores (Courel et al., 2010; Huh et al., 2003; Kim et al., 2001; Prasad et al., 2008; Stettler et al., 2009). También se han involucrado en el *sorting* de péptidos a la vía de secreción regulada (Elias et al., 2010; Montero-Hadjadje et al., 2009). Además se ha descrito que son capaces de unir Ca^{2+} , ATP, H^+ y CA, lo cual a parte de promover la condensación de las graninas se ha relacionado con el mantenimiento de la osmolaridad intravesicular dentro de valores isosmóticos, lo cual permitiría un mayor almacenamiento de neurotransmisores sin comprometer la integridad del gránulo (Machado et al., 2010; Yoo and Albanesi, 1991). Y por último, se han definido diversos papeles biológicos a la gran variedad de péptidos originados por el procesamiento proteolítico de las graninas (Bartolomucci et al., 2011; Montero-Hadjadje et al., 2008).

En cuanto a la exocitosis, muchos laboratorios se han centrado en estudiar diversos aspectos de la misma como las proteínas involucradas en la fusión con la membrana (SNAREs, sinaptotagminas, Muncs, etc), los transportadores de neurotransmisores, las rutas de síntesis y degradación de neurotransmisores. Nuestro laboratorio se ha dedicado en los últimos años a estudiar los componentes intravesiculares y su función en regulación de la exocitosis de catecolaminas. Así se han atribuido papeles clave en la exocitosis al NO, AMPc (Machado et al., 2001; Machado et al.,

2000), al pH y al Ca^{2+} intravesicular (Camacho et al., 2008; Camacho et al., 2006). Además con la disponibilidad de los ratones carentes de cromograninas hemos podido caracterizar cómo la ausencia de una o de varias graninas modifica la exocitosis de catecolaminas (Díaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008).

Con esta tesis se pretende continuar la profundización del papel de las cromograninas en la exocitosis y acumulación de catecolaminas utilizando estrategias de expresión de proteínas.

Objetivos

El grupo de investigación en el que se ha realizado esta tesis ha estudiado durante los últimos años diversos factores intravesiculares involucrados en la exocitosis de catecolaminas. La finalidad de esta tesis ha sido profundizar en el papel de las cromograninas en la exocitosis y para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

- 1) Caracterizar la exocitosis mediante el uso de proteínas intravesiculares solubles (cromograninas).
- 2) Definir las características de los gránulos secretores cuya neoformación ha sido inducida por cromograninas.
- 3) Estudiar el papel de las cromograninas en la acumulación de catecolaminas.
- 4) Aportar más información acerca de las funciones fisiológicas de la cromogranina A en la exocitosis de catecolaminas

Material y métodos

12. Mantenimiento en cultivo de las líneas celulares HEK293 y PC12

La línea celular de riñón embrionario humano HEK293 (*Human Embryonic Kidney*) se mantiene en cultivo en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, D5648, Gibco) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS, DE14-801F, Lonza) y antibióticos (penicilina 100 uds/L P3032, Sigma y gentamicina 40 mg/L 1405-41-0 Acofarma). La línea celular neuroendocrina PC12, derivada de feocromocitoma de rata, se mantiene en cultivo en medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*, Gibco) suplementado con un 5% de FBS y un 5% de suero de caballo (HS, 14-427F, Lonza), y antibióticos. Las células se colocan en un incubador con 5% de CO₂, a 37°C y con atmósfera saturada de humedad.

Ambas líneas celulares se mantienen en frascos de cultivo de 75 cm². Cada 2-3 días las células son subcultivadas. Las HEK293 proliferan adheridas al sustrato, para subcultivarlas se realiza un lavado de las células con solución de Locke: 154 mM de NaCl, 5,6 mM de KCl, 3,6 mM de NaCO₃H, 5 mM de HEPES y 5,6 mM glucosa, posteriormente se añade una solución de 0,5 g/L de Tripsina (T4799, Sigma) y 0,2 g/L de EDTA (ED2SS) lo cual permite que las células se despeguen del sustrato, se añade medio de cultivo, se centrifugan las células a 800xg, se elimina el sobrenadante, se resuspenden con medio de cultivo fresco y se realiza una dilución 1/10 de las células para subcultivarlas. Las PC12 proliferan fundamentalmente en suspensión formando agregados celulares, con lo que para subcultivarlas se recoge el medio de cultivo, se centrifugan a 800xg, el pellet de células se resuspende con medio fresco y se realiza una dilución 1/4 para subcultivarlas.

Para los diferentes procedimientos experimentales las células se siembran en diferentes placas de cultivo en un número determinado, para ello es necesario que las células estén en suspensión e individualizadas. Para las HEK293 la utilización de la solución de Tripsina-EDTA es suficiente para que las células estén separadas. Para las PC12 utilizamos un sistema mecánico de separación, se utiliza una jeringa de 5mL con una aguja G22 y se hace pasar la suspensión celular por la aguja 20-25 veces, con este procedimiento se logran individualizar.

Para el recuento de las células se toman 10 μ L de células, 90 μ L de azul de tripán al 0,4% en Locke, se mezclan con suavidad y se colocan 10 μ L en un hemocitómetro o cámara de Neubauer. Solo se contarán las células no coloreadas porque son las que están intactas. Multiplicaremos el número de células por 10 que es el factor de dilución, por 10.000 (ya que el volumen de la cámara es 1/10.000 mL) obteniendo así el número de células por mL que tenemos en nuestra suspensión celular.

13. Obtención del vector de expresión de CgA-EGFP.

Se ha obtenido un vector de expresión (fig. 1) pCgA-EGFPN3, que nos permite expresar la proteínas de fusión CgA-EGFP, es decir, la CgA unida por su extremo Ct (carboxilo terminal) a la proteína fluorescente verde EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) en líneas celulares.

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

La secuencia de cDNA de la CgA de ratón fue tomada de la base de datos NCBI (ChgA: NM_007693). Por convención, utilizaremos la terminología anglosajona para algunos términos:

Para clonar la región codificante de la CgA (1,39Kb) se diseñaron los siguientes oligonucleótidos:

Primer forward:

GAGAATTCCGCCACCATGCGCTCCACCGCGGTTCTGGCG

conteniendo el codón de inicio, la secuencia Kozak (subrayado) y la diana de restricción para la enzima EcoRI (en negrita).

Primer reverse:

TCGGTACCCCCGCTGGCTGAACTTTTCCGC

conteniendo la diana de restricción para la enzima KpnI (en negrita).

También se diseñaron nucleótidos que permitieran secuenciar los plásmidos resultantes. Para el plásmido codificante de la proteína CgA-EGFP se diseñaron los siguientes primers:

Primer forward CMV-IE: CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG

Primer reverse 01 seqA-R: CTAGCCACAGCCTCCTCTTC

Primer forward 02 seqA-F: GCATGTGGACCCACAGGCCA

Primer reverse EGFP Nt: TGAAGTTGTGGCCGTTTACG

13.2. Obtención del cDNA codificante para la CgA.

El cDNA de la CgA se obtuvo a partir de médula suprarrenal de ratón. Se extrajo el mRNA total usando el kit *RNAspin Mini RNA Isolation* (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA genómico fue eliminado mediante un paso de digestión con DNAsa I. La muestra de RNA fue determinada por las densidades ópticas (OD) OD₂₆₀ y OD₂₈₀ en un micro espectrofotómetro (Nanodrop®).

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

Una vez obtenido el cDNA total se realizó una PCR con una polimerasa de alta fidelidad (*Expand High Fidelity_{PLUS} PCR System*; Roche) utilizando los primers descritos en el anterior apartado. 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 a la CgA con el kit de extracción *GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare).

13.3. Clonaje de CgA en el vector pEGFPN3

Se realizó la digestión con las enzimas de restricción EcoRI y KpnI (Takara Bio Inc.) del producto de la PCR y del vector pEGFPN3 (Clontech).

Para eliminar las enzimas de restricción se procedió a precipitar el DNA digerido con fenol-cloroformo.

La ligación del inserto CgA con el vector pEGFPN3 se realizó utilizando una relación molar 3:1 (inserto:vector) en la cantidad de DNA. Para la ligación se utilizó el kit de *Epicentre Fast Link*, durante 20 min a RT. Finalizada la ligación se inactivó la ligasa durante 15 min a 70°C.

13.4. Obtención de bacterias DH5 α competentes y transformación

Para poder introducir DNA con alta eficiencia en bacterias es necesario inducir el “estado de competencia” de las mismas. Para ello, cultivos bacterianos de la cepa DH5 α de E.coli frescos, en fase logarítmica de crecimiento ($A_{660}=0,3-0,4$), se mantuvieron 10 min a 4°C, se centrifugaron 10 min a 5000 rpm y posteriormente fueron tratadas, con la solución RF1: 100 mM de RbCl, 50 mM de MnCl₂, 10 mM de CaCl₂, 30 mM de acetato sódico, glicerol 15% y ajustada a pH 5,8 con ácido acético; durante 30 min a 4°C. Una vez pasado el tiempo de incubación con la solución RF1, las bacterias fueron centrifugadas a 5000 rpm durante 10 min a 4°C y resuspendidas en la solución RF2: 10 mM de RbCl, 75 mM de CaCl₂, 10 mM de MOPS y 15% de glicerol ajustada a pH 6,8 con NaOH. En esta solución, las bacterias son preservadas a -80°C, listas para la transformación.

Tras la ligación (apartado 13.3) se transformaron bacterias DH5 α competentes utilizando el protocolo de choque térmico. Para ello se descongela una alícuota de bacterias competentes en hielo, se resuspenden con el resultado de la ligación, y se mantienen 30 min en hielo. Se someten a un choque térmico de 42°C durante 45 s. Se añade medio LB (para 1L: 10g de Triptona, 5g de extracto de levadura, 10g de NaCl, pH=7 y se autoclava) y se agitan a 37°C durante 60 min. Posteriormente se sembraron en placas de agar-LB conteniendo 50 μ g/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 incuban a 37°C hasta el día siguiente.

13.5. Extracción del plásmido pCgA-EGFP.

Con los clones positivos se realizó una extracción del DNA plasmídico con *plasmidPrep Mini Spin Kit* (Healthcare). Se comprobó por electroforesis en agarosa tras la digestión con EcoRI y KpnI que la ligación era correcta. Posteriormente se realizó una extracción de DNA con *plasmidPrep Midi Spin Kit* (Healthcare) para obtener suficiente plásmido para poder realizar

los experimentos de transfección. Se hicieron digestiones del DNA plasmídico resultante (fig. 14B) para verificar que el proceso fue correcto. Además se comprobó por medio de secuenciación con los primers indicados en el apartado 13.1 en el servicio de genómica de la Universidad de La Laguna que la secuencia y la ligación era correcta comparando con las bases de datos del NCBI. (fig 14C)

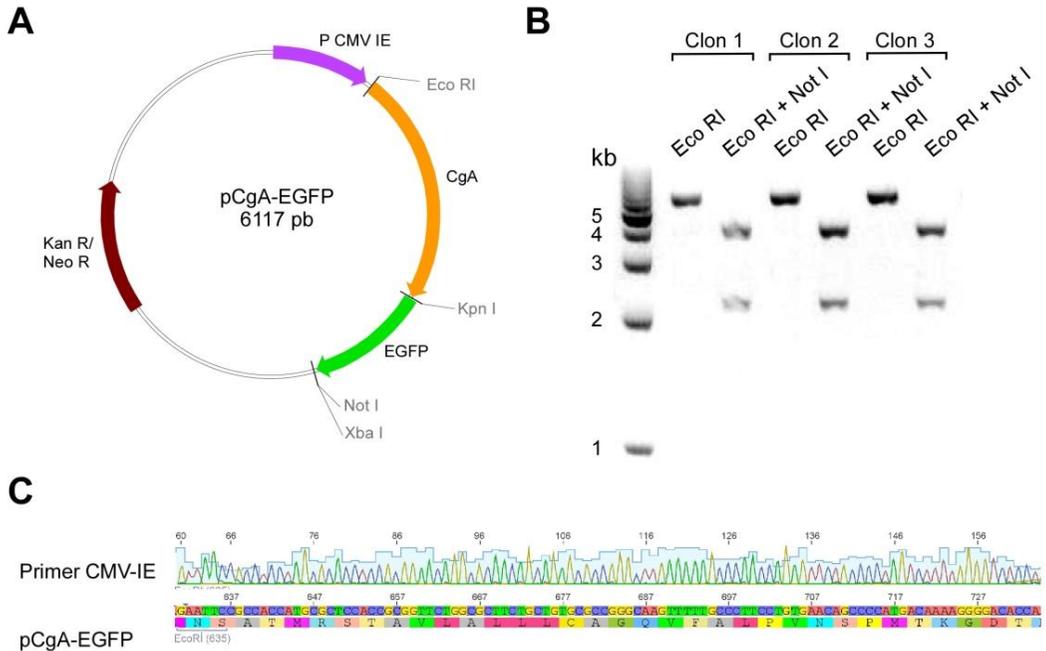


Figura 14: Vector plasmídico codificante para CgA-EGFP. **A**, esquema del vector, P CMV IE: promotor de la expresión de citomegalovirus; CgA: secuencia codificante de la CgA de ratón; EGFP: secuencia codificante de la EGFP; Kan R/Neo R: gen de resistencia de la kanamicina y neomicina. En gris se señalan las dianas de las enzimas de restricción. **B**, electroforesis del resultado de la digestión del plásmido CgA-EGFP extraído de 3 clones bacterianos diferentes.

14. Transfección de líneas celulares

Las células HEK293 se transfectaron utilizando Metafectene-Pro[®] (Biontex Laboratories GmbH). Para ello las células se sembraron 24h antes de la transfección de manera que el día de la transfección estuvieran a aproximadamente el 80% de confluencia. El día de la transfección se retiró el medio de cultivo de las células y se añadió Optimem (22600-134, Gibco) sin suero ni antibióticos. Utilizando el protocolo recomendado por Metafectene-Pro[®] se transfectaron las células utilizando una relación 1:3

(plásmido:Metafectene-Pro) y en una proporción de 1 μg de pCgA-EGFPN3 o 0,5 μg de pEGFPN3 por cada millón de células sembradas. Cuatro horas después se retiró el medio Optimem y se añadió medio DMEM completo. Los experimentos se realizaron 24 o 48 h tras la transfección.

Las células PC12 se transfectaron con el Nucleofector™ II (Amaxa) y el Basic Nucleofector Kit for primary neurons (VPI-1003, Amaxa) con una proporción de 4 μg de pCgA-EGFPN3 o 2 μg de pEGFPN3 por 4 millones de células. El programa usado fue el U-029. Tras la nucleofección las células fueron sembradas en medio RPMI sin suero y sin antibióticos durante 2 horas, después de ese tiempo se añadió el mismo volumen de medio en el que estaban las células, de medio RPMI con 10% de FBS, 10% de HS, penicilina 200 uds/L de penicilina y 80 mg/L de gentamicina, de tal manera que la concentración final sería la usual.

15. Western Blot

15.1. *Obtención de la muestra.*

Las células (HEK293 o PC12) se lisaron en una solución TENT 1% compuesta por: 50 mM de Tris-HCl a pH 7,4, 5 mM de EDTA, 150 mM de NaCl y 1% de Tritón-X100 (T9284, Sigma), suplementada con un cóctel inhibidor de proteasas (COMPLETE, Roche). Posteriormente se sometieron a ultrasonidos con un sonicador Labsonic® M (Sartorius) y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

La cantidad total de proteínas en cada muestra fue determinada por el método del ácido bicinconínico (Sigma).

15.2. *Separación de proteínas por SDS-PAGE.*

La separación de proteínas se realizó por medio de *SDS-PAGE* (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis) en el sistema Mini-PROTEAN® Tetra Sistem de Biorad. Esta técnica consiste en la separación de las proteínas por peso molecular bajo un campo eléctrico.

En cada pocillo se cargó la misma cantidad de proteínas (50 μg). Se realizó una dilución de la muestra con TENT 1% y se añadió el tampón de

carga *Laemmli* 6X (10% de SDS; 20% de glicerol; 10% de 2-mercaptoetanol; 0,004% de azul de bromofenol; y 0,125 M de Tris HCl) de manera que quedara al 1,2X. La adición de este tampón de carga colabora en la desnaturalización de las proteínas ya que contiene SDS y 2-mercaptoetanol, el glicerol da densidad a la muestra y el azul de bromofenol facilita el seguimiento de la carrera de las proteínas en el gel. Cada muestra se sometió a 100°C durante 5 min en un termobloque (LabNet) para lograr la total desnaturalización de las proteínas.

Los geles utilizados tenían una zona de empaquetamiento de aproximadamente 1 cm (“stacking” al 4% de poliacrilamida) y otra de separación (“resolving” al 7,5% de poliacrilamida). Para su elaboración se usó el sistema diseñado para tal fin de Biorad. La composición del gel de empaquetamiento fue: poliacrilamida al 4%, 0,13 M de tampón TrisHCl 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 TrisHCl a pH 8,8; 0,1% de SDS; 0,08% de APS; 0,08% de TEMED.

Se cargó cada muestra en un pocillo del gel y se cargó también el marcador de pesos moleculares *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Biorad). La electroforesis se llevó a cabo en el tampón SDS-PAGE (0,025 M Tris-base, pH 8,3, 0,192 M glicina, 0,1 % SDS) a una corriente constante de 40 mA por gel y durante aproximadamente 1 hora.

15.3. Transferencia a membrana, visualización y análisis.

Tras la electroforesis las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF ó polifluoruro de vinilideno (Immobilon-P, Biorad) de 0,45 µm de poro. Las membranas de este tipo deben ser pretratadas antes de proceder a la transferencia. Según indicaciones del fabricante se sumergieron durante 15 s en metanol, luego en agua pura durante 2 min y por último se equilibraron en tampón de transferencia (25 mM de Tris-HCl, 192 mM de glicina a pH 8,3, 0,1 % de SDS y 20% de metanol (v/v)) durante 5 min en agitación. Entonces se procedió a la transferencia de las proteínas a la membrana bajo un campo eléctrico de 400 mA durante 90 min.

Transcurrido dicho tiempo se marcaron las membranas con rojo Ponceau al 0,1% en ácido acético al 5% (tinción de proteínas) para comprobar que la transferencia ha funcionado correctamente.

Previamente al marcaje con el anticuerpo primario, se bloquearon los sitios de unión inespecífica con 5 % de leche desnatada (Sveltesse, Nestle) disuelta en TBS-T 1X (0,05 M de Tris; 0,150 M de NaCl y 0,1% de Tween-20 (P5927, Sigma)) durante 30 min en agitación.

Entonces se procedió a la incubación de la membrana con el anticuerpo primario 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. Los anticuerpos y las concentraciones utilizadas fueron: anti-CgA, anticuerpo policlonal de cabra (sc-1488, Santa Cruz Biotechnology) a 1:200; anti-CgB, anticuerpo policlonal de cabra (sc-1489 Santa Cruz) a 1:200, anti-GFP, anticuerpo policlonal de conejo (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology) a 1:400, anti-TH, anticuerpo monoclonal (Sigma, T2928) a 1:8000, anti- α -tubulina, anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma T6074) y anti-actina, anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma A3853).

Al día siguiente se procedió al lavado del anticuerpo primario y a la incubación de los respectivos anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa a 1:10.000 a temperatura ambiente durante 1 hora. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron los siguientes: anti-cabra (P0160, Dakocytomotion), anti-conejo (NA934, Amersham GE Healthcare) y anti-ratón (NA931, Amersham GE Healthcare). Posteriormente se lavó la membrana y se trató con sistema *ECL prime* (Amersham). 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).

16. Ensayos de secreción

Se realizaron experimentos de secreción de CgA-EGFP en placa. Las células HEK293 fueron cultivadas en placas de 6 pocillos, transfectadas y se realizó el experimento de secreción 24-48 h tras la transfección. Se realizaron 2 lavados con solución Krebs-HEPES: 140 mM de NaCl, 5,9 mM

de KCl, 1,2 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 10 mM de HEPES y 11 mM de glucosa a pH 7,4. Posteriormente se incubaron en esta solución (secreción basal) y luego con el ionóforo de Ca²⁺ A23187 (1 μM) (secreción estimulada) durante 10 min a 37°C.

Se recogió el medio de secreción y se centrifugó 900 g durante 5 min a 4°C para descartar en el pellet posibles células que se hubieran despegado durante el tratamiento. Las células de los pocillos fueron lisadas como se describe en el apartado 15.1. Las proteínas del medio de secreción y de los lisados se precipitaron utilizando ácido tricloracético al 10% y fueron analizadas usando Western Blot.

17. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y detección electroquímica de catecolaminas.

17.1. Obtención de las muestras

Se realizaron experimentos de acumulación de L-DOPA y serotonina en HEK 293 expresando CgA-EGFP, y de dopamina en PC12. Se incubaron células control y células expresando CgA-EGFP con 100 μM de L-DOPA o serotonina durante 1 hora a 37°C. Se realizó un lavado con Krebs-HEPES de las células durante 15 min a 37°C y posteriormente se realizaron dos lavados más con Krebs-HEPES. A continuación las células fueron lisadas utilizando 200 μL 0,05N de ácido perclórico (PCA) conteniendo 200 nM de 3,4-dihidroxibencilamina (DHBA). Las muestras son congeladas a -80°C.

Posteriormente las muestras son descongeladas y se centrifugan a 10.000 g durante 20 min a 4°C en una centrífuga refrigerada (Sigma 2k15) de rotor de ángulo fijo (Sigma nº 12145). Se recoge el sobrenadante que contendrá la L-DOPA o la serotonina acumulados en las células y que se utilizará para el análisis en el HPLC. Luego se guarda el precipitado que se utilizará para medir proteínas y poder estandarizar la medida de catecolaminas. El precipitado se resuspende en TENT 1% y se realiza una precipitación de proteínas con acetona para evitar la posible contaminación

de catecolaminas que quede en el pellet. La medida de proteínas se realizó con el método del ácido bicinconínico.

Al sobrenadante (que contendrá las catecolaminas contenidas en las células) se le añade el estándar interno 3-4 dihidroxibencilamina (DHBA) a una concentración final de 200 nM .

17.2. Equipo cromatográfico (HPLC en fase reversa)

Para la cromatografía se utiliza una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar. Una fase estacionaria común es la sílice tratada con RMe_2SiCl , donde la R es una cadena, como $\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ o C_8H_{17} . La separación se basa en interacciones hidrofóbicas, que dan lugar a fuerzas de repulsión entre la fase móvil polar, la fase estacionaria no polar, y las sustancias a separar. De este modo, se debe tener en cuenta el tamaño de las sustancias a separar y la fuerza del solvente; la adición de sales a la fase móvil y la longitud de las cadenas de la fase estacionaria (*Kissinger et al., 1977*). Con lo que dependiendo de las características de cada molécula ésta tendrá un tiempo de elución distinto, lo cual nos permitirá separar diferentes moléculas, en nuestro caso catecolaminas.

Las muestras (50 μL) se inyectaron por medio de un inyector automático (modelo SIL-6B, Shimadzu) y se separaron en un cromatógrafo (modelo 625LC, Waters) a un flujo de 1 mL/min empleando una columna (Tracer Analítica, Teknokroma) 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 ; 0,0037 g de EDTA; 1 g de heptasulfonato sódico. El pH se ajustó a 3,1 con ácido fosfórico. Se añadió metanol en cantidad suficiente para acercar los picos al frente de diluyente; la concentración final del metanol varió ente el 1 y el 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*).

17.3. Detección electroquímica

Una sustancia es electroquímicamente “activa” si al aplicar un potencial igual o mayor que su potencial redox es capaz de oxidarse (perder electrones) o reducirse (ganar electrones). Esta transferencia de electrones genera una corriente eléctrica que es detectable por medio de un electrodo. En nuestro caso detectamos la corriente de oxidación de las catecolaminas, así como de la L-DOPA y la serotonina. Las catecolaminas poseen dos residuos en el anillo catecol que son fácilmente oxidables, dando lugar a la liberación de 2 protones y 2 electrones por cada molécula oxidada (fig 15). Para ello aplicamos un voltaje constante de +650mV 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). Para la serotonina aplicamos un voltaje de +800 mV ya que su potencial redox es mayor.

La detección electroquímica se llevó a cabo a +650 mV en un detector electroquímico (modelo LC-4B, Bioanalytical Sciences) y el registro se digitalizó a una frecuencia de 1 Hz empleando un programa de adquisición desarrollado en nuestro laboratorio por el Dr. Yezer González Morales

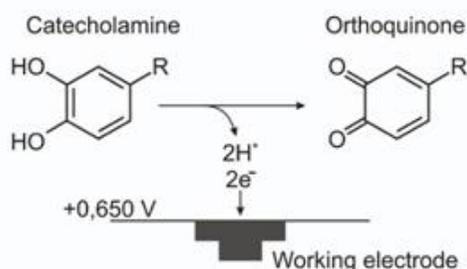


Figura 15: Reacción de oxidación de las catecolaminas ante un potencial de + 650mV

17.4. Análisis de los datos cromatográficos

Para el análisis de los picos cromatográficos de L-DOPA, DA y serotonina se utiliza el estándar interno 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 (L-DOPA, serotonina, DHBA) de concentración (200 nM). Una vez obtenida el área bajo la curva de cada pico se normaliza por el DHBA obteniendo así el factor de corrección de cada molécula. 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 L-DOPA o serotonina en este caso.

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

donde,

área CA, es el área bajo la curva de cada una de las CA; **FC**, es el factor de corrección para cada CA; **[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 bicinónico) y así se pueden comparar las diferentes condiciones experimentales. Las comparaciones se realizaron con la prueba *U* de Mann-Whitney.

18. Amperometría

18.1. Introducción

La amperometría es una técnica electroquímica de detección de sustancias electroquímicamente “activas” en solución, en la que se aplica una diferencia de potencial constante y se mide la corriente de oxidación de dichas moléculas.

18.2. Detección amperométrica de la exocitosis.

El principio de detección electroquímica es el mismo que se describió en el apartado 9.3 de la detección electroquímica en el HPLC. Es decir, detectamos las corrientes de oxidación de las catecolaminas cuando aplicamos un voltaje de +650 mV. En la técnica amperométrica utilizamos microelectrodos de fibra de carbono que se colocan en contacto directo con la membrana celular y permiten detectar las catecolaminas liberadas

por los gránulos secretores al hacer exocitosis, ya que dichas catecolaminas son oxidadas en el entorno del electrodo y éste detecta la corriente generada.

Una de las ventajas de las medidas electroquímicas es que se puede estimar el número de moléculas que han llegado al electrodo y se han oxidado o reducido, siempre que estemos estudiando un solo tipo de molécula electroquímicamente activa, y si el número de electrones transferidos en la oxidación es conocido (Chow and von Ruden, 1995). La relación entre la carga total de la reacción redox y el número de moléculas que han reaccionado se conoce como ley de Faraday:

$$Q = \int I dt = \frac{(zFM)}{N_A} = zeM$$

donde,

Q, representa la carga total implicada en la reacción *redox*, que se obtiene mediante la integración temporal de la corriente (*I*); **M**, representa el número de moléculas que han reaccionado; **z**, representa el número de moles de electrones transferidos por mol de compuesto que ha reaccionado; **F**, es la constante de Faraday (96.485 C/mol); **N_A**, es el número de Avogadro ($6,023 \times 10^{23}$) y **e**, representa la carga elemental ($1,602 \times 10^{-19}$ C).

18.3. *Elaboración de los electrodos de carbono y de pipetas para la administración de sustancias.*

18.3.1. 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, 2008). Con una bomba de vacío se aspira una fibra de carbono de 6 μ m de radio (Thornel P-55; Amoco Corp., Greenville, SC) en un capilar de borosilicato de 1,5 mm de diámetro externo, 1,12 mm de diámetro interno y 102 mm de largo (WPI ref# TWF150-4). 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 cuya punta supere un diámetro de 25 μm .

Para conseguir un sellado eléctrico adecuado la punta de los electrodos, se sumerge en una resina tipo epoxi Epo-Tek® 301 (Epoxy Technology, USA). 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 son introducidos en el horno a 150 °C y se dejan hasta el día siguiente con lo que la resina quedará totalmente endurecida.

Para conseguir un microelectrodo de superficie activa uniforme se pulen con un ángulo de 45° en una pulidora de diamante negro (Modelo EG-40, Narishige) utilizando 2-propanol como lubricante. El 2-propanol además contribuye a eliminar suciedad y mejora la ultraestructura en malla del carbono (fig. 16).

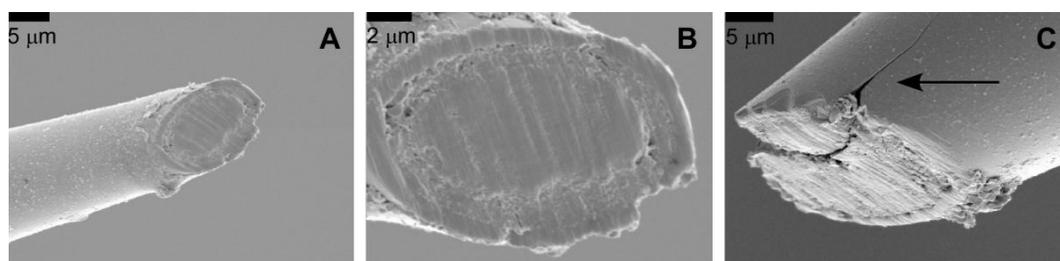


Figura 16: Apariencia de un microelectrodo de carbono ya pulido, imagen tomada mediante microscopía electrónica de barrido. A y B, vista a distinto aumento del electrodo. C, grieta en otro electrodo imperceptible bajo el microscopio. Tomado de Machado et al. (2008) (Machado, 2008).

Estos electrodos de fibra de carbono tienen la capacidad de conducir la corriente eléctrica generada por la oxidación de las catecolaminas, además de poseer propiedades estables, como las tienen el platino o el oro, también utilizados como detectores (Chow and von Ruden, 1995).

18.3.2. Calibración.

Se debe comprobar el estado de la superficie activa de los electrodos, calibrándolos antes y después de cada experimento. Con ello, se asegura que la sensibilidad del electrodo sea adecuada y que las respuestas sean reproducibles y rápidas. Además la relación señal/ruido debe ser aceptable

(el nivel de ruido debe ser menor a 3 pA) y la corriente basal estable y menor de 15 pA.

Para la calibración se utilizó un sistema de perfusión continua que permite exponer al electrodo, de forma rápida a las catecolaminas. Se utilizó noradrenalina a una concentración de 50 μ M disuelta en Krebs-HEPES (la misma solución que utilizaremos en el experimento). El electrodo se rellena con una solución de KCl 3 M. Como electrodo de referencia se utiliza un electrodo de microagregados de Ag/AgCl (WPI #Ref EP2). El electrodo se sujeta con un portaelectrodo que posee un alambre de Ag cubierto de AgCl y que permite la conexión eléctrica con la fibra de carbono. El portaelectrodo con el electrodo se conecta a un preamplificador que a su vez está conectado a potenciostato (EI400, Ensmann Instrumentation, Bloomington, IN).

La adquisición se realiza a través de una tarjeta, NI USB-6009 de 14 bits (National Instruments. Austin, TEXAS, USA). La señal fue mostrada en un osciloscopio digital integrado en un software diseñado por Yézer González Morales en nuestro laboratorio, mediante el cual se cuantificó la señal.

Un electrodo se considera óptimo si la corriente basal es pequeña (menor a 10 pA) y estable, si la respuesta a pulsos, de una concentración dada de noradrenalina, es rápida y constante y si la corriente máxima, cuando se detiene flujo, está entorno a 150 pA para un electrodo de 6 μ m de radio (fig. 17).

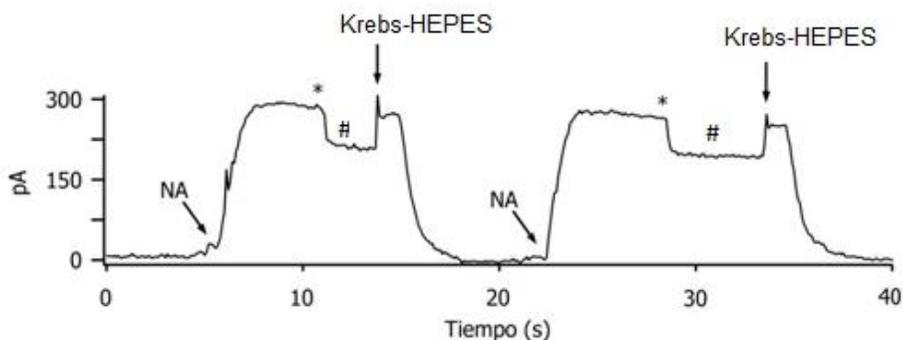


Figura 17: Calibración de un electrodo en el sistema de perfusión con noradrenalina (NA) 50 μM . En el registro se pueden apreciar 2 pulsos de NA, cada uno de ellos con dos alturas de corriente. La altura mayor (*) corresponde a un estado de flujo continuo y la segunda altura (#) a un estado de parada 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 aplicó 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.

18.3.3. Fabricación de pipetas para la administración de sustancias.

El uso de micropipetas para la aplicación de sustancias permite controlar mejor el tiempo de aplicación y la distancia a la célula que los clásicos sistemas de perfusión. Para su construcción se escinde un capilar de borosilicato (WPI ref# TW150F-4) en un proceso de dos pasos en un estirador de pipetas (PC-10, Narishige). De esta manera conseguimos dos micropipetas, cada una de ellas con una punta de un diámetro aproximado de 2-6 μm . Con estas micropipetas se aplicó el estímulo secretagogo de 5 mM de BaCl_2 , durante 5 s.

18.4. Equipo electrofisiológico y procedimiento de registro de señales amperométricas

Los registros amperométricos se llevaron a cabo, en el interior de una jaula de Faraday conectada a una toma de tierra para aislar el sistema de las interferencias electromagnéticas. Se utilizó un amplificador VA-10X (npi). El electrodo de trabajo -microelectrodo- se colocó en el portaelectrodo del preamplificador y se montó sobre un micromanipulador mecánico (DC-3K, Märzhäuser Wetzlar) unido a la pletina de un microscopio invertido. En el otro lado de la pletina se colocó otro micromanipulador para colocar la micropipeta para aplicar sustancias por presión positiva. Este sistema de inyección por presión, fabricado en nuestro laboratorio, está regulado por electroválvulas que pueden ser controladas manualmente o por ordenador. Las micropipetas se rellenaron con el secretagogo (5 mM BaCl_2) y se situaron a aproximadamente 40 μm de la célula. La liberación de estas sustancias se lleva cabo mediante aplicación de presión positiva.

Las células expresando CgA-EGFP se observaron utilizando epi-fluorescencia con un microscopio invertido (Olympus IX51) a través de un objetivo 40x (40X/0.60, Olympus) acoplado a una lámpara de mercurio (X-cite EXFO series, 120W) y usando un filtro de paso banda (BP470-490) para excitar EGFP. El microscopio está colocado sobre una mesa antivibratoria (TMC, Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA, USA).

Las células se colocaron en una cámara con solución Krebs-HEPES que tiene incorporado un electrodo de microagregados de plata (Ag/AgCl) (WPI #Ref EP2) que actúa como electrodo de referencia. Además la cámara tiene un sistema interno de recirculación de agua que permitió termostatizarla con un baño a 37°C. Entre los dos electrodos se ajustó el potencial de oxidación a +650 mV.

La frecuencia de muestreo fue de 10 KHz y se utilizó un filtro de 2 KHz. La ganancia utilizada fue 10 mV/pA. El amplificador está conectado a un PowerLab (8/30) que permite la digitalización de los registros y esta señal se envía al ordenador. El programa utilizado para la adquisición fue el LabChart7 proporcionado por ADInstruments con el PowerLab. Los registros fueron de 4 min.

Los experimentos de sobrecarga de CA en el citosol se realizaron incubando las células en cultivo con 100 µM de L-DOPA en el medio de cultivo 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, por lo que provoca un rápido incremento de CA en el citosol.

18.5. Análisis de los datos amperométricos.

El análisis de datos amperométricos se llevó a cabo usando ficheros con formato binario de IGOR-Pro (Wavemetrics, Oregon) 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 potencióstato; 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 (ver análisis estadístico apartado 18.5.3).

18.5.1. Parámetros cinéticos de las espigas.

En la figura 18A se puede ver un 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). En la siguiente imagen ampliada (fig. 18B), se puede ver una de las espigas amperométricas y los parámetros que caracterizan su morfología y cinética. En algunos casos se puede apreciar lo que se conoce como “pie”, que es una pequeña deflexión que antecede a la fusión completa de la membrana de la vesícula con la membrana celular (Chow et al., 1992), que puede ser apreciada con claridad en los registros en un 30-40% de las espigas de secreción.

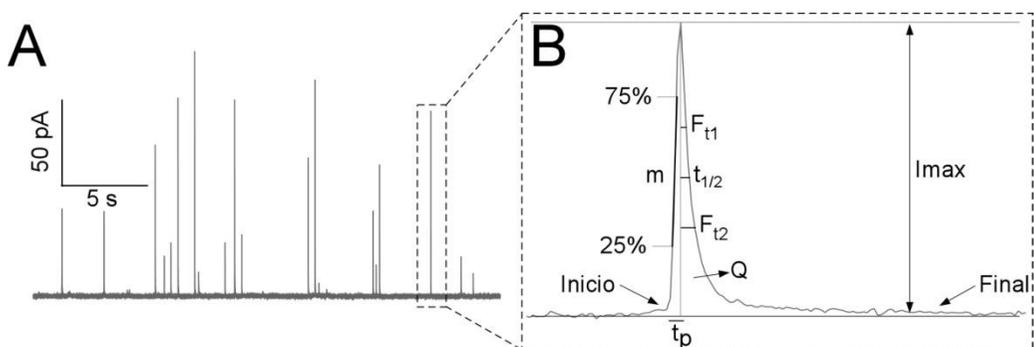


Figura 18: Registro amperométrico. A, fragmento de un registro amperométrico típico. B, ampliación de una de las deflexiones o espigas del registro, y los parámetros que caracterizan su morfología y cinética (explicación en el texto).

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.

I_{max}, 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 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.

Ft₁, tiempo transcurrido hasta que la señal se ha reducido hasta el 63,2% ($1-1/e$) del valor de amplitud máxima (I_{max}), expresado en ms.

Ft₂, tiempo transcurrido hasta que la señal se ha reducido hasta el 36,8% ($1/e$) del valor de amplitud máxima (I_{max}), 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.

18.5.2. 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. Dado que una vez aceptada una espiga sus datos pasarán a las hojas de cálculo, 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, 2008).
- Que tengan un valor de I_{max} 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.

18.5.3. Análisis estadístico de las señales amperométricas.

Los datos se han obtenido de experimentos realizados en el mismo día, con células del mismo cultivo y registrados con el mismo electrodo.

El análisis estadístico utilizado para los parámetros cinéticos es el test de U de Mann-Whitney. Este es un test no paramétrico y tiene como condición que ambas muestras sean independientes y que estén tomados de forma aleatoria. La prueba calcula el llamado estadístico U, cuya distribución para muestras con más de 20 observaciones se aproxima bastante bien a la distribución normal. Se ha utilizado un test no paramétrico ya que los parámetros cinéticos no presentan una distribución normal, sino asimétrica. En el caso de los datos de I_{max} vs Q el test utilizado fue el U de Mann-Whitney con la corrección de Bonferroni.

19. TIRFM o microscopía de onda evanescente.

19.1. Introducción

La microscopía de TIRFM (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy), o también microscopía de onda evanescente, es una técnica de microscopía de fluorescencia que permite excitar selectivamente fluoróforos en soluciones acuosas o en células localizados a una distancia inferior a 200 nm desde una superficie sólida sin excitar a aquellas

estructuras que están a una distancia mayor. (Axelrod, 1981; Steyer and Almers, 2001). Esta técnica ha posibilitado el estudio dinámico en células vivas de multitud de procesos localizados en las inmediaciones de la membrana plasmática, ya que permite visualizar selectivamente, las regiones de la célula en contacto con el sustrato. Esto es muy interesante en el nuestro campo ya que podemos estudiar el movimiento de los gránulos secretores en la proximidad de la membrana así como la exocitosis y la endocitosis.

19.2. Conceptos teóricos del TIRFM.

La ley de Snell permite calcular el ángulo de refracción de un haz de luz cuando éste atraviesa la interfaz de dos medios con índice de refracción distinto, y viene dada por la siguiente ecuación:

$$n_1 \operatorname{sen}\theta_1 = n_2 \operatorname{sen}\theta_2$$

donde,

n_1 y n_2 , representan los índices de refracción de los medios 1 y 2; $\operatorname{sen}\theta_1$, es el seno del ángulo del haz incidente medido desde la normal; $\operatorname{sen}\theta_2$ es el seno del ángulo del haz refractado medido desde la normal.

Cuando la luz se propaga a través de un medio índice de refracción n_1 (vidrio del cubreobjetos) mayor que el índice de refracción n_2 (de la solución acuosa) y además el ángulo de incidencia es mayor al ángulo crítico, se produce la reflexión interna total (TIR).

Este ángulo crítico viene dado por la ecuación:

$$\theta_c = \operatorname{sen}^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right) = \operatorname{sen}^{-1}n$$

donde,

n_1 y n_2 , representan los índices de refracción de los medios sólido y líquido respectivamente y el ratio $n = \left(\frac{n_2}{n_1}\right)$ debe ser < 1 para que la TIR ocurra.

Para ángulos de incidencia $\Theta < \Theta_c$, la mayoría de la luz se propaga a través de la interfase con un ángulo de refracción dado por la ley de Snell. En cambio para ángulos de incidencia $\Theta > \Theta_c$, toda la luz se refleja.

Sin embargo para el caso de la TIR, algo de la energía incidente penetra a través de la interfase y se propaga paralelamente a la superficie del plano de incidencia. Este campo generado se conoce como onda o campo evanescente, y es capaz de excitar a moléculas fluorescentes que estén próximas a la superficie. La onda de la energía se llama evanescente debido a que para un haz de luz infinita, la intensidad de la onda decae exponencialmente perpendicularmente con la distancia z desde la interface.

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

donde,

$I(0)$ e $I(z)$, son las intensidades de la onda evanescente medidas como unidades de energía/área/s en la interfase (0) y en la distancia z respectivamente, z , es la distancia a la interface y d es la profundidad del campo evanescente definido por:

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi\sqrt{n_1^2 \sin^2\theta - n_2^2}}$$

donde,

λ_0 , es la longitud de onda de la luz incidente en vacío y d es la profundidad del campo evanescente. La profundidad d es independiente de la polarización de la luz y decrece a medida que Θ aumenta. Salvo cuando $\Theta \rightarrow \Theta_c$, donde $d \rightarrow \infty$, d está en el orden de λ_0 o menor.

La profundidad típica del campo evanescente en nuestras condiciones experimentales está en torno a los 100-200nm. Por ello solamente las moléculas fluorescentes que estén dentro de dicho campo serán visibles.

19.3. Equipo TIRFM y adquisición de imágenes

El equipo TIRFM utilizado consta de un microscopio invertido Zeiss 200M (Jena, Alemania). Las imágenes se tomaron a través de un objetivo 100X (NA 1,45, α Fluar Zeiss) con aceite de inmersión ($n_{\lambda 488} = 1,518$ Zeiss) y en contacto con el cubreobjetos donde estarán las células "in vivo" en Krebs-HEPES. Además el objetivo está termostatzado a 37°C. El haz del láser de argón (LASOS Lasertechnik, Jena, Alemania) pasa por un filtro paso banda D488/10 y la luz de excitación se dirigió al objetivo a través de un dicróico (510nm), además controlamos el ángulo de incidencia de la luz para poder alcanzar la situación de TIR, usamos un ángulo de 64-66° respecto a la normal. Así se iluminan las estructuras que contienen CgA-EGFP en una profundidad de entre 150-200nm.

La luz de emisión se filtró con un filtro de paso banda HP525/50. Todos los filtros fueron de Chroma Technology (Brattleboro, VT). Las imágenes se proyectaron en una cámara EM-CCD digital (C9100-13, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japón). La adquisición de las imágenes se realizó con el programa HC Image (Hamamatsu Photonics) a 10 Hz con exposiciones de 0,1 s y durante 1 min.

El microscopio está colocado sobre una mesa antivibratoria (TMC, Technical Manufacturing Corporation, Peabody, MA, USA).

19.4. Procesamiento y análisis de imágenes

Las imágenes fueron procesadas con el programa informático MetaMorph (Universal Imaging, Downington, PA, EE.UU.). Para caracterizar la exocitosis de CgA-EGFP la intensidad de fluorescencia en función del tiempo fue calculada usando dicho programa como ahora se detalla.

Las exocitosis se localizaron visualmente observando las películas. Se creó una región de interés de manera que el gránulo quedara centrado y se cortó la película con imágenes de 40 x 40 píxeles quedando el evento de exocitosis en el centro. Se creó una circunferencia de 1,38 μm de diámetro alrededor del gránulo y se calculó la fluorescencia media en cada imagen de la película. La señal de fondo se calculó en un anillo concéntrico

de 5,53 μm diámetro y fue restada a la señal de la primera circunferencia. La medida de la intensidad de cada evento se normalizó dividiendo la señal de cada imagen por la intensidad máxima. Se representó la intensidad de fluorescencia normalizada en función del tiempo y se calculó la media y el error estándar de todos los registros.

Para estudiar el movimiento en el plano x-y en la membrana plasmática de vesículas funcionales (que realizan exocitosis) realizamos un análisis de trayectoria (Barroso-Gonzalez et al., 2009; Camacho et al., 2008; Gaidarov et al., 1999). Analizamos durante los 5 s previos a la exocitosis solo aquellas vesículas que realizaron exocitosis. Se utilizó la macro de *tracking objects* del MetaMorph, se indicó la posición de cada gránulo y se siguió la posición x-y en función del tiempo. Cada posición x-y fue corregida por el valor de la mediana de todos los valores x e y para colocar el origen de la trayectoria en x,y= 0, 0. Usamos la distancia de la mediana (x-y) del conjunto de datos al punto más alejado para definir el radio de un círculo que englobaría a cada punto para calcular el máximo rango de una trayectoria determinada)

El tamaño de las vesículas marcadas con CgA-EGFP fue analizado utilizando una aproximación de “line scan”. Se trazó una línea de 16 píxeles de largo y 2 píxeles de ancho. Se midió la intensidad de fluorescencia a lo largo de dicha línea en la imagen anterior a la exocitosis y se representó el perfil de intensidad. Se ajustó dicho perfil a una función de Gauss:

$$y = y_0 + Ae^{-\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^2}$$

Donde,

y₀: valor de y en el punto inicial, A: altura de la distribución, x₀: media, w: varianza.

Nosotros hemos tomado el valor w como representativo del diámetro de cada gránulo.

Resultados

20. La expresión de CgA-EGFP en células HEK293 presenta un patrón vesicular.

Con el objetivo de estudiar si la CgA tiene un papel en la acumulación de catecolaminas en vesículas secretoras y en su exocitosis hemos clonado el cDNA de la CgA de ratón en un vector de expresión de la proteína EGFP de manera que se codifique la proteína quimérica CgA-EGFP. (ver apartado Dicho estudio se ha desarrollado en células HEK293 y células PC12, teniendo así un modelo de células sin vía de secreción regulada (HEK293) y un modelo neuroendocrino con vía de secreción regulada (PC12).

La expresión de la proteína CgA-EGFP en células HEK293 transfectadas con el vector pCgA-EGFP se comprobó mediante *Western Blot* utilizando los anticuerpos anti CgA (sc-1488, Santa Cruz Biotechnology) y anti GFP (sc-8334, Santa Cruz Biotechnology) (fig. 19 A). La proteína quimérica tiene un peso molecular aparente de ~100 kDa. La expresión de esta proteína en estas células se detectó como una única banda al peso molecular previsto y en ausencia de péptidos de procesamiento de la proteína CgA-EGFP. El porcentaje de transfección logrado en estas células fue aproximadamente de un 20-30%.

Para estudiar el patrón de expresión de la proteína quimérica CgA-EGFP utilizamos la microscopía TIRF (ver apartado 19) en células *in vivo*. Observamos que la distribución de la proteína tiene un patrón típicamente vesicular (fig. 19B). Con lo cual observamos que la CgA-EGFP es capaz de generar estructuras granulares de *novo* y que además su expresión está dirigida a compartimentos de tipo vesicular en las células HEK293.

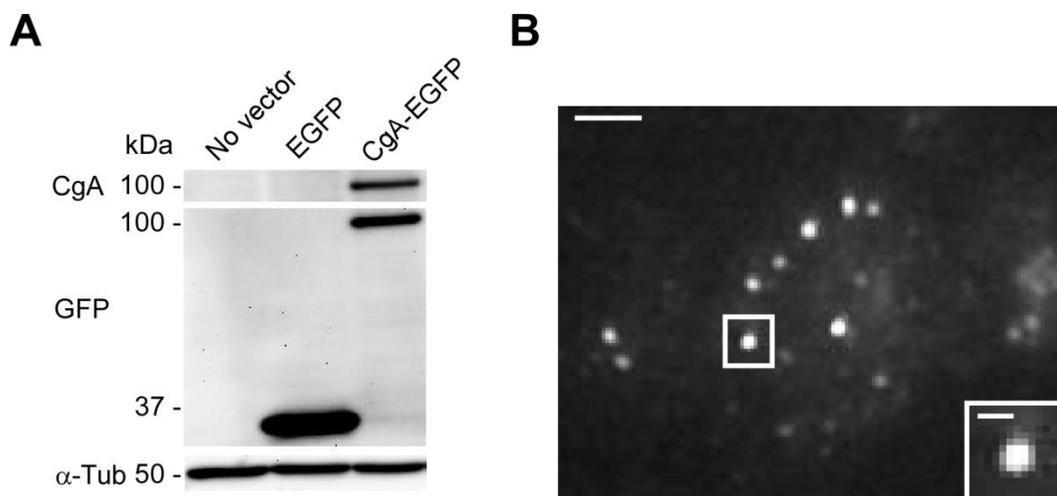


Figura 19: Expresión de la proteína CgA-EGFP en células HEK293. A, Western Blot de lisados de células HEK293 sin vector (carril 1), células transfectadas con pEGFP (carril 2) y células transfectadas con pCgA-EGFP. Se utilizó un anticuerpo anti-CgA, anti-GFP y se utilizó la α -Tubulina como control de carga. Se muestra un ejemplo de 3 experimentos independientes. B, Imagen de TIRFM que muestra la expresión de la proteína CgA-EGFP, (barra de escala 5 μ m). En el zoom se muestra una vesícula representativa, (barra de escala 1 μ m).

21. La entrada de Ca^{2+} extracelular aumenta la secreción de CgA-EGFP en células HEK293

Para poder estudiar la dependencia del Ca^{2+} en la liberación de CgA-EGFP en las células HEK293 hemos incubado el ionóforo de calcio A23187 a una concentración de 1 μ M durante 10 min a 37°C.

Con esta estrategia hemos cuantificado por medio de Western Blot la cantidad de CgA-EGFP liberada tanto en condiciones basales como en las condiciones de estímulo con A23187. La secreción relativa se expresó como el porcentaje del total de la proteína CgA-EGFP (lisado+secretado). (fig. 20). La secreción basal es de un 2% de media, mientras que la aplicación de A23187 provoca que la secreción sea de en torno a un 10%, con lo cual hay un incremento de 5 veces ante la aplicación del A23187 apuntando a una dependencia de Ca^{2+} en la liberación de la CgA-EGFP.

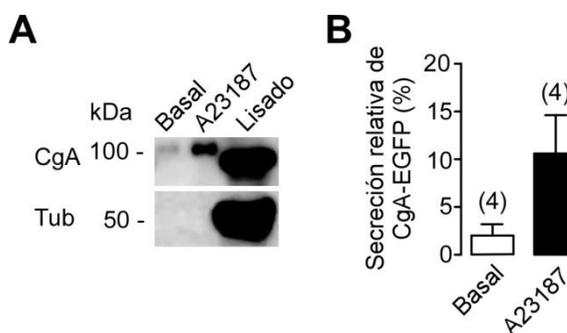


Figura 20: Liberación Ca^{2+} -dependiente de CgA-EGFP. A, Ejemplo representativo de análisis por medio de Western Blot de células HEK293 expresando la proteína CgA-EGFP tratadas o no con $1\mu\text{M}$ A23187 durante 10 min a 37°C . B, La liberación de CgA-EGFP se cuantificó como el porcentaje entre las intensidades de las bandas de la liberación al medio y del total de proteína (lisado+secretado). Los datos son la media \pm S.E.M., ($n=4$ experimentos diferentes, $p=0,04$, t-Student one-tailed)

22. La microscopía de onda evanescente permite la visualización de vesículas de CgA-EGFP con alta resolución en z y alta velocidad de adquisición

Uno de nuestros objetivos ha sido estudiar cómo es la exocitosis de la CgA-EGFP a nivel de “vesícula única”, esto nos lo ha permitido la técnica de TIRFM. En este tipo de microscopía se utiliza un haz de luz láser que con un ángulo de incidencia crítico produce reflexión interna total de la luz o TIR (fig. 21A). Esto genera una onda evanescente cuya intensidad decae de forma exponencial con la distancia z (fig. 21B). Esto permite excitar sólo aquellos fluoróforos que están muy cercanos a la membrana y el resto de la célula no es iluminado con lo cual se elimina la señal de fondo de planos que están fuera del plano focal (fig. 21C). En el caso de la configuración de nuestro microscopio de TIRF (microscopio invertido Zeiss 200M, objetivo 100X (NA 1,45, Fluar Zeiss) con aceite de inmersión ($n_{\lambda 488} = 1,518$ Zeiss) logramos una resolución en z de menos de 150 nm. De esta manera, podemos estudiar fenómenos que ocurren en el entorno de la membrana plasmática con alta resolución en z.

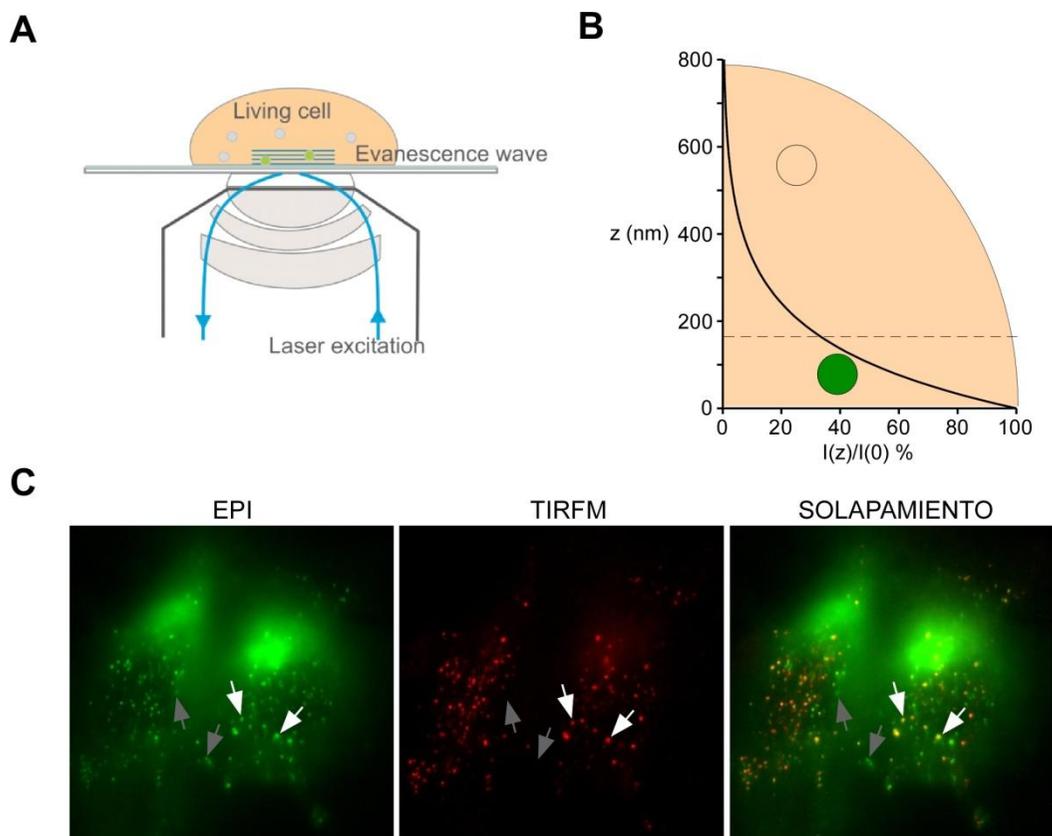


Figura 21: Microscopía de onda evanescente. A, Esquema ilustrativo de la configuración de TIRFM basado en el método del objetivo. B, Representación gráfica del modelo teórico de la intensidad relativa del campo evanescente ($I(z)/I(0)$ %) en función de la profundidad en el plano z (nm). Se representan dos estructuras subcelulares una fuera del campo evanescente (círculo sin relleno) y una dentro del campo evanescente (círculo con relleno). C, Imágenes adquiridas en epifluorescencia (EPI) en verde y en TIRFM en rojo de las mismas células. Las flechas grises señalan vesículas que se observaban en epifluorescencia pero no en TIRFM y las flechas blancas señalan vesículas que se observaron tanto en epifluorescencia como en TIRFM.

Gracias a que la adquisición es única en el plano, esta depende exclusivamente de la expresión del fluoróforo y de la sensibilidad de la cámara CCD. En nuestro caso podemos llegar a una resolución temporal que nos permite adquirir hasta 50 fotos por segundo (aunque en este trabajo se han utilizado frecuencias de adquisición de 10Hz).

Tanto la alta resolución en z como la capacidad de adquirir a alta velocidad nos permiten obtener información sobre el movimiento, el

tamaño aparente de las vesículas secretoras y la manera de hacer exocitosis del péptido marcado o fluoróforo. Para ello nos hemos basado en los trabajos de (Steyer and Almers, 1999; Steyer et al., 1997).

Hemos caracterizado solamente aquellas vesículas que han desembocado en la exocitosis de parte o del total de su contenido. En el momento de la fusión con la membrana de vesículas que contienen CgA-EGFP se produce un incremento abrupto la intensidad de la luz debido fundamentalmente a dos factores: el pH aumenta, desde aproximadamente 5,5 – 6 hasta 7,4 del medio extracelular lo que incrementa la absorción y la emisión de la proteína EGFP y porque el contenido (CgA-EGFP) de la vesícula se libera al espacio extracelular y difunde introduciéndose en el campo evanescente hacia la región donde su intensidad es máxima (fig 22C y 22D). A parte del incremento de la señal de luz, también se observa una dispersión de la señal lumínica en el plano XY. Esto se puede caracterizar analizando el perfil de luz de las vesículas a diferentes tiempos (fig 22C) y haciendo un ajuste gaussiano. De este ajuste obtendremos el valor w que será representativo del tamaño de la vesícula.

$$y = y_0 + A e^{-\left(\frac{x-x_0}{w}\right)^2}$$

Donde,

y_0 : valor de y en el punto inicial, A : altura de la distribución, x_0 : media, w : varianza.

Si la vesícula se aproxima o se aleja este valor w no sufre variaciones significativas mientras que en el momento de la fusión se ve incrementado. En el ejemplo de la figura 21C el valor w en el fotograma número 307 es de 1,99 y en el número 337 es de 2,37, con lo que a parte del incremento en intensidad también aumenta el valor w .

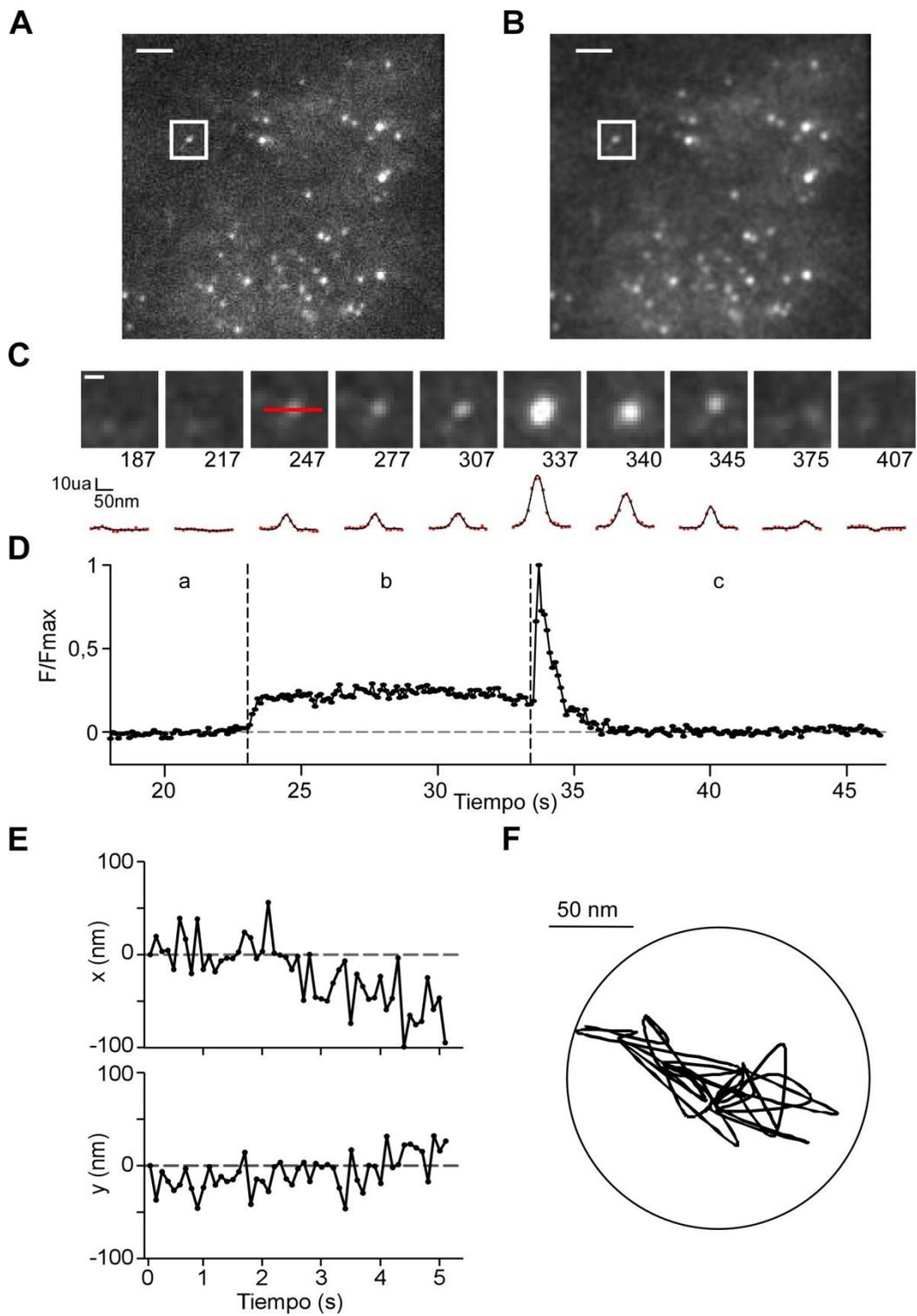


Figura 22: Ejemplo de seguimiento de una vesícula secretora por medio de TIRFM. A, Imagen de TIRFM una célula HEK293 expresando CgA-EGFP. Se trata del fotograma nº 307, en el cuadrado se señala la vesícula que va a ser analizada en los siguientes apartados. B, La imagen de A tras haber pasado por un filtro tipo smooth (software Image J) C, Serie de imágenes de la vesícula señalada en B (número de fotograma señalado bajo la imagen), en rojo se señala un ejemplo de línea para hacer el perfil de intensidad de la vesícula. Debajo de cada imagen se representa en rojo los valores de intensidad de luz en cada píxel del perfil de la vesícula y en negro el ajuste gaussiano correspondiente. D, Curso temporal de una vesícula de CgA-EGFP que no estaba en el campo evanescente en a, que entra al campo evanescente y se ancla a la membrana en b y que hace exocitosis liberando su contenido en c. F/Fmax valor de la señal de fluorescencia dividido por la fluorescencia máxima. E, Representación del movimiento de la vesícula en x e y en función del tiempo en los 5 s previos a la exocitosis. D, Representación del movimiento total de la vesícula en el plano xy en los 5 s previos a la exocitosis y cálculo de la circunferencia máxima de movimiento a partir de la cuál se calcula el radio máximo de la trayectoria.

Podemos distinguir tres etapas en la exocitosis por medio del TIRFM. Una etapa en la que la vesícula no está asociada a la membrana y por tanto no la observamos (fig 22D.a). La siguiente etapa consiste en el anclaje de la vesícula a la membrana o *docking* (fig 22D.b), a partir de que la vesícula entra dentro del campo evanescente (a menos de 150 nm) es posible detectarla y caracterizarla. Y por último ocurre la etapa de exocitosis (fig 22D.c) en la que la vesícula se fusiona con la membrana, se produce un incremento de la señal lumínica y una posterior caída de la misma debida a una dispersión del material en el medio extracelular.

En aquellas vesículas que hicieron exocitosis, que estaban presentes en la membrana al menos 5 s antes, que estuvieran lo suficientemente separadas de otras vesículas y que además tuvieran un tamaño en torno a la media, se realizó un seguimiento del movimiento. Para ello se utilizó la herramienta *tracking objects* del programa *MetaMorph*. Se detecta el centro de masa de la vesícula y se sigue su posición en XY durante 5 s. Podemos representar el movimiento en x o en y en función del tiempo (figura 22E) y/o representar la trayectoria total de la vesícula en el plano XY Con la herramienta *tracking objects* obtuvimos la posición XY de las vesículas en el intervalo de 5 s. Posteriormente calculamos la mediana de los datos en X y de los datos en Y y se la restamos a los datos originales, con lo cual logramos que todas las trayectorias de los diferentes vesículas partan de una posición x,y 0,0. Una vez hecho esto se calculó el radio máximo de movimiento de cada vesícula.

23. La CgA-EGFP es liberada por exocitosis en las células HEK293

La técnica de TIRFM nos ha permitido caracterizar con detalle cómo es el curso de liberación de la CgA-EGFP en las células HEK293. Llevando a cabo un estudio semicuantitativo de todos los eventos de exocitosis registrados con esta técnica hemos podido distinguir dos tipos de liberación de la proteína CgA-EGFP en células HEK293. Un tipo de liberación que definimos como parcial en el que no todo el contenido proteico es liberado y por tanto seguimos viendo parte de la señal a pesar de que aumente el tiempo desde la fusión (fig. 23A) y también observamos un tipo de liberación completa en el que todo el contenido es liberado. Es por eso, que dejamos de ver señal lumínica a medida que pasa el tiempo desde el momento de la exocitosis (fig. 23B). El 59% de las fusiones son parciales y el resto de las fusiones, el 41% son completas (fig 23C y D). Para hacer la clasificación en los dos tipos de liberación consideramos que se trataba de liberación completa cuando a los 5 s tras la exocitosis la señal llegaba a 0 (a la señal se le ha restado la señal de fondo) y considerábamos que se trataba de liberación parcial cuando a los 5 s tras la exocitosis la señal no había llegado a 0.

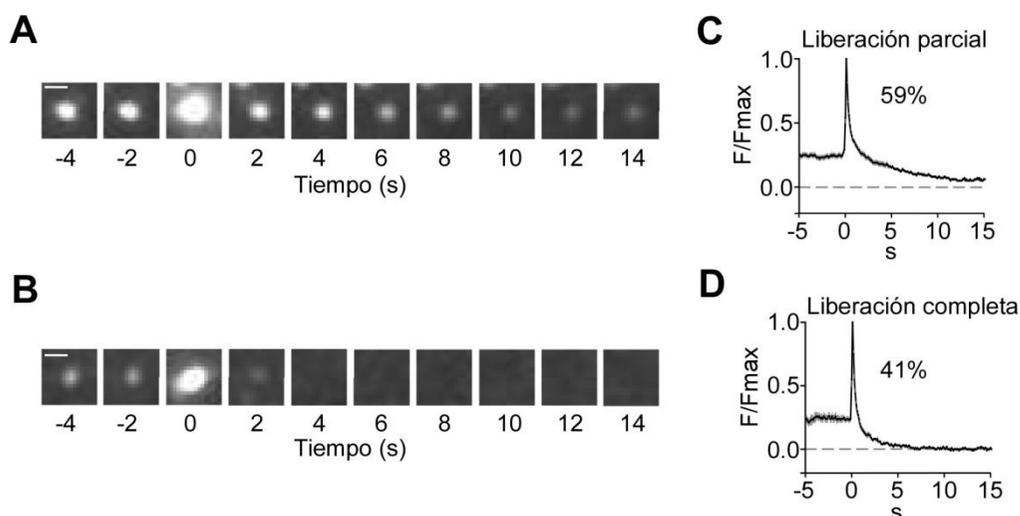


Figura 23: La exocitosis de CgA-EGFP registrada por TIRFM en células HEK293 muestra dos maneras características de liberación. A y B, imágenes secuenciales que muestran dos ejemplos de las dos maneras de liberación de la CgA-EGFP en estas células. Liberación parcial (A) y liberación completa (B). (Barra de escala 1 μm); C y D, trazos medios de la señal de

fluorescencia de los dos modos de liberación que se muestran en A y B. Se analizó un total de 70 exocitosis. Los trazos de cada grupo fueron normalizados a la señal máxima y se calculó la media.

Haciendo un ajuste de tipo exponencial de caída a la segunda parte de la señal de liberación de CgA-EGFP, hemos calculado el valor tau para las dos patrones de liberación. La liberación parcial es más lenta y tiene una tau de caída mayor (1,3 s) y la liberación completa es más rápida y tiene una tau de caída menor (0,5 s).

Además también podemos distinguir dos tipos de comportamiento de los gránulos en los segundos previos a la exocitosis. El 90% de los gránulos que hicieron exocitosis estaban en el campo evanescente al menos 5 s antes de la exocitosis. Sin embargo el 10% no se detectaban en esos 5 s antes de la exocitosis. Esto podría implicar vesículas que de repente llegaron al campo evanescente e hicieron exocitosis sin haber realizado un *docking* estable.

En conclusión, la CgA-EGFP es liberada por las células HEK293 por exocitosis que podemos caracterizar. Además aparecen dos tipos de eventos exocitóticos, liberación parcial y completa. Y la mayoría de las vesículas que hicieron exocitosis (90%) estaban ancladas a la membrana antes de que ocurriera la liberación.

24. Tamaño y movimiento de las vesículas de CgA-EGFP en células HEK293

Con la intención de caracterizar cualitativamente las vesículas de CgA-EGFP expresadas en células HEK293 se analizó el tamaño aparente y el movimiento previo a la exocitosis. Las imágenes de TIRFM muestran que la mayoría de los gránulos de CgA-EGFP unidos a la membrana son muy parecidos en tamaño. El diámetro aparente de cada gránulo fluorescente de CgA-EGFP se calculó 0,1 s antes a la exocitosis (fotograma anterior al de la exocitosis). Para ello se realizó un ajuste gaussiano al perfil lumínico de la vesícula (fig. 24A).

El tamaño aparente de las vesículas de CgA-EGFP en las células HEK293 es de 302 ± 12 nm (media \pm error estándar), con un rango que va de valores mínimos de 150 nm a valores máximos de 750 nm, aunque el 80% de las vesículas se encuentran en el rango de 200 - 400 nm (fig 5B).

Para determinar las trayectorias seguidas por los gránulos antes de la exocitosis, se hizo el seguimiento de 56 vesículas de células HEK293. Las vesículas se siguieron durante 5 s antes de la exocitosis. Se obtuvo la trayectoria total y se calculó el radio máximo del área de movimiento (fig. 24C). La media del radio máximo de movimiento fue de 381 ± 50 nm, (fig. 24D). Aunque algunos eventos llegaron a realizar movimientos largos de hasta 1600 nm de diámetro, el 70 % de las vesículas secretoras tenían un radio de movimiento menor a 400 nm. Con lo cual podemos concluir que esas vesículas se encontraban ancladas a la membrana 5 s antes de hacer exocitosis y prácticamente no se movían en el eje XY.

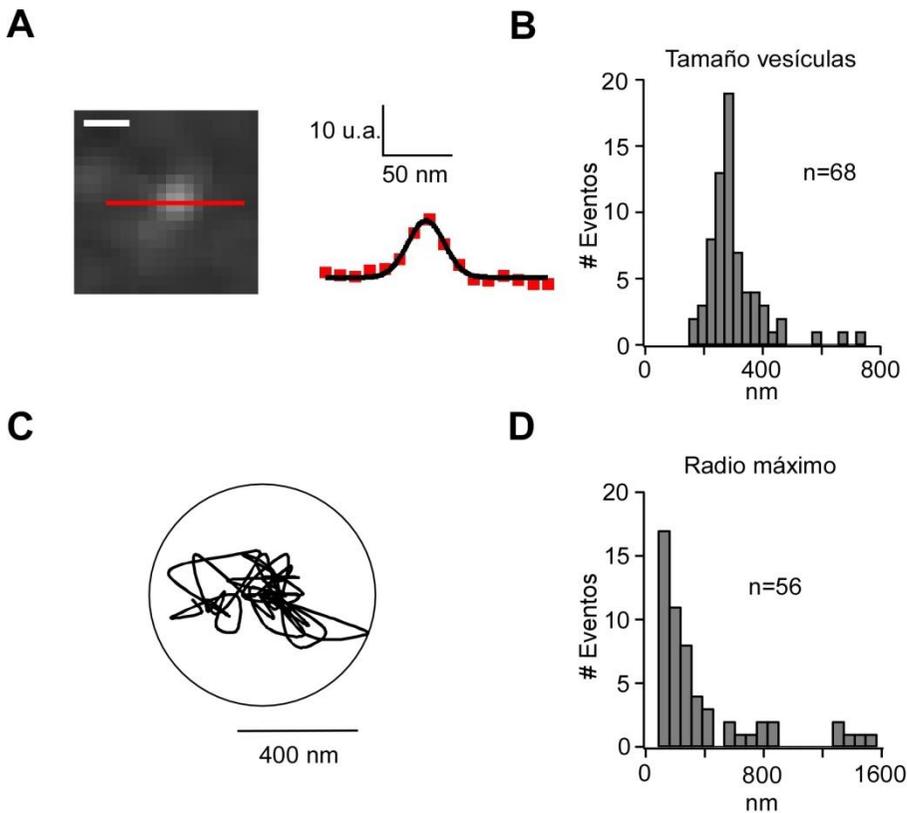


Figura 24: Características de las vesículas secretoras que contienen CgA-EGFP. A, Ejemplo de cuantificación del tamaño de una vesícula de CgA-EGFP realizando un análisis de la intensidad lumínica en la línea en rojo y posterior ajuste a una función gaussiana (en negro). B, Histograma de frecuencia del tamaño aparente de las vesículas. C, Ejemplo de trayectoria seguida por una vesícula los 5s antes de la exocitosis. D, Histograma de frecuencia del radio máximo de la trayectoria de las vesículas.

25. Las células HEK293 que expresan CgA-EGFP acumulan más L-DOPA o serotonina que las células control

La primera aproximación para estudiar la capacidad de la CgA-EGFP para acumular catecolaminas fue incubar durante 60 min con 100 μM de L-DOPA o serotonina las células HEK293 expresando dicha proteína. Posteriormente, las células fueron lavadas con solución de Locke y fueron lisadas con 0,05N de PCA con 200nM de DHBA que será el estándar interno. Las muestras se centrifugaron para descartar restos celulares y los sobrenadantes fueron inyectados en el HPLC para analizar la cantidad de L-DOPA o serotonina acumulada por las células.

En la figura 25A se presentan 3 cromatogramas que de arriba abajo corresponden a: un ejemplo de una mezcla conocida de estándares (L-DOPA, DHBA y DA) a una concentración de 200nM; un ejemplo de una muestra proveniente de células control (no transfectadas); y un ejemplo de una muestra de células que expresan CgA-EGFP. En la figura 25B se representa la cuantificación de la cantidad de L-DOPA o de serotonina acumulada por las células estandarizada por la cantidad de proteína de cada muestra.

Las células que expresan CgA-EGFP son capaces de acumular 2,6 veces más cantidad de L-DOPA que las células control. En el caso de la serotonina, las células que expresan la proteína quimérica acumulan 2 veces más serotonina que las control.

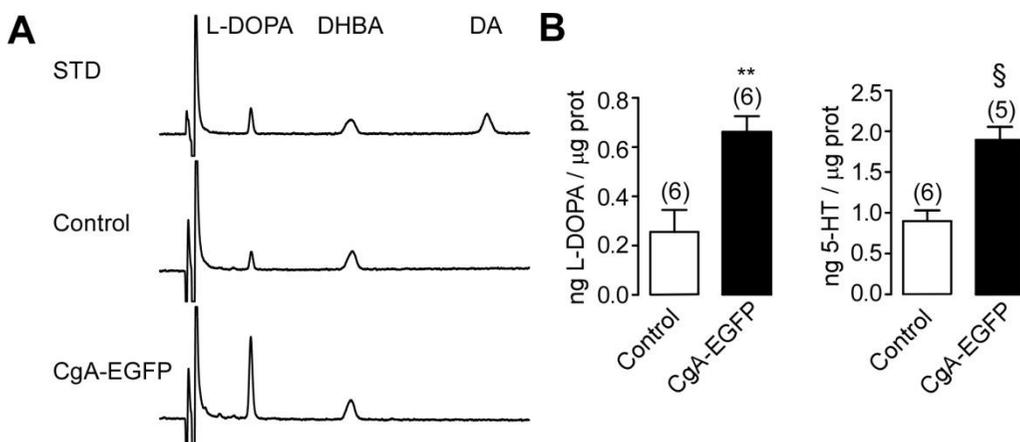


Figura 25: La acumulación de L-DOPA y serotonina es mayor en células que expresan CgA-EGFP. A, Ejemplos de cromatogramas de HPLC. STD: mezcla de los estándares L-DOPA, DHBA y DA a una concentración de 200nM; Control: ejemplo de muestra de células control; CgA-EGFP: ejemplo de células que expresan CgA-EGFP. B, Cuantificación de la cantidad de L-DOPA por proteína (ng L-DOPA / μg proteína), las barras representan la media \pm el error estándar.

Sin embargo, la incubación de las células con otras catecolaminas como la NA o la A no muestra diferencias en la acumulación entre las células control y las que están expresando CgA-EGFP. Consideramos que esto podría estar debido a una mayor dificultad por parte de la NA y la A de difundir a través de las membranas celulares, mientras que la L-DOPA podría difundir con algo más de facilidad. Hay que tener en cuenta que en estas células no existen transportadores de monoaminas con lo cual la entrada de las catecolaminas dependería de su liposolubilidad.

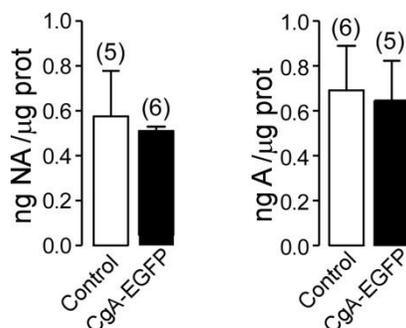


Figura 26: La acumulación de NA y A no es significativamente diferente entre células que expresan CgA-EGFP y células control. Cuantificación de la cantidad de NA y A por proteína (ng CA / μg proteína), las barras representan la media \pm el error estándar.

De estos resultados concluimos que la CgA-EGFP tiene la capacidad de permitir la acumulación de L-DOPA y serotonina en células carentes de la vía de secreción regulada y de todos los mecanismos para la síntesis y acumulación de transmisores y/o hormonas.

26. La cinética de acumulación de L-DOPA en células HEK293 que expresan CgA-EGFP es más rápida que en las células control

Además de estudiar si la acumulación de L-DOPA en células HEK293 que expresan CgA-EGFP es mayor que en las células control a un tiempo determinado, hemos estudiado cómo es la cinética temporal de acumulación. Para ello se han hecho incubaciones a diferentes tiempos

con 100 mM de L-DOPA y se han analizado las muestras por HPLC de la misma manera que se ha citado con anterioridad.

La cinética de acumulación de las células que están expresando CgA-EGFP es más rápida. Es decir, no sólo la cantidad total de L-DOPA es significativamente mayor en las que expresan CgA-EGFP a partir de los 60 min de incubación, sino que además la pendiente de la acumulación es mayor que en los controles (fig. 27).

Al hacer un ajuste lineal de ambas cinéticas de acumulación obtenemos que la pendiente de acumulación de las células que expresan CgA-EGFP es 2,3 veces mayor que las control. Por lo tanto si consideramos que el proceso de entrada de la L-DOPA a las vesículas es por difusión y que en principio no cambiaría en ambas condiciones experimentales, es la presencia de la CgA-EGFP la que permite un mayor almacenamiento de L-DOPA y además se logra más velocidad.

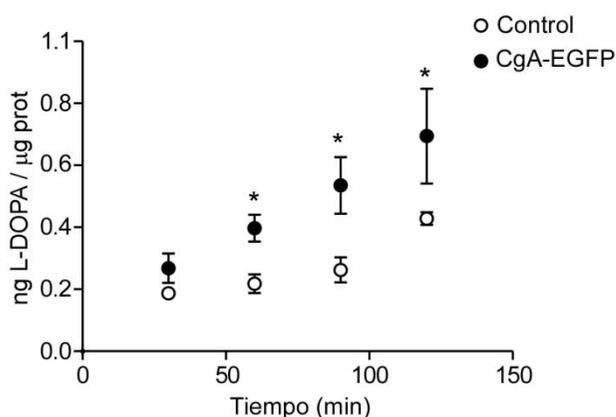


Figura 27: La cinética de acumulación de la L-DOPA es más rápida en las células que expresan CgA-EGFP. Se representa la cantidad de ng L-DOPA/µg de proteína acumulada en las dos condiciones experimentales y en diferentes tiempos (n=5, *p≤0,05, UMW).

27. Análisis del ruido eléctrico en el equipo electrofisiológico de amperometría

Hasta aquí hemos observado que la expresión de CgA-EGFP en las células HEK293 tiene un patrón vesicular, que dichas vesículas son capaces de hacer exocitosis y liberar su contenido proteico, que la capacidad de acumulación de L-DOPA o serotonina se ve incrementada

por la expresión de CgA-EGFP. Estos resultados apuntaban a que esas vesículas generadas por la CgA-EGFP eran capaces de acumular catecolaminas. Para poder verificar esta hipótesis decidimos realizar experimentos de amperometría en dichas células incubadas con L-DOPA.

Ya que era de esperar que las espigas amperométricas fueran pequeñas al tratarse de células que no poseen la maquinaria para la síntesis y acumulación de catecolaminas, previamente analizamos el ruido eléctrico en el equipo electrofisiológico de amperometría y nos planteamos cuál sería el límite mínimo de detección.

Para aislar del ruido eléctrico los registros amperométricos se realizaron dentro de una jaula de Faraday conectada a tierra. Además utilizamos corriente estabilizada que está independizada del resto de la corriente del laboratorio, esto permite evitar las posibles variaciones de la tensión eléctrica y la entrada de ruidos eléctricos provenientes de otros aparatos a nuestro sistema. Una vez tomadas todas las precauciones para evitar los ruidos electromagnéticos pasamos a medir el ruido real de nuestro sistema. En nuestros registros los ruidos estaban en torno a 1 pA. Hay que considerar que la amplitud del ruido también depende del electrodo que estemos utilizando, hay electrodos que estarán mejor aislados y serán menos ruidosos que otros.

Para hacer un análisis de frecuencias del ruido del sistema hemos calculado la primera derivada de un trozo de registro amperométrico sin espigas (fig. 27A). La primera derivada del ruido fue representada en forma de histograma, que fue ajustado a una función gaussiana y se calculó la desviación estándar que coincide con el valor w o el ancho de la campana (fig 27B). Una vez calculada la desviación estándar hemos llegado al consenso de utilizar 2,5 veces la desviación estándar como umbral para detectar las espigas.

Aplicando la transformada rápida de Fourier al histograma de frecuencias observamos que la mayor parte del ruido es de 50Hz y sus armónicos de 150Hz y 250Hz (fig. 28C). Esta es la frecuencia de la corriente alterna que proviene de la compañía eléctrica. En nuestro laboratorio el Dr. Gómez implementó unos filtros en la macro de Igor para poder disminuir dichas frecuencias. En el ejemplo de la figura 28C hemos

aplicado un filtro tipo smooth de 15 y observamos cómo se reducen los ruidos de alta frecuencia mientras que los de baja frecuencia (50Hz) no se ven modificados. Esto es importante ya que nuestra señal biológica se encuentra fundamentalmente en la zona de los 50Hz.

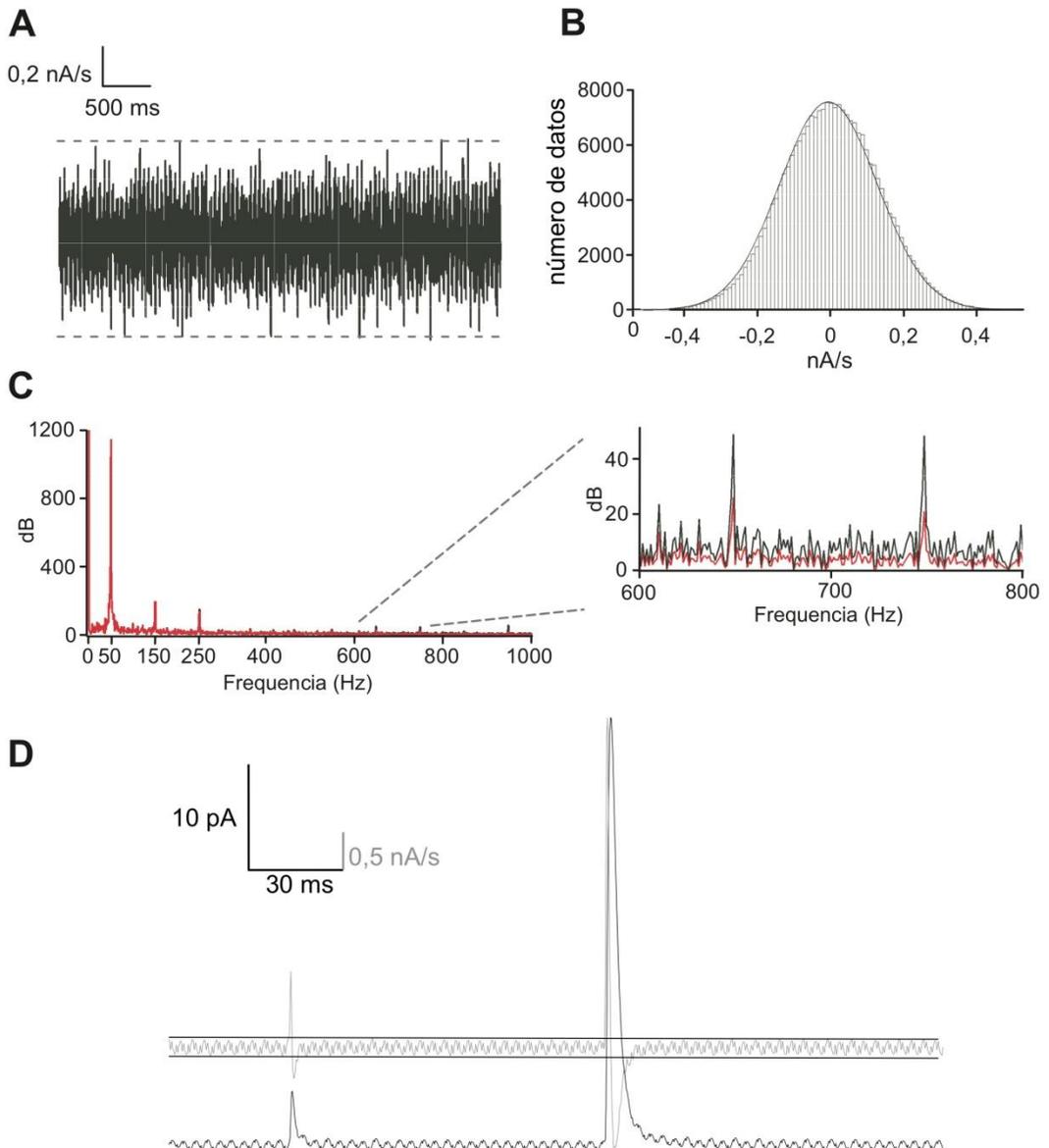


Figura 28: Análisis del ruido del equipo electrofisiológico de amperometría. A, primera derivada de un fragmento de registro amperométrico. B, histograma de frecuencias del registro en A. C, en negro transformada de Fourier a partir del registro amperométrico sin filtrar y en rojo transformada de Fourier a partir del registro tras haber usado un filtro tipo smooth de 15. En el zoom

se muestra un detalle ampliado en el que se puede observar mejor el efecto del filtrado. D, fragmento de registro amperométrico con dos espigas, encima se ha representado la primera derivada del registro. Las líneas horizontales señalan el intervalo de 2,5 veces la desviación estándar.

La macro implementada en Igor va a detectar las espigas calculando la primera derivada de los registros amperométricos (fig. 28D). Así detectará el punto máximo de la espiga así como su principio y final.

28. Las células HEK293 que expresan CgA-EGFP incubadas con L-DOPA la liberan de manera cuántica

Con las aproximaciones experimentales usadas hasta ahora hemos visto mayor acumulación de L-DOPA en las células que expresan CgA-EGFP que en las que no. Sin embargo, la mejor manera de detectar la acumulación de L-DOPA en las vesículas de CgA-EGFP en células HEK293 ha sido el uso de la técnica de amperometría (fig. 29A) Esta técnica nos permite detectar eventos individuales de fusión en célula única y además podemos estudiar la cinética de la exocitosis analizando los diferentes parámetros característicos de las espigas amperométricas (fig. 29B)

Hemos sido capaces de detectar amperométricamente la liberación de L-DOPA de manera cuántica en células HEK293 que expresan CgA-EGFP y que han sido incubadas con 1mM de L-DOPA durante 90min (fig. 29C) y sin aplicar estímulo secretagogo. Sin embargo, en las células control en las que no se expresa la CgA-EGFP no ha sido posible detectar la liberación de L-DOPA.

En la figura 29C se adjunta una tabla resumen de la cuantificación de los parámetros de las espigas amperométricas detectadas en estas células. En comparación con las espigas amperométricas características de células cromafines o células PC12 las espigas detectadas en las células HEK293 que expresan CgA-EGFP tienen la I_{max} y la Q más pequeñas.

Con estos experimentos hemos demostrado de una manera directa que la expresión de CgA-EGFP a parte de promover la granulogénesis y la exocitosis de dicha proteína también permite la acumulación de catecolaminas y su exocitosis.

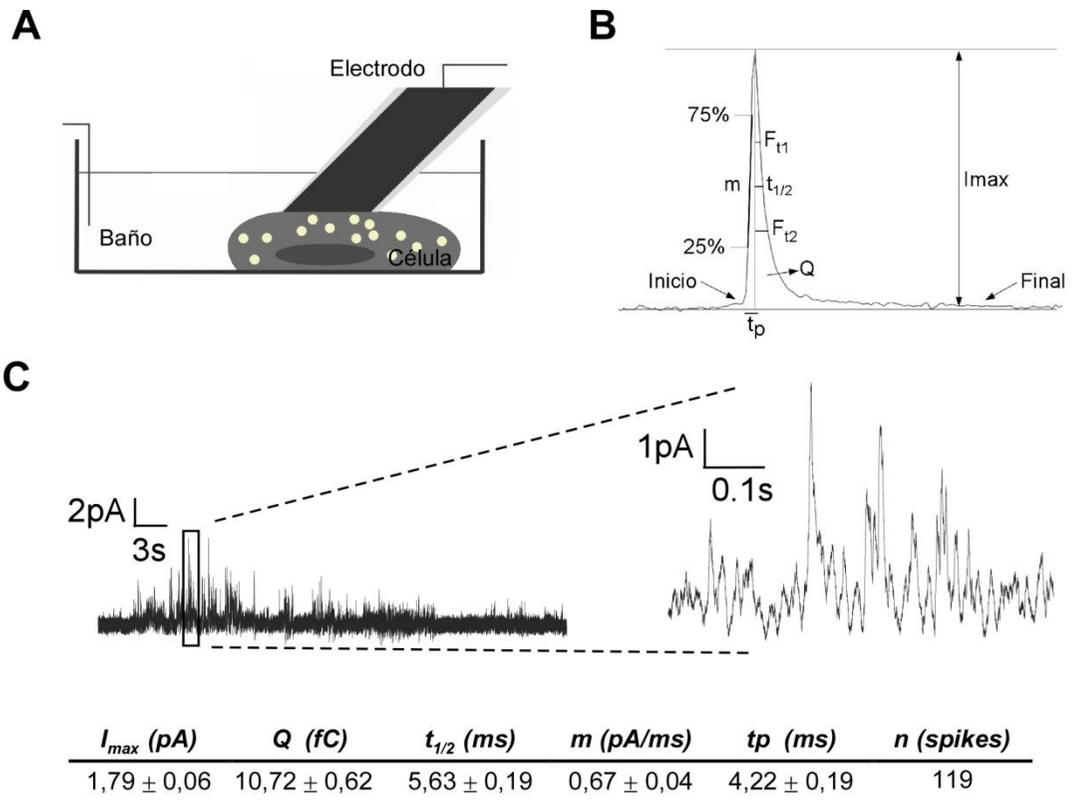


Figura 29: Liberación cuantál de L-DOPA en células HEK293 CgA-EGFP. A, Dibujo de la configuración para detección amperométrica. B, Parámetros cinéticos de las espigas amperométricas. C, Ejemplo de registro amperométrico de células HEK293 CgA-EGFP incubadas con 1mM de L-DOPA 90 min y parámetros característicos de sus espigas secretoras. Los datos están expresados en las unidades indicadas en paréntesis.

29. Caracterización de diferentes líneas de células PC12

Antes de iniciar los experimentos con las células PC12 caracterizamos algunas de las líneas que disponíamos en el laboratorio. En concreto, analizamos dos líneas que conocemos como PC12v y PC12j. Las células PC12 comparten una serie de características con las células cromafines (ver apartado 4) entre otras la expresión de cromograninas y la síntesis y exocitosis de catecolaminas. Estos requisitos eran indispensables para nuestros estudios posteriores.

Para ello, analizamos la expresión de CgA y TH por medio de Western Blot, el contenido de catecolaminas por HPLC y la respuesta excitotóxica por amperometría.

Los resultados de estos experimentos preliminares fueron llamativos. En cuanto a la expresión de proteínas la línea PC12v expresaba tanto la CgA como la TH, sin embargo la línea PC12j no expresaba ninguna de estas dos proteínas (fig. 30A). Al analizar el contenido de catecolaminas en lisados de ambas líneas por medio de HPLC observamos que la DA fue detectada en la línea PC12v pero no en la línea PC12j (fig. 30B). Para comprobar si las células eran capaces de liberar catecolaminas por exocitosis utilizamos la amperometría con estímulos de 5 s de Ba²⁺. Sólo fue posible detectar eventos de exocitosis (espigas amperométricas) en la línea PC12v (fig. 30C). En publicaciones recientes se ha propuesto que aquellas líneas de PC12 que no tienen el fenotipo típico secretor ya que carecen de gránulos y de proteínas relacionadas con la vía de secreción regulada puede estar debido a la alta expresión del represor de la transcripción REST (D'Alessandro and Meldolesi, 2013).

Por todo esto decidimos utilizar para el resto de nuestro estudio la línea PC12v y para más sencillez a partir de este momento se denominarán simplemente PC12.

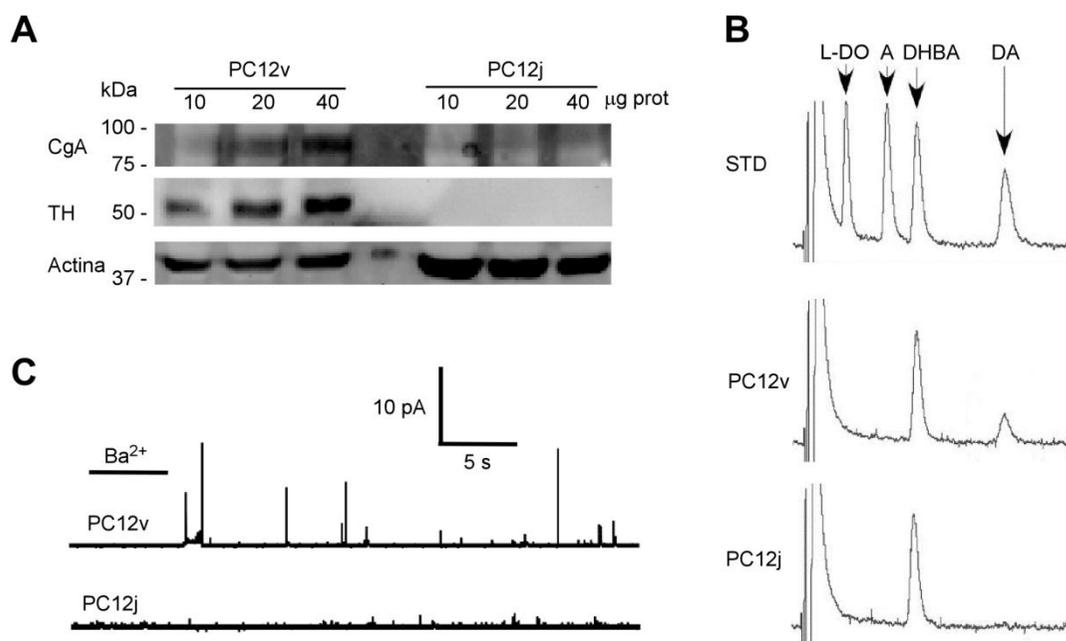


Figura 30: Caracterización de diferentes líneas de células PC12. A, Western Blot de lisados de las dos líneas PC12, se cargaron cantidades crecientes de proteína y se revelaron la CgA

y la TH, como control de carga se utilizó la actina. B, Cromatogramas de HPLC. STD: mezcla conocida de estándares L-DOPA, A, DHBA y DA a una concentración de 200 nM; PC12v y PC12j: ejemplos de cromatograma de lisados de ambas líneas celulares. C, Ejemplos de registros amperométricos de ambas líneas celulares.

30. La expresión de CgA-EGFP en células PC12 tiene un patrón de expresión vesicular

Una vez localizado el clon de línea PC12 que posee toda la maquinaria secretora, hemos expresado la proteína CgA-EGFP en dichas células. Las células PC12 expresan además la CgA endógena así como otras graninas como la CgB (fig. 31B). La expresión de la construcción se ha comprobado por medio de Western Blot (fig. 31B) y, además, se ha observado la expresión de otras proteínas vesiculares como CgB y VMAT2 así como la enzima TH involucrada en la síntesis de catecolaminas (fig. 31B).

En cuanto a la expresión celular hemos observado que la proteína quimérica posee un patrón de tipo granular como podemos observar en la imagen de TIRFM de la figura 31A. Por tanto en estas células, la CgA-EGFP también se localiza en compartimentos subcelulares del tipo granular.

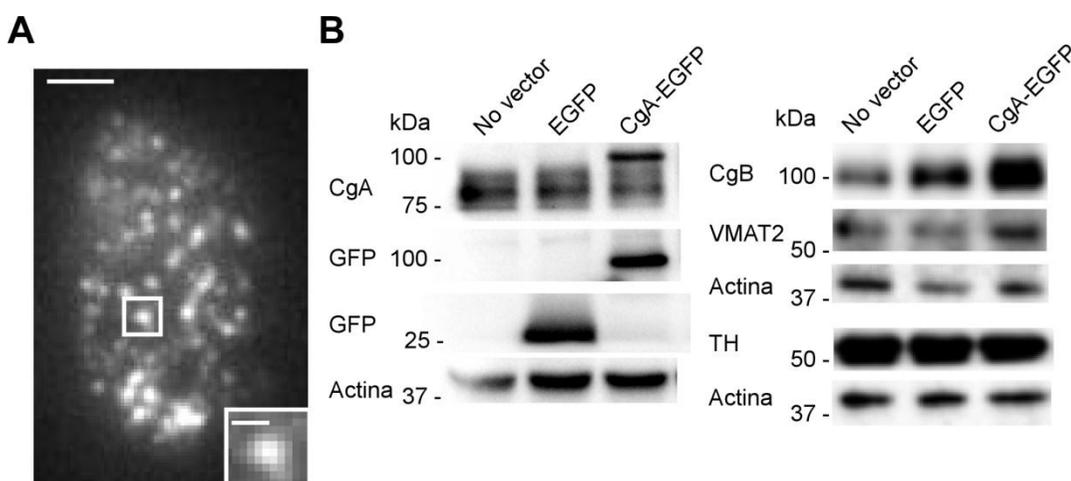


Figura 31: La expresión de la CgA-EGFP es de tipo granular en células PC12. A, Imagen de TIRFM que muestra una célula PC12 expresando CgA-EGFP, (barra de escala 2 μ m). En el zoom se muestra un ejemplo de vesícula, (barra de escala 0,5 μ m). B, Lisados de células PC12 nucleofectadas sin vector (carril 1), con pEGFP (carril 2) y pCgA-EGFP (carril 3) fueron analizados

Resultados

utilizando anticuerpos contra CgA, GFP, TH, CgB o VMAT2 y además se usó la actina como control de carga.

Para cuantificar el porcentaje de eficacia de la transfección se realizaron experimentos de citometría de flujo (fig. 32). El porcentaje de transfección del plásmido pCgA-EGFP logrado de ~ 15%.

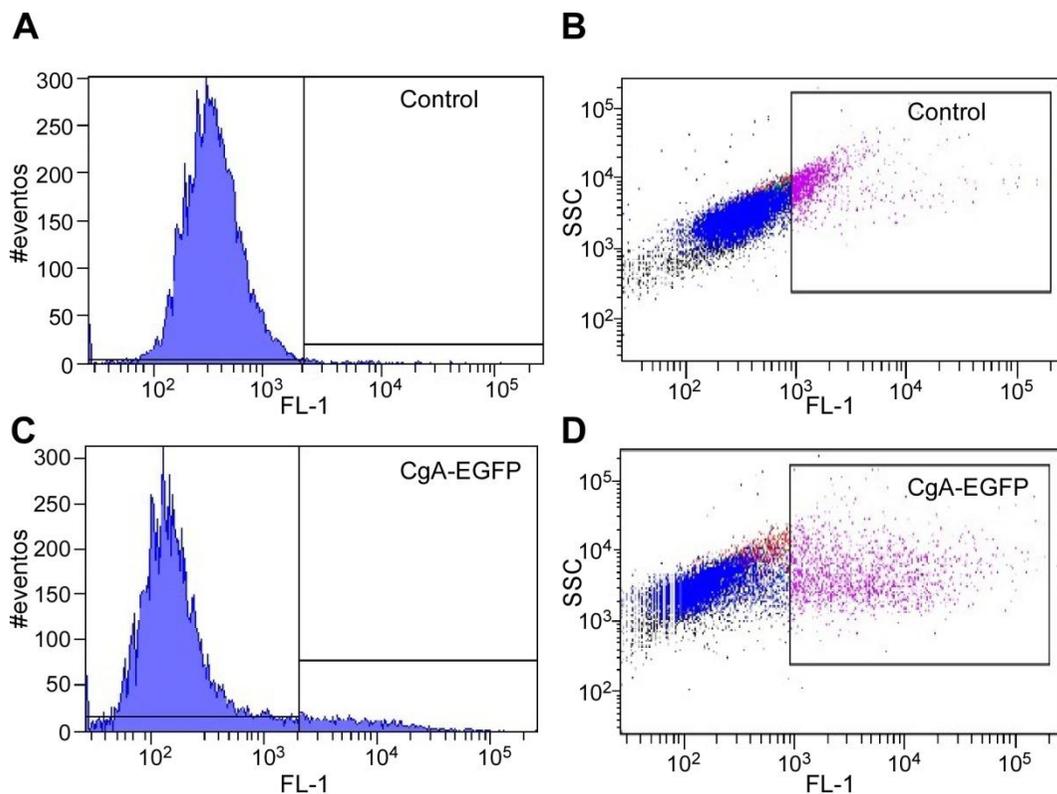


Figura 32: Cuantificación del porcentaje de transfección de CgA-EGFP en células PC12. A y C, histogramas de la señal en FL-1 (GFP) para las células control y las células que expresan CgA-EGFP. B y D, dot plots de la señal en FL-1 versus la complejidad celular (SSC).

31. La CgA-EGFP es liberada por exocitosis dependiente de estímulo en las células PC12

Utilizando la microscopía de TIRF hemos caracterizado cómo es la liberación de la CgA-EGFP en células PC12. Para estimular las células hemos utilizado un sistema de perfusión para aplicar una solución de Krebs-HEPES con 70mM KCl (75,9 mM de NaCl, 70mM de KCl, 1,2 mM de MgCl₂, 10 mM de HEPES, 11 mM de glucosa) durante 20 s. La cuantificación se ha hecho de manera similar que con las células HEK 293.

En estas células prácticamente la totalidad de los eventos de exocitosis de CgA-EGFP analizados son liberaciones parciales (aprox. 97%), es decir el contenido no se ha liberado totalmente y seguimos viendo señal en las vesículas después de los 5 s tras la exocitosis. Esto lo observamos tanto en ejemplos de liberación (fig 33A) como en el trazo medio de la liberación de los eventos analizados (n=41) frente al tiempo observamos que la señal no llega a desaparecer con lo cual el contenido no se liberó del todo (fig. 33B). Al hacer un ajuste a una exponencial de caída el valor de tau es de 2,6 s en estas células, lo cual es prácticamente el doble de lo que observábamos en las células HEK293. Es decir, la liberación en las células PC12 de la CgA-EGFP es más lenta que en las células HEK293.

En cuanto al anclaje en la membrana, el 87% de las vesículas de CgA-EGFP que hicieron exocitosis estaban en el campo evanescente al menos 5 s antes de que ocurriera la misma, mientras que el 13% hicieron exocitosis sin pasar ese tiempo de unión a la membrana.

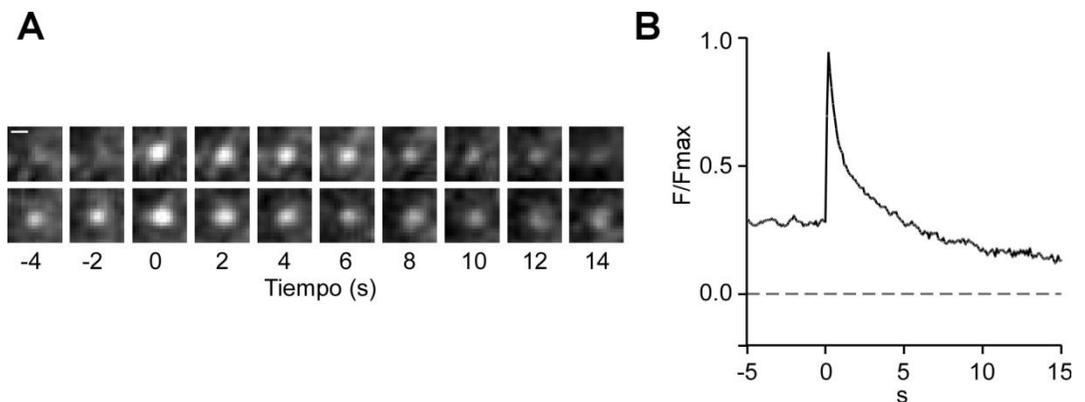


Figura 33: La CgA-EGFP es liberada por células PC12 ante un estímulo despolarizante. A, imágenes secuenciales que muestran dos ejemplos de liberación de la CgA-EGFP en estas células. (Barra de escala 1 μm); B, trazo medio de la señal de fluorescencia en función del tiempo. Se analizaron un total de 41 exocitosis. Los trazos de cada exocitosis fueron normalizados a la señal máxima y se calculó la media.

En estas células hemos observado que la liberación de CgA-EGFP ocurre cuando aplicamos un estímulo secretagogo que en nuestro caso ha sido una solución con 70 mM de K^+ .

32. El sustrato al que se adhieren las células modifica la cinética de la liberación de la CgA-EGFP

La técnica de TIRFM precisa que las células estén bien adheridas al cubreobjetos, por ello durante la puesta a punto de los experimentos se utilizaron dos sustratos diferentes: poli-D-lisina y colágeno.

Al comparar la liberación de CgA-EGFP en células adheridas a uno u otro sustrato, hemos observado que la liberación de la CgA-EGFP está modificada por el mismo. Las exocitosis de células PC12 expresando CgA-EGFP que fueron adheridas con colágeno muestran una caída de la señal más lenta que aquellas que fueron adheridas con Poli-D-Lisina. El ajuste exponencial da una tau de caída de las exocitosis de células en colágeno de 2,6 s mientras que las de células en poli-D-lisina tienen una tau de caída de 1,3 s.

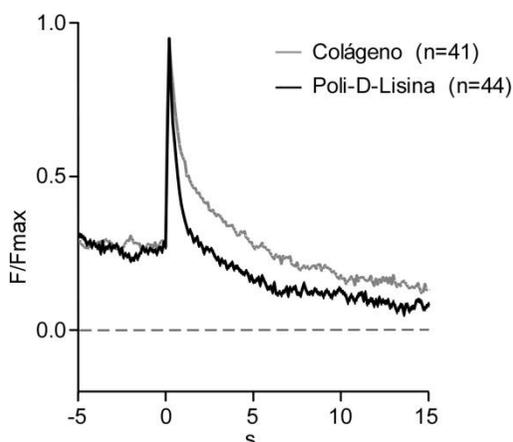


Figura 34: Curso temporal de la liberación de CgA-EGFP en células PC12 con diferentes sustratos. Trazos medios de la señal de fluorescencia en función del tiempo. Se analizó un total de 41 exocitosis en células adheridas a colágeno y 44 exocitosis en células adheridas a poli-D-lisina. Los trazos de cada exocitosis fueron normalizados a la señal máxima y se calculó la media.

Este resultado implicaría que la matriz extracelular podría tener también un papel en la regulación de la exocitosis de péptidos hacia el espacio extracelular, ya que puede provocar la retención de dichos péptidos y por tanto la ralentización de la liberación.

33. Tamaño y movimiento de las vesículas de CgA-EGFP en células PC12

Hemos realizado un análisis cualitativo de las características de los gránulos de CgA-EGFP en las células PC12. Se estudió el tamaño aparente y el movimiento los 5 s anteriores a la exocitosis de las vesículas de CgA-EGFP de una manera similar al análisis en las células HEK293 (ver apartado 22)

En cuanto al tamaño aparente medio de las vesículas en las células PC12 adheridas a colágeno es de 270 ± 17 nm (media \pm SEM) mientras que las adheridas con poli-D-lisina es de 237 ± 17 nm. Esta pequeña diferencia no es significativa (fig 35A). Incluso se han comparado con los valores obtenidos en las células HEK293 (302 ± 12 nm) y tampoco observamos diferencias significativas (fig 35A). Por tanto el tamaño vesicular no se ve afectado por el tipo celular ni por el sustrato utilizado.

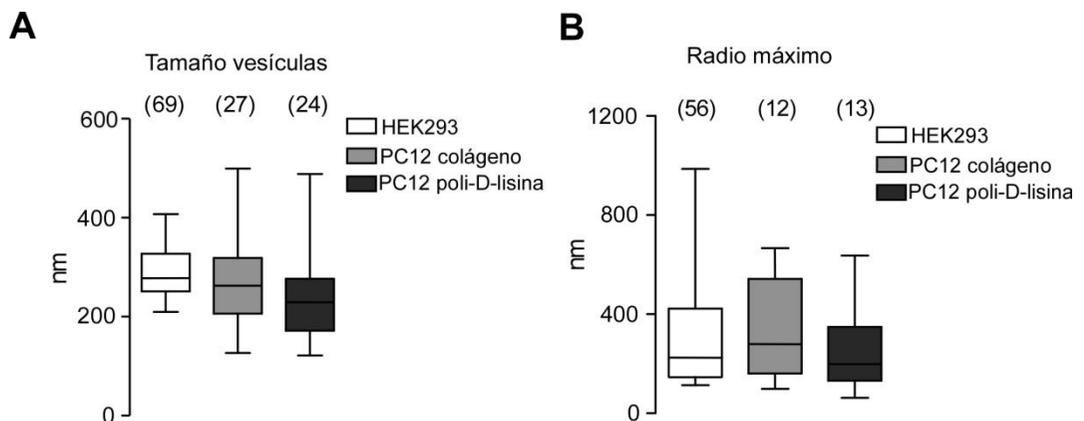


Figura 35: Características de las vesículas secretoras que contienen CgA-EGFP. A, Cuantificación del tamaño aparente de las vesículas en los dos tipos celulares y según el sustrato utilizado para adherir las células. En el *boxplot* se representa con el rectángulo el rango entre los percentiles 25 y 75, con la línea en el interior del rectángulo se representa la mediana y las líneas superior e inferior representan los percentiles 10 y 90. B, Cuantificación del radio máximo de la trayectoria de las vesículas. Se utiliza una representación igual que la de A.

También se determinaron las trayectorias de los gránulos durante los 5 s antes de la exocitosis. El cálculo se realizó de una manera similar que para las células HEK293. La media del radio máximo de movimiento fue 345 ± 60 nm para células PC12 adheridas a colágeno y 256 ± 51 nm para células PC12 adheridas a poli-D-lisina. También se compararon estos resultados con los de las células HEK293 cuya media era de 381 ± 50 nm. No se observan diferencias significativas en el movimiento realizado por las

vesículas los 5 s previos a la exocitosis en los dos tipos celulares, ni se ve afectado por el sustrato al que están adheridas las células (Fig. 35B).

En estas células (de manera similar a lo que ocurre en las HEK293) el movimiento de las vesículas de CgA-EGFP que terminan haciendo exocitosis durante los 5 s previos es muy pequeño si consideramos que el tamaño de las vesículas ronda los 230 - 270 nm y el radio máximo de movimiento está en torno a los 250 – 350 nm con lo cual las vesículas se encuentran prácticamente ancladas a la membrana y se mueven poco.

34. La CgA-EGFP promueve una mayor acumulación de DA en células PC12

Las células PC12, al contrario que las HEK293, poseen la maquinaria involucrada en la secreción regulada de catecolaminas. Expresan VMAT, graninas y sintetizan catecolaminas (generalmente sintetizan DA y en algunos casos NA). 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 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. Hemos utilizado esta estrategia de incubación con L-DOPA, a diferentes tiempos para poder observar la evolución temporal de la acumulación de DA de las vesículas. Las muestras han sido analizadas por medio de HPLC.

La cinética de acumulación tanto de las células control (nucleofectadas sin vector) como de las células que expresan CgA-EGFP llega a un estado estacionario aproximadamente a la vez, en torno a los 60 min. Sin embargo, en todos los tiempos de incubación testados la cantidad de DA acumulada es significativamente mayor en las células que expresan CgA-EGFP que en las control (fig. 36). Esto apunta a que el proceso de entrada de la DA a las vesículas es similar en ambas condiciones pero la capacidad de acumularla en el interior es diferente. Incluso en las condiciones basales, es decir, sin incubar con L-DOPA la cantidad total de DA es ligeramente mayor (un 21%) en las que expresan CgA-EGFP.

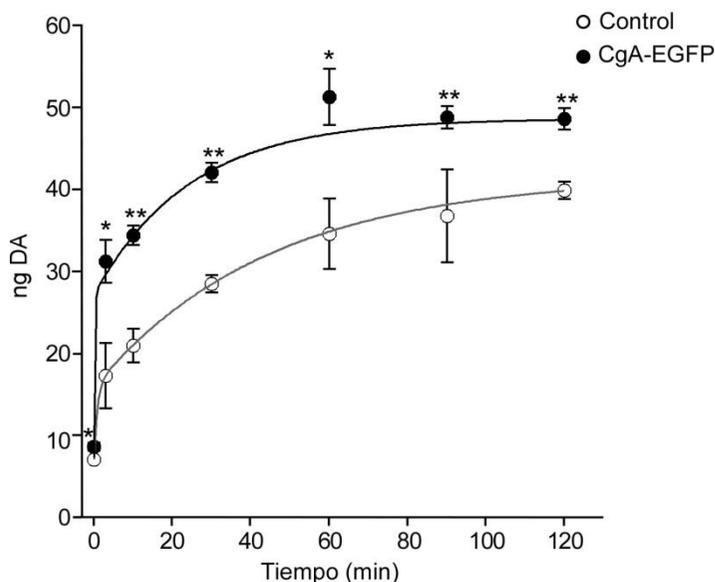


Figura 36: La capacidad de acumulación de DA se ve incrementada en las PC12 que expresan CgA-EGFP. Cuantificación de la cantidad de DA acumulada en las dos condiciones experimentales a diferentes tiempos (3, 10, 30, 60, 90, 120 min) en 120.000 células por condición, (media \pm SEM, n=5, test U-Mann-Whitney, *p \leq 0,05 ** p \leq 0,01.). Cada una de las cinéticas se ha ajustado a una doble exponencial.

35. La cantidad de catecolaminas liberadas por cada vesícula secretora es mayor en las células PC12 que expresan CgA-EGFP

Hemos demostrado que la CgA-EGFP en las células PC12 forma gránulos que son capaces de liberar su contenido proteico ante un estímulo y además la capacidad de acumulación de DA se ve incrementada. Sin embargo, estos experimentos son el resultado de poblaciones celulares en las que no todas las células están modificadas y además no distinguimos si el origen de la DA medida es vesicular.

Por medio de la amperometría hemos caracterizado la acumulación de la DA en las vesículas de las células que expresan la proteína quimérica y cómo es la cinética de la exocitosis.

Los experimentos se realizaron en células 48 horas después de la nucleofección. Para realizar los registros amperométricos se seleccionaron aquellas células que estuvieran expresando la proteína quimérica por medio del uso de un microscopio invertido de fluorescencia (Fig 37A). Se

Resultados

utilizó una solución Krebs-HEPES con 5 mM de Ba^{2+} durante 5 s como estímulo secretagogo aplicado mediante presión positiva a través una pipeta.

La cantidad de catecolaminas liberadas por las vesículas de las células que expresan CgA-EGFP se ve incrementada en aproximadamente un 124 %, además la amplitud máxima de las espigas amperométricas (I_{max}) que indica la concentración máxima alcanzada en la superficie del electrodo también es aproximadamente un 91 % mayor (fig 37C). Con lo cual estas vesículas son capaces de acumular y liberar más catecolaminas que las de las células que no expresan la proteína de fusión. Por otro lado también observamos un incremento de la pendiente de subida de la espiga de un 66% lo cual indicaría que la primera parte de la liberación está acelerada.

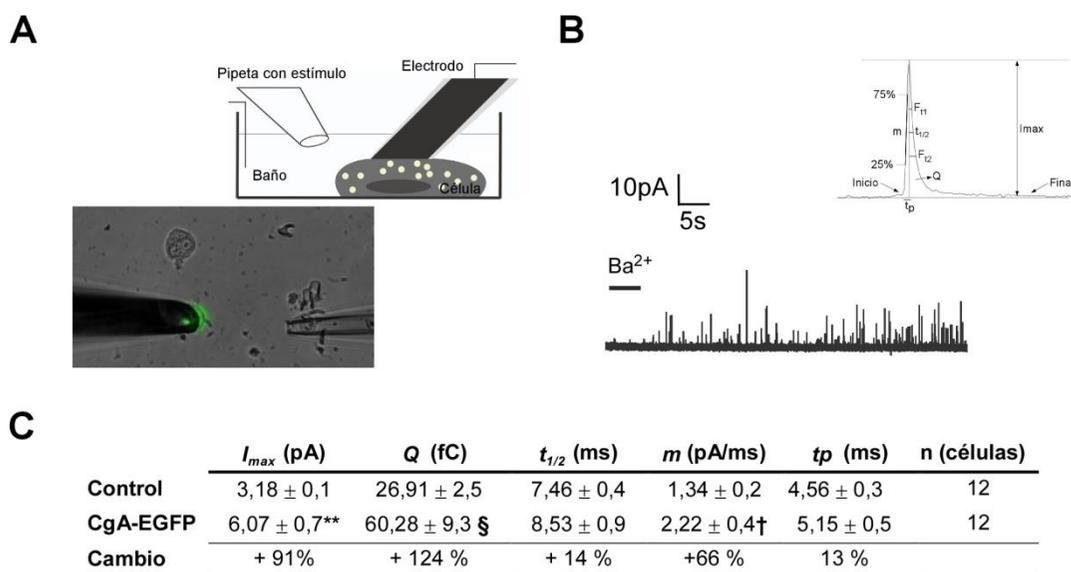


Figura 37: Características amperométricas de las espigas de las células PC12 CgA-EGFP y su control. A, Imagen de la configuración para hacer registros amperométricos en las células que expresan CgA-EGFP y dibujo esquemático de la misma. B, Ejemplo de registro amperométrico de células PC12 y parámetros cinéticos de las espigas secretoras. C, Tabla resumen de las características cinéticas de las dos condiciones experimentales. El número de espigas analizado fue de 1052 para los controles y 1833 para las que expresan CgA-EGFP. Los datos están expresados en las unidades indicadas en paréntesis. ** $p = 0.0011$; § $p = 0.0036$; † $p = 0.0194$ (U- Mann-Whitney).

36. Las vesículas de células PC12 que expresan CgA-EGFP tienen una capacidad de acumular catecolaminas mayor que las células control

Hemos empleado la estrategia de incubar las células con 100 μ M de L-DOPA durante 60 min (ya mencionada anteriormente) para analizar la capacidad de acumulación de CA en los gránulos secretores, cuando se favorece la síntesis de DA.

Hemos observado un incremento de aproximadamente el 90% en la carga de las espigas amperométricas (Q), es decir, ante la sobrecarga de catecolaminas con la estrategia de incubación con L-DOPA las vesículas que expresan CgA-EGFP tienen una mayor capacidad de acumular catecolaminas que las control (tabla 2). Además observamos un incremento del 59 % en el parámetro $t_{1/2}$ el cuál nos da una idea de la duración de las espigas, por tanto en este caso las espigas de las células que expresan CgA-EGFP son casi 1,6 veces más lentas que las control. Consideramos que este resultado viene dado por la capacidad de retención de las catecolaminas de la matriz intravesicular en el momento de la exocitosis lo cual genera retraso en la llegada de las mismas a la superficie del electrodo (Jankowski et al., 1993).

Tabla 2: Características de las vesículas secretoras de células PC12 incubadas con 100 μ M de L-DOPA

	I_{max} (pA)	Q (fC)	$t_{1/2}$ (ms)	m (pA/ms)	tp (ms)	n (células)
Control	4,73 \pm 0,4	63,88 \pm 1,7	10,26 \pm 1,0	1,82 \pm 0,4	5,49 \pm 0,6	10
CgA-EGFP	4,74 \pm 0,6	121,51 \pm 7,1 **	16,29 \pm 2,6 §	1,33 \pm 0,2	11,10 \pm 3,3 †	12
Cambio	-	+ 90 %	+ 59 %	-27 %	102 %	

Los datos están expresados en las unidades en paréntesis. ** p = 0.0076; § p = 0.032; † p = 0.022 (U-Mann-Whitney). El número de espigas analizado fue de 2282 para las células control y 1088 para las que expresan CgA-EGFP.

37. La distribución de las vesículas secretoras en función de su carga se desplaza hacia valores mayores en las células que expresan CgA-EGFP.

Los valores medios de carga de las espigas amperométricas (Q) son unas 2,3 veces mayores en las células PC12 que expresan CgA-EGFP respecto al control. Cuando las células son incubadas con L-DOPA el incremento es de 1,9 veces.

A parte de los valores medios es interesante ver cómo es la distribución de Q . Si representamos los valores de Q como un histograma de frecuencias obtendremos una distribución asimétrica. Para facilitar el análisis es habitual (Westerink and Ewing, 2008) representar los histogramas de la distribución de $Q^{1/3}$ con lo que matemáticamente se logra una distribución más similar a una gaussiana. (fig. 38)

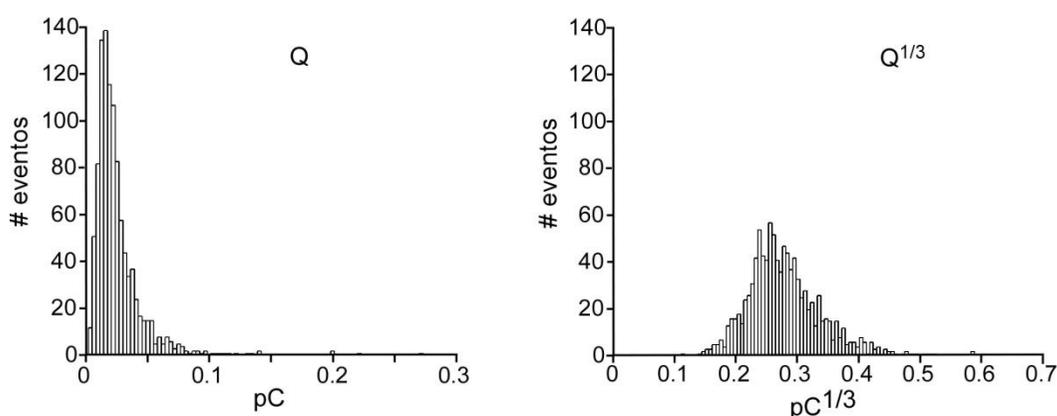


Figura 38: Ejemplos de histogramas de frecuencia de Q y $Q^{1/3}$ de células PC12. Se representa Q en pC y $Q^{1/3}$ en $pC^{1/3}$. Para los histogramas se han utilizado todas las espigas ($n=1052$) de un experimento de amperometría en células PC12 condiciones control.

Por medio del uso de la ley de Faraday (ver apartado 18.2) y a partir del valor de Q de cada espiga amperométrica, se ha calculado la equivalencia en zmoles de catecolaminas detectadas por el electrodo y se ha calculado la raíz cúbica dando el valor de $Q^{1/3}$ en $zmoles^{1/3}$. Esto se ha realizado para las cuatro condiciones experimentales y posteriormente se ha realizado un ajuste gaussiano utilizando la macro de ajuste de multipicos de IGOR. La expresión de la CgA-EGFP provoca un desplazamiento en el histograma hacia valores de Q más altos (fig. 39A). Además cuando se incuban las células con L-DOPA también vemos un desplazamiento a valores de Q aún mayores. (fig. 39B).

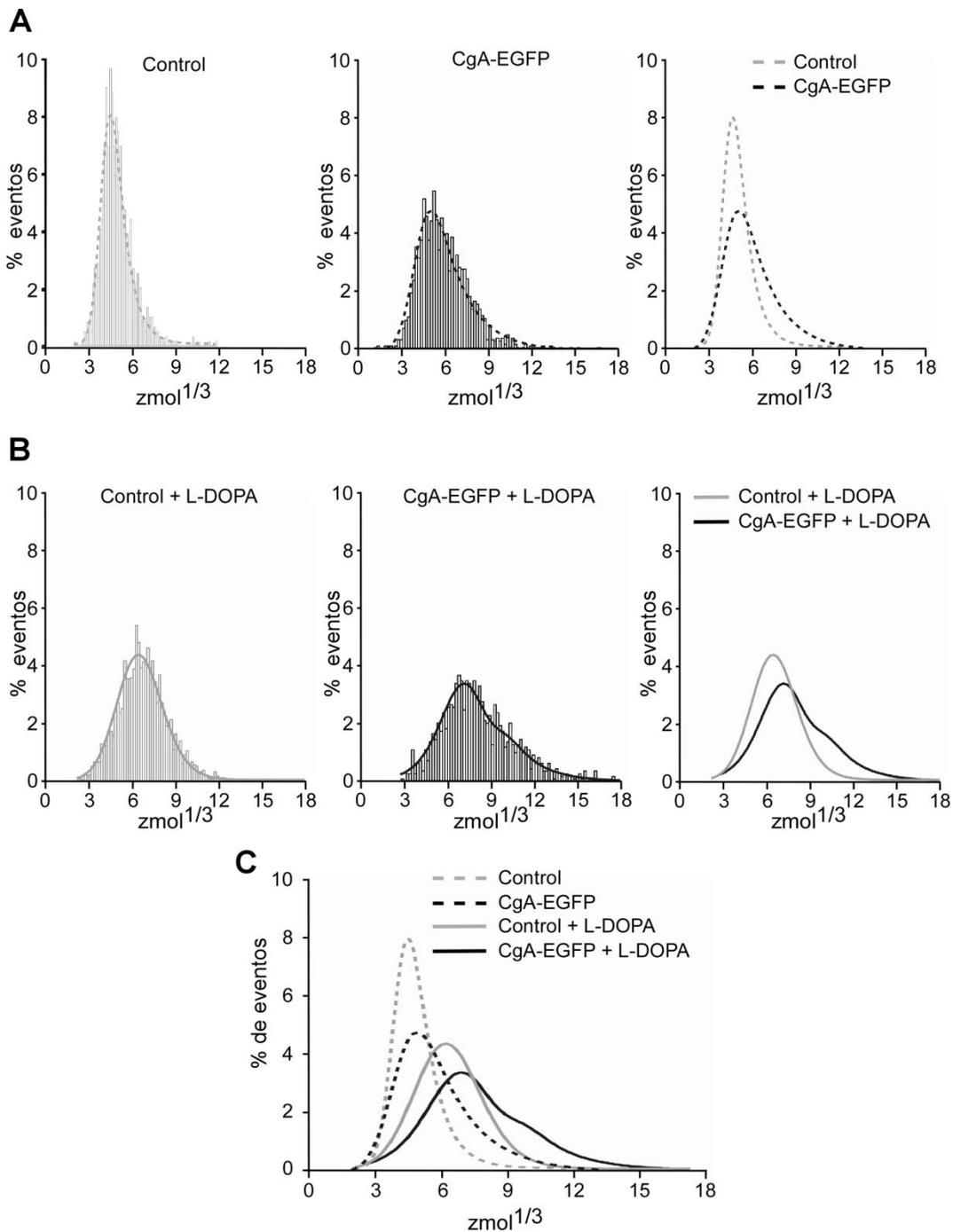


Figura 39: La carga (Q) de las vesículas se ve incrementada en las células que expresan CgA-EGFP A, Histogramas de frecuencia de eventos de exocitosis en función de la $Q^{1/3}$ expresada en $zmoj^{1/3}$ en células PC12 control y en células PC12 expresando

CgA-EGFP con sus respectivos ajustes gaussianos en la tercera gráfica se superponen los dos ajustes gaussianos. B, Igual en A pero con células incubadas con 100 μ M de L-DOPA. C, Superposición de las cuatro condiciones experimentales.

Aunque por lo general no podemos hacer comparaciones entre experimentos de diferentes días ya que cada experimento se hace con un electrodo diferente y puede haber variaciones entre los valores de los parámetros, nos hemos permitido aquí solapar las cuatro condiciones experimentales para observar más claramente cómo es la modificación que produce la expresión de CgA-EGFP. (fig 39C). La expresión de CgA-EGFP desplaza el histograma a valores más altos, la incubación de células control con L-DOPA también desplaza el histograma a valores de Q mayores y cuando las células que expresan CgA-EGFP además son incubadas con L-DOPA el desplazamiento es aún mayor. En esta última condición además se adivinan aparentemente dos poblaciones de vesículas.

38. La relación entre los parámetros I_{max} y Q está modificada en las células que expresan CgA-EGFP cuando han sido incubadas con LDOPA.

En condiciones normales en cuanto a la composición de la matriz intravesicular, el incremento en la carga (Q) de CA de una vesícula secretora se acompaña de un incremento proporcional en la altura máxima que alcanza la corriente de oxidación (I_{max}) (Grabner et al., 2005).

En nuestro caso cuando representamos la relación entre la I_{max} y la Q en células control y células expresando CgA-EGFP no vemos diferencias significativas en cuanto a esta relación por lo que aparentemente el incremento de Q se ve reflejado en un incremento proporcional de I_{max} .

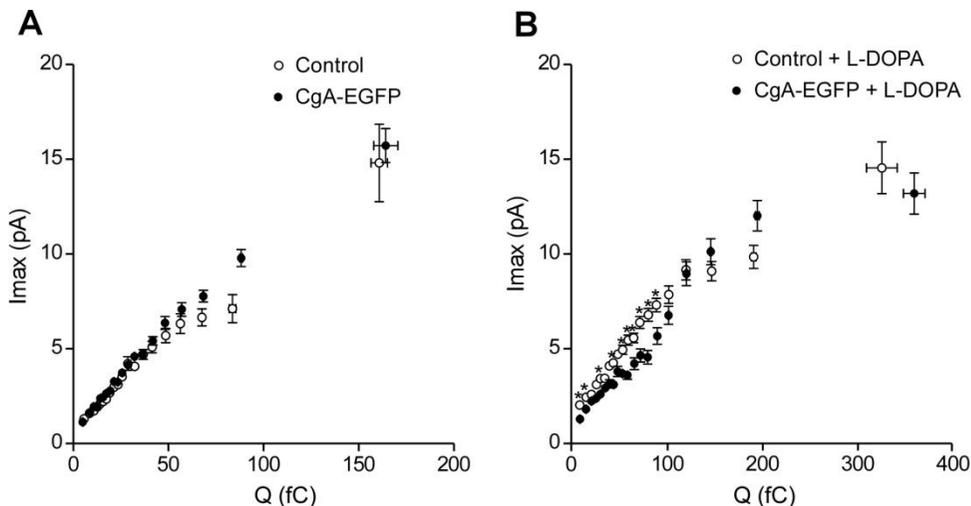


Figura 40: La relación entre I_{max} y Q se modifica por la expresión de CgA-EGFP cuando las células han sido incubadas con $100 \mu\text{M}$ L-DOPA. A, Todas las espigas juntas del grupo control ($n=12$) y CgA-EGFP ($n=12$) se ordenaron de manera creciente en base a su carga (Q), se distribuyen en 20 grupos con igual número de espigas y se representaron como se muestra (media \pm error estándar). El análisis estadístico fue una prueba de U-Mann Whitney con la corrección de Bonferroni. $*p < 0,0025$. B, Igual que en A pero las células fueron tratadas previamente con $100 \mu\text{M}$ de L-DOPA durante 60min

Cuando las células han sido incubadas con L-DOPA (tanto las control como las que expresan CgA-EGFP) observamos diferencias en la relación I_{max} vs Q al menos cuando la Q es igual o menor a 100 fC en estos intervalos a una Q igual, la I_{max} en las células que expresan CgA-EGFP es menor. Este resultado lo explicaríamos también por el papel de retención que tendría la matriz intravesicular, provocando que las catecolaminas tarden más tiempo en llegar al electrodo y por ello la I_{max} es menor a una Q igual

Discusión

39. ¿Son los gránulos inducidos por CgA-EGFP similares a los gránulos cromafines?

Diversos laboratorios han observado la capacidad granulogénica de diferentes graninas en diferentes modelos celulares, tanto en líneas celulares neuroendocrinas como en líneas que no lo son (Courel et al., 2006; Huh et al., 2003; Kim et al., 2001; Montero-Hadjadje et al., 2009; Stettler et al., 2009). En nuestros experimentos hemos observado la misma capacidad granulogénica de la CgA-EGFP en dos líneas celulares, una carente de la ruta de secreción regulada (HEK293) y otra que sí posee dicha ruta (PC12). (fig. 19 y 31) ¿Son esos gránulos de nueva formación inducidos por la CgA-EGFP similares a los gránulos cromafines?

Estudios de microscopía electrónica (Coupland, 1965a; Diaz-Flores et al., 2008; Glavinovic et al., 1998) han estimado unos tamaños de gránulos cromafines entorno a 200 nm para los gránulos adrenérgicos y a 290 nm para los gránulos noradrenérgicos. En trabajos en los que expresan VAMP-GFP en células cromafines bovinas han calculado tamaños de 200-300 nm de radio utilizando las imágenes de fluorescencia (Allersma et al., 2004). En líneas celulares carentes de la vía de secreción regulada se ha expresando la CgA originando vesículas de 200 - 400 nm de diámetro (medidas realizadas en imágenes de microscopía electrónica) (Courel et al., 2006; Huh et al., 2003; Montero-Hadjadje et al., 2009).

Nosotros hemos caracterizado el tamaño de las vesículas utilizando imágenes de fluorescencia (hay que considerar que estos tamaños son tamaños aparentes ya que la fluorescencia dará tamaños sobreestimados). Las vesículas que terminaron haciendo exocitosis de CgA-EGFP tenían un tamaño muy similar en las dos líneas celulares con valores de 250-300 nm de diámetro (fig. 24 y 35). Estos datos se asemejan a los publicados por otros laboratorios.

En cuanto al movimiento de las vesículas secretoras inducidas por CgA-EGFP también son similares en los dos tipos celulares. El radio máximo de movimiento es de 300 - 400 nm (fig. 24 y 35). Estos valores son muy similares a los calculados en células cromafines bovinas expresando la proteína VAMP-EGFP (Camacho et al., 2008). Artículos en los que utilizan sondas fluorescentes como la naranja de acridina han determinado

que los gránulos se mueven en espacios restringidos de 70 nm (Steyer and Almers, 1999). Otros distinguen dos tipos de gránulos unos móviles que se mueven en espacios de hasta 400 nm y otros inmóviles que se mantienen en un espacio de 40 nm (Oheim and Stuhmer, 2000). Expresando el péptido NPY-dsred, también en células cromafines bovinas, han calculado que los gránulos se mueven en diámetros de en torno 120 nm (Nofal et al., 2007).

Nosotros hemos estudiado solamente aquellas vesículas que hicieron exocitosis de CgA-EGFP en el tiempo de registro y hemos observado que durante los 5 s previos a la exocitosis el 90% de esas vesículas de CgA-EGFP están dentro del campo evanescente en las células HEK293 y el 87% en las células PC12. Estos valores se asemejan a los datos de otros laboratorios, por ejemplo, en células cromafines expresando VAMP-GFP el 70% de las vesículas estaban unidas a la membrana (dentro del plano de TIRFM) al menos 12 s antes de la exocitosis (Allersma et al., 2004). En otros artículos se habla de que un 95% de las vesículas están ancladas a la membrana (Steyer et al., 1997). Con lo que esas vesículas estarían en fase de docking y listas para hacer exocitosis.

En aspectos cualitativos como el tamaño, el movimiento y el tiempo de anclaje a la membrana previo a la exocitosis, estos gránulos generados por CgA-EGFP se asemejan a los gránulos cromafines.

En las células HEK293 hemos visto liberación de la CgA-EGFP sin estímulo con lo cual sería un tipo de liberación constitutiva. Aunque es cierto, que en experimentos en los que hemos utilizado A23187 para permitir la entrada de Ca^{2+} hemos observado un incremento de la secreción de CgA-EGFP.

En las células PC12 la liberación de la CgA-EGFP que hemos observado ha ocurrido tras estimulación con 70 mM de K^+ . Con lo que estos gránulos a parte de asemejarse a los gránulos cromafines en características como el tamaño, el movimiento y el docking también son liberados únicamente ante un estímulo secretagogo.

40. La cinética de la exocitosis de proteínas y péptidos

La técnica de TIRFM ha permitido observar a tiempo real y de una manera directa la exocitosis de proteínas, péptidos y moléculas fluorescentes capaces de acumularse en el interior de las vesículas secretoras (Steyer et al., 1997). En los primeros estudios se utilizaron moléculas como la naranja de acridina que marcaban gránulos secretores y permitían hacer un seguimiento de los mismos y estudiar la liberación de la molécula por exocitosis (Steyer and Almers, 1999; Steyer et al., 1997). En estos trabajos la liberación ocurría entre 5 y 20 s.

Posteriormente, se empezaron a utilizar péptidos que son empaquetados en vesículas secretoras de la vía de secreción regulada a los que se les unen proteínas fluorescentes (Perrais et al., 2004; Taraska and Almers, 2004; Taraska et al., 2003). Ejemplos de este tipo son el neuro péptido Y (NPY) y el activador plasminógeno tisular (tPA), además se usaron marcadores de membrana como el FM4-64. La exocitosis se observa como un incremento abrupto en la intensidad de la luz y además suele aparecer una especie de “nube” en la zona de liberación debido a que el contenido difunde en el espacio extracelular. En células cromafines bovinas estimuladas, la liberación de NPY-EGFP es rápida, la intensidad de la señal aumenta y cae de manera exponencial con rapidez y desaparece (Perrais et al., 2004). En un bajo número de eventos (aprox. 4%) tras la “nube” se seguía observado señal vesicular sugiriendo que no todo el contenido fue liberado. Por el contrario, la liberación de tPA-EGFP es más lenta que la de NPY-EGFP, la constante de caída del NPY-EGFP es de 69 ms mientras que el tPA-EGFP es de 3 s. Además, el tPA-EGFP suele quedarse retenido en el gránulo, es decir, se libera el contenido parcialmente (Perrais et al., 2004). Resultados similares se han obtenido en células PC12 (Taraska et al., 2003; Tsuboi and Fukuda, 2007). Cuando ocurre la fusión el marcador de membrana FM4-64 disminuye su señal hasta que desaparece ya que se disemina por la membrana celular.

Diferentes trabajos demuestran que hay heterogeneidad en la manera en que las proteínas y péptidos vesiculares son liberados. Esas diferencias en la manera de liberación se deben tanto al tamaño del poro de fusión como al tamaño de la proteína. También se ha utilizado la sinaptobrevina unida a una proteína fluorescente, VAMP-pH (VAMP-pHluorin). Al comparar las exocitosis de NPY-GFP y VAMP-pH se observó que el patrón

de VAMP-pH era más lento, VAMP está integrada en la membrana vesicular y al fusionarse con la membrana plasmática se dispersa en la membrana plasmática (Tsuboi and Fukuda, 2007; Tsuboi and Rutter, 2003).

En otros trabajos se ha estudiado otra proteína de pequeño tamaño, la sincolina-GFP y se ha observado que se libera totalmente en la mayoría de los eventos en gránulos de insulina (Ma et al., 2004) y de manera muy rápida (esta proteína tiene unos 100 aminoácidos). Sin embargo, esa misma proteína expresada en células cromafines presenta liberación completa solo en el 33% de los eventos, el resto liberan el contenido parcialmente. Con lo que hay más factores a parte de la propia proteína que es liberada implicados en la regulación de la liberación.

Este tipo de aproximaciones también se han utilizado con proteínas que se secretan de manera constitutiva (Toomre et al., 2000). Y las cinéticas de liberación parecen ser similares a las de proteínas de secreción regulada.

Nuestros datos de liberación de CgA-EGFP son similares, en cuanto a tiempo y cinética, a la liberación de proteínas de alto peso molecular como tPA-EGFP. La CgA tiene unos 450 aminoácidos y el tPA tiene 520, el NPY es un péptido pequeño de 36 aminoácidos. Existe una gran correlación entre el tiempo de liberación y el tamaño de la proteína liberada, cuanto mayor sea la proteína más tardará en liberarse. Hemos caracterizado por primera vez cómo es la liberación de la CgA-EGFP en dos líneas celulares (HEK293 y PC12) *in vivo*, a tiempo real y de una manera directa gracias al uso del TIRFM.

Hemos observado diferencias en la liberación de CgA-EGFP en los dos tipos celulares empleados en este trabajo. La cinética de caída en las células HEK293 es más rápida que en las células PC12. Tal vez el hecho de que las células PC12 expresen CgA y otras graninas de manera endógena pueda explicar que la liberación sea más lenta. Quizás, en las células PC12 la presencia de los mecanismos de acidificación de los gránulos puede promover una mayor agregación de las graninas (Yoo, 1995; Yoo and Albanesi, 1991) y podría también retrasar la liberación. Mientras que en las células HEK293 al carecer de otras graninas y de los

mecanismos de acidificación, la liberación de CgA-EGFP se produce más rápido.

Se han descrito diversos tipos de exocitosis dependiendo si la totalidad del contenido vesicular es liberado o no. En nuestros experimentos hemos observado en las exocitosis de las células HEK293 dos tipos de liberación diferenciados que hemos asociado con liberación total y liberación parcial (fig. 23). En el caso de las PC12 hemos observado que prácticamente la totalidad de las exocitosis es de tipo parcial (fig. 33)

41. ¿Puede afectar la matriz extracelular a la exocitosis de péptidos?

A la hora de comparar la liberación de diferentes péptidos en diferentes publicaciones hay que tener en cuenta que hay muchos factores experimentales que pueden ser diferentes: el tipo celular, el tipo de proteína, la temperatura a la que se realizan los registros, etc. Todo esto dificulta la comparación.

En nuestro laboratorio hemos observado que incluso el uso de diferentes sustratos sobre los que se adhieren las células modifican la cinética de la liberación de las proteínas. En las células PC12 adheridas a colágeno la liberación de CgA-EGFP se ve ralentizada si las comparamos con las células que se adhirieron a Poli-D-Lisina. El colágeno debe formar una red que dificulta más la salida de la CgA-EGFP que la Poli-D-Lisina (fig 34)

Recientemente se ha demostrado que la eliminación de los residuos glucídicos de las proteínas de la membrana plasmática acelera la cinética de la exocitosis de catecolaminas (Trouillon and Ewing, 2013). Para lo cual las células se sometieron a digestión parcial de dichos glúcidos extracelulares (usando neuraminidasa) y se realizaron registros de amperometría con los que se llegó a la conclusión de que la difusión es 2,2 veces mayor que en las células intactas. Por tanto los residuos glucídicos extracelulares de la membrana plasmática formarían una red que retrasaría la llegada de las catecolaminas al electrodo, lo cual es algo similar a lo que nos ocurre con la CgA-EGFP y el colágeno. Lo cual propondría un posible papel regulador de la exocitosis de la matriz extracelular.

42. ¿Es posible detectar liberación cuántica de catecolaminas en células carentes de la vía de secreción regulada?

Una de las funciones de las graninas que se ha estudiado en los últimos años es su implicación en la granulogénesis. Experimentos en células PC12 en las que se abolió la expresión de la CgA utilizando RNA interferente provocaron una gran disminución del número de gránulos secretores (Kim et al., 2001). En ratones KO para CgA también se observó una disminución del número de gránulos secretores (Kim et al., 2005; Mahapatra et al., 2005). Sin embargo, otro laboratorio también obtuvo un ratón KO para esta proteína y no vieron diferencias en el número de gránulos secretores (Hendy et al., 2006). En nuestro laboratorio hemos estudiado la exocitosis de células cromafines provenientes de ratones carentes de cromograninas, en concreto, hemos observado que en la cepa CgA&CgB-KO la frecuencia de eventos de exocitosis se ve disminuida lo cual podría explicarse porque la granulogénesis esté impedida por la ausencia de ambas graninas (Diaz-Vera et al., 2012). Experimentos de interferencia de la expresión de la CgB en células PC12 desembocaron también en una disminución del número de gránulos (Huh et al., 2003). También se ha observado la capacidad granulogénica de las graninas en líneas celulares no neuroendocrinas (Kim et al., 2001; Montero-Hadjadje et al., 2009).

Nosotros también hemos observado que la CgA-EGFP genera un patrón de expresión vesicular y que además es liberada por exocitosis tanto en las células PC12 como en las HEK293. Este resultado fue el punto de partida para utilizar a las HEK293 que expresan CgA-EGFP como un modelo simplificado para estudiar el papel de la CgA en la acumulación y exocitosis de CA.

La ventaja de este modelo es la ausencia de otras graninas con lo que las observaciones serán motivadas únicamente por la expresión de la CgA-EGFP. Los inconvenientes son carecer de la vía de síntesis de catecolaminas (que podemos soslayar incubando las células con L-DOPA) y la carencia de transportadores de monoaminas con lo cual la capacidad de acumulación se va a ver limitada por la capacidad que tenga la L-DOPA de atravesar las membranas celulares y vesicular por simple difusión.

Diversos laboratorios han utilizado procedimientos de incubación con diferentes transmisores para poder detectar y estudiar por medio de amperometría la exocitosis en diferentes tipos celulares. En células β -pancreáticas y en la línea celular INS-1, tras la incubación con serotonina se ha detectado la liberación cuántica por medio de la amperometría (Yang and Gillis, 2004; Zhou and Misler, 1996). También se han incubado con DA líneas celulares corticotropas como la AtT-20, en células gonadotropas y en células granulares de cerebelo y se han logrado detectar espigas amperométricas (Kim et al., 2000). Incluso en células cuya vía de secreción es constitutiva como las células epiteliales del conducto pancreático tras incubarlas con dopamina o serotonina se observa liberación (Koh et al., 2000). También se ha expresado VMAT en neuronas de hipocampo y se ha detectado liberación cuántica de monoaminas (tras incubar con L-DOPA) en el soma de dichas neuronas (Li et al., 2005). En los terminales presinápticos de las células bipolares retinales de *Carassius auratus* se ha detectado liberación de noradrenalina (usándola como falso neurotransmisor para permitir la detección amperométrica) (Grabner and Zenisek, 2013).

Nosotros hemos sido capaces de detectar espigas amperométricas en estas células que expresan CgA-EGFP tras incubarlas con L-DOPA. Mientras que en las células que no expresan dicha proteína no ha sido posible detectar liberación cuántica de L-DOPA. Este resultado realizado *in vivo* demuestra que la CgA permite la acumulación de CA en las vesículas secretoras. Aquellos experimentos clásicos realizados *in vitro* con Cgs y CA (Helle et al., 1985; Videen et al., 1992) han podido ser reproducidos *in vivo* en un sistema celular sencillo con la expresión de una única granina y la incubación con una catecolamina.

43. El papel de la matriz intravesicular en la acumulación de CA

Diversos son los factores implicados en la acumulación de catecolaminas en el interior vesicular de los gránulos cromafines. La síntesis de CA es el primer factor ya que va a determinar la cantidad de CA disponibles en el citoplasma para ser almacenadas en los gránulos. Dicha ruta de síntesis se encuentra finamente regulada (Lenartowski and Goc, 2011; Pereira and Sulzer, 2012). El paso siguiente consiste en la entrada

de CA al interior vesicular, esto ocurre por medio de los VMATs que van a transportar las catecolaminas citosólicas al interior vesicular. Los VMATs actúan como antiportadores de protones y CA. Por lo que es necesario la existencia de una fuerza protón-motriz generada por la V-ATPasa. Estos transportadores son altamente eficientes y se logran concentraciones intravesiculares 5 órdenes de magnitud mayores respecto al citoplasma (Wimalasena, 2011). La cantidad de catecolaminas calculada en el interior vesicular ronda los 0,5 - 1M (Albillos et al., 1997; Jankowski et al., 1993; Montesinos et al., 2008) lo cual supera la osmolaridad que permitiría la integridad del gránulo. Además en el interior granular existen altas concentraciones de otros solutos alcanzándose osmolaridades teóricas de ≈ 1500 mOsm (Borges et al., 2010). Por tanto, en la acumulación de CA no solo participan los VMATs y la V-ATPasa, el tercer componente clave es la matriz intravesicular.

Diversos trabajos han demostrado que la incubación con L-DOPA provoca un aumento del tamaño cuántica de las espigas amperométricas (Colliver et al., 2000; Sombers et al., 2005). En estos trabajos se ha observado un incremento significativo en el tamaño de la matriz y del halo vesicular, siendo el incremento del tamaño del halo mucho más patente (el volumen de la matriz se incrementa en un 70% mientras que el halo en un 300%) (Sombers et al., 2005). Ambos mecanismos permitirían mantener la concentración intravesicular de solutos en valores isotónicos. En nuestro laboratorio hemos observado que los ratones carentes de cromograninas tienen impedida esta capacidad de acumular más cantidad de catecolaminas (Diaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008).

Si volvemos a nuestro modelo simplificado en las células HEK293 donde solo tendremos la expresión de una granina (CgA-EGFP) y la incubación con L-DOPA, observamos que estos dos factores son suficientes para promover la mayor acumulación de L-DOPA en aquellas células que expresan CgA-EGFP. En este caso la ausencia de transportadores de monoaminas provoca que la capacidad de entrada de L-DOPA esté limitada a su capacidad de difundir a través de membranas. Por eso, la cinética de acumulación (fig 27) no llega a un estado de saturación en los tiempos que hemos utilizado para el experimento, tal vez

porque la capacidad de la L-DOPA para entrar al interior de las vesículas es pequeña si no está favorecida por un transporte activo. A pesar de esto, hemos demostrado que las células HEK293 que expresan CgA-EGFP acumulan más L-DOPA que las control.

En las células PC12 con todos los mecanismos de acumulación y síntesis de catecolaminas en activo, también hemos observado que la incubación con L-DOPA provoca una mayor acumulación de DA en aquellas células que están expresando CgA-EGFP. Este resultado podría ser debido a una mayor cantidad de CgA por vesícula o por un mayor número de vesículas o por ambos motivos. Para poder dilucidar cuál de los dos mecanismos estaría implicado hemos realizado detección amperométrica en célula única cuyos resultados se discuten en el siguiente apartado. Lo que sí podemos observar con estos experimentos de acumulación de DA (fig. 36) es que tanto las células control como las que expresan CgA-EGFP llegan al estado estacionario en el mismo tiempo (a los 60 min) pero la cantidad de DA acumulada en el estado estacionario de las células que expresan CgA-EGFP es mayor que en las control.

44. La modulación de la exocitosis por la matriz intravesicular

La exocitosis como proceso crucial para la vida está finamente regulada. Desde hace años se han ido estudiando los diversos factores que modulan la exocitosis como las proteínas encargadas de la fusión (SNARES, sinaptotagminas, complexinas, MUNCs etc) (Jahn and Fasshauer, 2012; Sudhof and Rizo, 2011), las rutas de síntesis de los transmisores (Kvetnansky et al., 2009; Lenartowski and Goc, 2011), los transportadores de transmisores (Wimalasena, 2011), etc. En nuestro laboratorio hemos dedicado los últimos años a estudiar los factores intravesiculares que también tienen un papel importante en la exocitosis, como el pH (Camacho et al., 2006), el Ca^{2+} (Camacho et al., 2008) y más recientemente las proteínas constituyentes de la matriz, las graninas (Borges et al., 2004; Diaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008; Reigada et al., 2003; Tabares et al., 2003).

El uso de la amperometría ha permitido la detección de la liberación de catecolaminas con alta resolución temporal, pudiendo discernir eventos individuales de exocitosis y pudiendo analizar la cinética de la liberación de

catecolaminas. Haciendo cálculos teóricos basados en la difusión, se hicieron modelos de cómo sería la cinética de liberación considerando únicamente la difusión, al comparar esos resultados con los resultados obtenidos experimentales se observó que las espigas amperométricas experimentales tenían una duración ($t_{1/2}$) mayor que lo calculado simplemente por difusión lo cual indicaría que hay un factor adicional que está modulando la cinética de liberación. Este factor sería el tiempo necesario para que ocurra la disociación de las catecolaminas de la matriz condensada de los gránulos secretores (Jankowski et al., 1993).

La agregación o empaquetamiento de las graninas es dependiente de pH y de Ca^{2+} , a pH ácidos y a altas concentraciones de Ca^{2+} (situación intravesicular) estas proteínas están más agregadas (Yoo, 1993; Yoo, 1995; Yoo and Albanesi, 1990; Yoo and Ferretti, 1993). Las vesículas al fusionarse estarán en contacto con el medio extracelular a un pH mayor que el intravesicular lo que promoverá la disociación de las graninas y la liberación de las CA. La matriz intravesicular se puede considerar como un gel de intercambio iónico, (Nanavati and Fernandez, 1993; Reigada et al., 2003). La entrada de iones Na^+ (Gong et al., 2007) y agua parece provocar el hinchamiento de la misma y la disociación de los solutos adsorbidos a la matriz intravesicular (Almers and Neher, 1987; Zimmerberg et al., 1987).

La posibilidad de modificar los componentes principales de la matriz intravesicular ha permitido ahondar en el papel de la misma en la acumulación y exocitosis de catecolaminas.

En nuestros resultados hemos observado que la expresión de CgA-EGFP en células PC12, incrementa la carga total media, la altura y acelera el ascenso de las espigas amperométricas (fig. 37). Es decir, estos gránulos tienen una mayor capacidad de almacenar catecolaminas y liberarlas en el momento de la exocitosis. Además la primera parte de la espiga se ve acelerada, lo cual indicaría que la salida de CA del interior de las vesículas se ve favorecida. Por otro lado, cuando utilizamos la estrategia de incubación con L-DOPA seguimos viendo una mayor carga total en las espigas de las células que expresan CgA-EGFP (tabla 2). Además, observamos que la duración de las espigas ($t_{1/2}$) se ve incrementada lo cual concuerda con la hipótesis de que la matriz

intravesicular provoca un retraso en la llegada de catecolaminas al electrodo (Jankowski et al., 1993).

Cuando representamos los histogramas de frecuencia de $Q^{1/3}$ observamos que en las células PC12 que expresan CgA-EGFP y que han sido incubadas con L-DOPA aparece una distribución que se ajusta a dos gaussianas (fig. 39). En esas células existe una segunda “población” de vesículas que tiene una mayor Q , población que en las células control (PC12 incubadas con L-DOPA) no aparece. Es decir, con la maquinaria normal de las células PC12, se llega a unos valores de Q que no pueden ser incrementados. Cuando aumentamos la expresión de una de las proteínas de la matriz (CgA-EGFP) aparece esa nueva “población” de vesículas de Q mayor. Con lo cual la CgA contribuye a aumentar la capacidad de acumulación de CA.

Por tanto, las cromograninas son un factor implicado en la regulación de la exocitosis. En el laboratorio hemos observado en trabajos previos que la ausencia de cromograninas modifica la exocitosis (Díaz-Vera et al., 2012; Díaz-Vera et al., 2010; Montesinos et al., 2008). Y ahora con este estudio observamos que un incremento de la expresión de la CgA-EGFP también altera los parámetros de la exocitosis en el sentido opuesto a la ausencia de cromograninas.

Siempre nos ha intrigado la gran variabilidad de eventos de exocitosis observados por amperometría, en condiciones control aparecen espigas de diferentes tamaños y con diferentes cinéticas, y también existe una gran variabilidad de gránulos cuando observamos imágenes de microscopía electrónica, hay variabilidad de tamaños tanto de las vesículas como de las matrices y los halos de las mismas. ¿Podríamos llegar a pensar que las cantidades y/o proporciones de graninas expresadas en cada gránulo pueden llegar a condicionar su morfología así como su capacidad de almacenar y liberar CA? Nuestros datos parecen indicar que esto podría ser posible, aunque sería necesario realizar aproximaciones experimentales más directas. Sería interesante poder correlacionar la cantidad de cromograninas expresada en una vesícula con la cantidad de catecolaminas liberadas.

Al analizar la relación I_{max} vs Q observamos que en las células PC12 tratadas con L-DOPA (fig 40) a tamaños iguales de Q la I_{max} de las que expresan CgA-EGFP es menor esto se debería a que las células que están expresando la proteína quimérica tardan más en disociarse las CA de la matriz y tardan más en llegar a la superficie del electrodo y por tanto llega menos cantidad por eso a igual Q la I_{max} es menor y la $t_{1/2}$ será mayor.

En definitiva en este trabajo hemos demostrado la capacidad de las cromograninas de incrementar la capacidad de acumulación de CA de los gránulos secretores y cómo pueden ser un factor clave en la modulación de la exocitosis actuando en las últimas etapas de la misma.

Conclusiones / Conclusions

Conclusiones:

- 1) La CgA-EGFP es capaz de generar vesículas capaces de ser liberadas por exocitosis en células HEK293 y PC12.
- 2) La exocitosis de la CgA-EGFP presenta, al menos, dos patrones de liberación en las células HEK293: parcial y total. En las células PC12 la liberación es parcial en casi todos los eventos.
- 3) Las células HEK293, que expresan la proteína quimérica CgA-EGFP, acumulan más aminas que las células control
- 4) La CgA-EGFP incrementa en la velocidad de acumulación de aminas en las células HEK293.
- 5) Las células PC12 que expresan CgA-EGFP acumulan más DA que las células control.
- 6) Las células HEK293 que expresan CgA-EGFP liberan L-DOPA por exocitosis como se evidencia por amperometría.
- 7) La cinética de la exocitosis de catecolaminas en células PC12 que expresan CgA-EGFP está modificada.
- 8) La matriz extracelular enlentece la liberación de CgA-EGFP de vesículas secretoras en células PC12.

Conclusions:

- 1) CgA-EGFP generates granule-like vesicles that are released by exocytosis in HEK293 cells and PC12 cells.
- 2) The exocytosis of CgA-EGFP shows two modes of exocytosis in HEK293 cells: partial release and full release. In PC12 cells the release of CgA-EGFP is partial in almost all the events.
- 3) HEK293 cells expressing CgA-EGFP accumulate more amines than control cells.
- 4) CgA-EGFP accelerates the accumulation of amines in HEK293 cells.
- 5) PC12 cells expressing CgA-EGFP accumulate more DA than control cells
- 6) HEK293 cells expressing CgA-EGFP are able to release L-DOPA by exocytosis as it is shown by amperometry.
- 7) The kinetic of exocytosis of catecholamines is modified in PC12 cells that express CgA-EGFP.

- 8) The extracellular matrix slows down the release of CgA-EGFP in PC12 cells.

Bibliografía

Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Alvarez de Toledo, G. and Lindau, M. (1997). The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* **389**, 509-12.

Almers, W. and Neher, E. (1987). Gradual and stepwise changes in the membrane capacitance of rat peritoneal mast cells. *J Physiol* **386**, 205-17.

Alonso, M. T., Barrero, M. J., Michelena, P., Carnicero, E., Cuchillo, I., Garcia, A. G., Garcia-Sancho, J., Montero, M. and Alvarez, J. (1999). Ca²⁺-induced Ca²⁺ Release in Chromaffin Cells Seen from inside the ER with Targeted Aequorin, vol. 144, pp. 241-254.

Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R. and Fernandez, J. M. (1993). Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* **363**, 554-558.

Allersma, M. W., Wang, L., Axelrod, D. and Holz, R. W. (2004). Visualization of regulated exocytosis with a granule-membrane probe using total internal reflection microscopy. *Mol Biol Cell* **15**, 4658-68.

Anton, A. H. and Sayre, D. F. (1962). A study of the factors affecting the aluminum oxide-trihydroxyindole procedure for the analysis of catecholamines. *J Pharmacol Exp Ther* **138**, 360-75.

Apps, D. K. (1997). Membrane and soluble proteins of adrenal chromaffin granules, vol. 8, pp. 121-31.

Arvan, P. and Castle, D. (1998). Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward. *Biochem J* **332 (Pt 3)**, 593-610.

Axelrod, D. (1981). Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *J Cell Biol* **89**, 141-5.

Bader, M. F., Thierse, D., Aunis, D., Ahnert-Hilger, G. and Gratzl, M. (1986). Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J Biol Chem* **261**, 5777-83.

Baker, P. F. and Knight, D. E. (1978). A high-voltage technique for gaining rapid access to the interior of secretory cells [proceedings]. *J Physiol* **284**, 30P-31P.

Baker, P. F. and Knight, D. E. (1979). Calcium-dependent exocytosis in 'leaky' bovine adrenal medullary cells has a specific requirement for magnesium adenosine triphosphate [proceedings]. *J Physiol* **295**, 89P.

Banks, P. and Helle, K. (1965). The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J* **97**, 40C-41C.

Barroso-Gonzalez, J., Machado, J. D., Garcia-Exposito, L. and Valenzuela-Fernandez, A. (2009). Moesin regulates the trafficking of nascent clathrin-coated vesicles. *J Biol Chem* **284**, 2419-34.

Bartolomucci, A., Possenti, R., Mahata, S. K., Fischer-Colbrie, R., Loh, Y. P. and Salton, S. R. (2011). The extended granin family: structure, function, and biomedical implications. *Endocr Rev* **32**, 755-97.

Baur, J. E., Kristensen, E. W., May, L. J., Wiedemann, D. J. and Wightman, R. M. (1988). Fast-scan voltammetry of biogenic amines. *Anal Chem* **60**, 1268-72.

Becherer, U. and Rettig, J. (2006). Vesicle pools, docking, priming, and release. *Cell Tissue Res* **326**, 393-407.

Berberian, K., Torres, A. J., Fang, Q., Kisler, K. and Lindau, M. (2009). F-Actin and Myosin II Accelerate Catecholamine Release from Chromaffin Granules, vol. 29, pp. 863-870.

Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J. and Spiess, M. (2004). Expression of Regulated Secretory Proteins Is Sufficient to Generate Granule-like Structures in Constitutively Secreting Cells, vol. 279, pp. 20242-20249.

Blaschko, H., Comline, R. S., Schneider, F. H., Silver, M. and Smith, A. D. (1967). Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation, vol. 215, pp. 58-9.

Blaschko, H., Hagen, P. and Welch, A. D. (1955). Observations on the intracellular granules of the adrenal medulla. *J Physiol* **129**, 27-49.

Blasi, J., Chapman, E. R., Yamasaki, S., Binz, T., Niemann, H. and Jahn, R. (1993). Botulinum neurotoxin C1 blocks neurotransmitter release by means of cleaving HPC-1/syntaxin. *EMBO J* **12**, 4821-8.

Borges, R., Delgado, G. and Diaz, J. (2004). New Insights About the Functional Role of Chromogranins in the Latest Steps of Exocytosis. *Current Medicinal Chemistry* **4**.

Borges, R., Diaz-Vera, J., Dominguez, N., Arnau, M. R. and Machado, J. D. (2010). Chromogranins as regulators of exocytosis. *J Neurochem* **114**, 335-43.

Borges, R., Sala, F. and Garcia, A. G. (1986). Continuous monitoring of catecholamine release from perfused cat adrenals. *J Neurosci Methods* **16**, 289-300.

Borges, R., Travis, E. R., Hochstetler, S. E. and Wightman, R. M. (1997). Effects of External Osmotic Pressure on Vesicular Secretion from Bovine Adrenal Medullary Cells, vol. 272, pp. 8325-8331.

Brooks, J. C. and Carmichael, S. W. (1987). Ultrastructural demonstration of exocytosis in intact and saponin-permeabilized cultured bovine chromaffin cells. *Am J Anat* **178**, 85-9.

Burgoyne, R. D. and Handel, S. E. (1994). Activation of Exocytosis by Gtp Analogs in Adrenal Chromaffin Cells Revealed by Patch-Clamp Capacitance Measurement. *Febs Letters* **344**, 139-142.

Burgoyne, R. D. and Morgan, A. (2003). Secretory granule exocytosis. In *Physiological Reviews*, vol. 83, pp. 581-632.

Camacho, M., Machado, J. D., Alvarez, J. and Borges, R. (2008). Intravesicular calcium release mediates the motion and exocytosis of secretory organelles: a study with adrenal chromaffin cells. *J Biol Chem* **283**, 22383-9.

Camacho, M., Machado, J. D., Montesinos, M. S., Criado, M. and Borges, R. (2006). Intragranular pH rapidly modulates exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* **96**, 324-34.

Colliver, T. L., Pyott, S. J., Achalabun, M. and Ewing, A. G. (2000). VMAT-Mediated changes in quantal size and vesicular volume. *J Neurosci* **20**, 5276-82.

Coupland, R. E. (1965a). (Electron Microscopic Observations on the Structure of the Rat Adrenal Medulla. I. The Ultrastructure and Organization of Chromaffin Cells in the Normal Adrenal Medulla.). *J Anat* **99**, 231-54.

Coupland, R. E. (1965b). Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *J Anat* **99**, 255-72.

Coupland, R. E. and Hopwood, D. (1966). The mechanism of the differential staining reaction for adrenaline-and noreadrenaline-storing granules in tissues fixed in glutaraldehyde. *J Anat* **100**, 227-43.

Courel, M., Rodemer, C., Nguyen, S. T., Pance, A., Jackson, A. P., O'Connor D, T. and Taupenot, L. (2006). Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells: identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin A. *J Biol Chem* **281**, 38038-51.

Courel, M., Soler-Jover, A., Rodriguez-Flores, J. L., Mahata, S. K., Elias, S., Montero-Hadjadje, M., Anouar, Y., Giuly, R. J., O'Connor, D. T. and Taupenot, L. (2010). Pro-hormone secretogranin II regulates dense core secretory granule biogenesis in catecholaminergic cells. *J Biol Chem* **285**, 10030-43.

Courel, M., Vasquez, M. S., Hook, V. Y., Mahata, S. K. and Taupenot, L. (2008). Sorting of the Neuroendocrine Secretory Protein Secretogranin II into the Regulated Secretory Pathway Role of N- and C- Terminal α -helical domains. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* **283**, 11807-11822.

Crivellato, E., Nico, B. and Ribatti, D. (2008). The chromaffin vesicle: advances in understanding the composition of a versatile, multifunctional secretory organelle, vol. 291, pp. 1587-602.

Chanat, E. and Huttner, W. B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-Golgi network, vol. 115, pp. 1505-1519.

Chanat, E., Weiss, U., Huttner, W. B. and Tooze, S. A. (1993). Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *EMBO J* **12**, 2159-68.

Cheek, T. R., Jackson, T. R., O'Sullivan, A. J., Moreton, R. B., Berridge, M. J. and Burgoyne, R. D. (1989). Simultaneous measurements of cytosolic calcium and secretion in single bovine adrenal chromaffin cells by fluorescent imaging of fura-2 in cocultured cells. *J Cell Biol* **109**, 1219-27.

Chien, J. B., Wallingford, R. A. and Ewing, A. G. (1990). Estimation of free dopamine in the cytoplasm of the giant dopamine cell of *Planorbis corneus* by voltammetry and capillary electrophoresis, vol. 54, pp. 633-8.

Chow, R. and von Ruden, L. (1995). Electrochemical detection of secretion from single cells. In *Single-Channel Recording*, (eds B. Sackman and E. Neher), pp. 245-275. New York: Plenum Press.

Chow, R. H., von Ruden, L. and Neher, E. (1992). Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature* **356**, 60-3.

D'Alessandro, R. and Meldolesi, J. (2013). Expression and function of the dense-core vesicle membranes are governed by the transcription repressor REST. *FEBS Lett.* 2013 May 4. pii: S0014-5793(13)00319-0. doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.024.

Dale, H. H., Feldberg, W. and Vogt, M. (1936). Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. *J Physiol* **86**, 353-80.

Darios, F., Wasser, C., Shakirzyanova, A., Giniatullin, A., Goodman, K., Munoz-Bravo, J. L., Raino, J., Jorgacevski, J., Kreft, M., Zorec, R. et al. (2009). Sphingosine facilitates SNARE complex assembly and activates synaptic vesicle exocytosis. *Neuron* **62**, 683-94.

Daubner, S. C., Le, T. and Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys* **508**, 1-12.

Degtyar, V. E., Allersma, M. W., Axelrod, D. and Holz, R. W. (2007). Increased motion and travel, rather than stable docking, characterize the last moments before secretory granule fusion, vol. 104, pp. 15929-15934.

Del Castillo, J. and Katz, B. (1954). Quantal components of the end-plate potential. *Journal of Physiology* **124**, 560-573.

Díaz-Flores, L., Gutierrez, R., Varela, H., Valladares, F., Alvarez-Arguelles, H. and Borges, R. (2008). Histogenesis and morphofunctional characteristics of chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 145-63.

Díaz-Vera, J., Camacho, M., Machado, J., Dominguez, N., Montesinos, M., Hernandez-Fernaud, J., Lujan, R. and Borges, R. (2012). Chromogranins A and B are key proteins in amine accumulation but the catecholamine secretory pathway is conserved without them. *FASEB J.* **26**, 430-438.

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

Díaz-Vera, J., Morales, Y. G., Hernandez-Fernaud, J. R., Camacho, M., Montesinos, M. S., Calegari, F., Huttner, W. B., Borges, R. and Machado, J. D. (2010). Chromogranin B gene ablation reduces the catecholamine cargo and decelerates exocytosis in chromaffin secretory vesicles. *J Neurosci* **30**, 950-7.

Dikeakos, J. D. and Reudelhuber, T. L. (2007). Sending proteins to dense core secretory granules: still a lot to sort out, vol. 177, pp. 191-196.

Douglas, W. W. and Rubin, R. P. (1961a). Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nauchni Tr Vissh Med Inst Sofiia* **192**, 1087-9.

Douglas, W. W. and Rubin, R. P. (1961b). The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol (London)* **159**, 40-57.

Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Sudhof, T. C. and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J* **18**, 4372-82.

Dunn, L. A. and Holz, R. W. (1983). Catecholamine secretion from digitonin-treated adrenal medullary chromaffin cells. *J Biol Chem* **258**, 4989-93.

Eisenhofer, G., Keiser, H., Friberg, P., Mezey, E., Huynh, T.-T., Hiremagalur, B., Ellingson, T., Duddempudi, S., Eijsbouts, A. and Lenders, J. W. M. (1998). Plasma Metanephrines Are Markers of Pheochromocytoma Produced by Catechol-O-Methyltransferase Within Tumors, vol. 83, pp. 2175-2185.

Elhamdani, A., Brown, M. E., Artalejo, C. R. and Palfrey, H. C. (2000). Enhancement of the dense-core vesicle secretory cycle by

glucocorticoid differentiation of PC12 cells: characteristics of rapid exocytosis and endocytosis. *J Neurosci* **20**, 2495-503.

Elias, S., Charlène, D., Courel, M., Anouar, Y. and Montero-Hadjadje, M. (2010). Chromogranin A as a Crucial Factor in the Sorting of Peptide Hormones to Secretory Granules. *Cell Mol Neurobiol*.

Falkensammer, G., Fischer-Colbrie, R., Richter, K. and Winkler, H. (1985). Cell-free and cellular synthesis of chromogranin A and B of bovine adrenal medulla, vol. 14, pp. 735-46.

Fang, Q., Berberian, K., Gong, L. W., Hafez, I., Sorensen, J. B. and Lindau, M. (2008). The role of the C terminus of the SNARE protein SNAP-25 in fusion pore opening and a model for fusion pore mechanics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 15388-92.

Fatt, P. and Katz, B. (1952). Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J Physiol* **117**, 109-28.

Fernandez, J. M., Villalon, M. and Verdugo, P. (1991). Reversible condensation of mast cell secretory products in vitro. *Biophys J* **59**, 1022-7.

Fischer-Colbrie, R., Hagn, C., Kilpatrick, L. and Winkler, H. (1986). Chromogranin C: a third component of the acidic proteins in chromaffin granules. *J Neurochem* **47**, 318-21.

Gaidarov, I., Santini, F., Warren, R. A. and Keen, J. H. (1999). Spatial control of coated-pit dynamics in living cells. *Nat Cell Biol* **1**, 1-7.

Garcia, A. G., Garcia-De-Diego, A. M., Gandia, L., Borges, R. and Garcia-Sancho, J. (2006). Calcium signaling and exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Physiol Rev* **86**, 1093-131.

Gasnier, C., Karine, L., Olivier, R., Jean-Marc, S., Dominique, A. and Marie-Hélène, M.-B. (2004). Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules, vol. 4, pp. 1789-1801.

Gayen, J. R., Saberi, M., Schenk, S., Biswas, N., Vaingankar, S. M., Cheung, W. W., Najjar, S. M., O'Connor, D. T., Bandyopadhyay, G. and Mahata, S. K. (2009). A Novel Pathway of Insulin Sensitivity in Chromogranin A Null Mice, vol. 284, pp. 28498-28509.

Gerdes, H. H., Rosa, P., Phillips, E., Baeuerle, P. A., Frank, R., Argos, P. and Huttner, W. B. (1989). The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation, vol. 264, pp. 12009-12015.

Glavinovic, M. I., Vitale, M. L. and Trifaro, J. M. (1998). Comparison of vesicular volume and quantal size in bovine chromaffin cells. *Neuroscience* **85**, 957-68.

Gong, L. W., de Toledo, G. A. and Lindau, M. (2007). Exocytotic catecholamine release is not associated with cation flux through channels in the vesicle membrane but Na⁺ influx through the fusion pore. *Nat Cell Biol* **9**, 915-22.

Grabner, C. P., Price, S. D., Lysakowski, A. and Fox, A. P. (2005). Mouse chromaffin cells have two populations of dense core vesicles. *J Neurophysiol* **94**, 2093-104.

Grabner, C. P. and Zenisek, D. (2013). Amperometric resolution of a prespike stammer and evoked phases of fast release from retinal bipolar cells. *J Neurosci* **33**, 8144-58.

Green, D. J. and Perlman, R. L. (1981). On-line measurement of catecholamine secretion. *Anal Biochem* **110**, 270-6.

Greene, L. A. and Tischler, A. S. (1976). Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor, vol. 73, pp. 2424-2428.

Gundelfinger, E. D., Kessels, M. M. and Qualmann, B. (2003). Temporal and spatial coordination of exocytosis and endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **4**, 127.

Gupta, N., Bark, S. J., Lu, W. D., Taupenot, L., O'Connor, D. T., Pevzner, P. and Hook, V. (2010). Mass spectrometry-based neuropeptidomics of secretory vesicles from human adrenal medullary pheochromocytoma reveals novel peptide products of prohormone processing. *J Proteome Res* **9**, 5065-75.

Hamill, O. P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. and Sigworth, F. J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* **391**, 85-100.

Han, L., Suda, M., Tsuzuki, K., Wang, R., Ohe, Y., Hirai, H., Watanabe, T., Takeuchi, T. and Hosaka, M. (2008). A large form of secretogranin III functions as a sorting receptor for chromogranin A aggregates in PC12 cells. *Mol Endocrinol* **22**, 1935-49.

Helle, K. B., Marley, P. D., Angeletti, R. H., Aunis, D., Galindo, E., Small, D. H. and Livett, B. G. (1993). Chromogranin A: secretion of processed products from the stimulated retrogradely perfused bovine adrenal gland. *J Neuroendocrinol* **5**, 413-20.

Helle, K. B., Reed, R. K., Pihl, K. E. and Serck-Hanssen, G. (1985). Osmotic properties of the chromogranins and relation to osmotic pressure in catecholamine storage granules. *Acta Physiol Scand* **123**, 21-33.

Hendy, G. N., Li, T., Girard, M., Feldstein, R. C., Mulay, S., Desjardins, R., Day, R., Karaplis, A. C., Tremblay, M. L. and Canaff, L.

(2006). Targeted Ablation of the Chromogranin A (Chga) Gene: Normal Neuroendocrine Dense-Core Secretory Granules and Increased Expression of Other Granins, vol. 20, pp. 1935-1947.

Hosaka, M., Suda, M., Sakai, Y., Izumi, T., Watanabe, T. and Takeuchi, T. (2004). Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem* **279**, 3627-34.

Hosaka, M. and Watanabe, T. (2010). Secretogranin III: a bridge between core hormone aggregates and the secretory granule membrane. *Endocr J* **57**, 275-86.

Hosaka, M., Watanabe, T., Sakai, Y., Uchiyama, Y. and Takeuchi, T. (2002). Identification of a Chromogranin A Domain That Mediates Binding to Secretogranin III and Targeting to Secretory Granules in Pituitary Cells and Pancreatic beta -Cells, vol. 13, pp. 3388-3399.

Huber, K. (2006). The sympathoadrenal cell lineage: Specification, diversification, and new perspectives. *Developmental Biology* **298**, 335-343.

Huh, Y. H., Jeon, S. H. and Yoo, S. H. (2003). Chromogranin B-induced secretory granule biogenesis: comparison with the similar role of chromogranin A. *J Biol Chem* **278**, 40581-9.

Huttner, W. B. and Natori, S. (1995). Regulated secretion. Helper proteins for neuroendocrine secretion. *Curr Biol* **5**, 242-5.

Jahn, R. and Fasshauer, D. (2012). Molecular machines governing exocytosis of synaptic vesicles. *Nature* **490**, 201-7.

Jankowski, J. A., Schroeder, T. J., Ciolkowski, E. L. and Wightman, R. M. (1993). Temporal Characteristics of Quantal Secretion of Catecholamines from Adrenal-Medullary Cells. *Journal of biological chemistry* **268**, 14694-14700.

Kawagoe, K. T., Zimmerman, J. B. and Wightman, R. M. (1993). Principles of voltammetry and microelectrode surface states. *J Neurosci Methods* **48**, 225-40.

Kim, K. T., Koh, D. S. and Hille, B. (2000). Loading of oxidizable transmitters into secretory vesicles permits carbon-fiber amperometry. *J Neurosci* **20**, RC101.

Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E. and Loh, Y. P. (2001). Chromogranin A, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell* **106**, 499-509.

Kim, T., Zhang, C.-f., Sun, Z., Wu, H. and Loh, Y. P. (2005). Chromogranin A Deficiency in Transgenic Mice Leads to Aberrant Chromaffin Granule Biogenesis, vol. 25, pp. 6958-6961.

Knight, D. E. and Baker, P. F. (1983). The phorbol ester TPA increases the affinity of exocytosis for calcium in 'leaky' adrenal medullary cells. *FEBS Lett* **160**, 98-100.

Knowles, M. K., Barg, S., Wan, L., Midorikawa, M., Chen, X. and Almers, W. (2010). Single secretory granules of live cells recruit syntaxin-1 and synaptosomal associated protein 25 (SNAP-25) in large copy numbers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20810-5.

Kobayashi, S., Miyabayashi, T., Uchida, T. and Yanaihara, N. (1985). Met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 in large-cored vesicles of splanchnic nerve terminals innervating guinea pig adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett* **53**, 247-52.

Koh, D. S., Moody, M. W., Nguyen, T. D. and Hille, B. (2000). Regulation of exocytosis by protein kinases and Ca(2+) in pancreatic duct epithelial cells. *J Gen Physiol* **116**, 507-20.

Kopell, W. N. and Westhead, E. W. (1982). Osmotic pressures of solutions of ATP and catecholamines relating to storage in chromaffin granules. *J Biol Chem* **257**, 5707-10.

Koshimizu, H., Kim, T., Cawley, N. X. and Loh, Y. P. (2010). Chromogranin A: A new proposal for trafficking, processing and induction of granule biogenesis. *Regulatory Peptides In Press*.

Kromer, A., Glombik, M. M., Huttner, W. B. and Gerdes, H. H. (1998). Essential role of the disulfide-bonded loop of chromogranin B for sorting to secretory granules is revealed by expression of a deletion mutant in the absence of endogenous granin synthesis. *J Cell Biol* **140**, 1331-46.

Kuri, B. A., Chan, S. A. and Smith, C. B. (2009). PACAP regulates immediate catecholamine release from adrenal chromaffin cells in an activity-dependent manner through a protein kinase C-dependent pathway. *J Neurochem* **110**, 1214-25.

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

Lenartowski, R. and Goc, A. (2011). Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene. *Int J Dev Neurosci* **29**, 873-83.

Leszczyszyn, D. J., Jankowski, J. A., Viveros, O. H., Diliberto, E. J., Near, J. A. and Wightman, R. M. (1990). Nicotinic Receptor-Mediated Catecholamine Secretion from Individual Chromaffin Cells - Chemical Evidence for Exocytosis. *Journal of biological chemistry* **265**, 14736-14737.

Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A. and Udenfriend, S. (1965). ELUCIDATION OF THE RATE-LIMITING STEP IN NOREPINEPHRINE

BIOSYNTHESIS IN THE PERFUSED GUINEA-PIG HEART, vol. 148, pp. 1-8.

Li, H., Waites, C. L., Staal, R. G., Dobryy, Y., Park, J., Sulzer, D. L. and Edwards, R. H. (2005). Sorting of vesicular monoamine transporter 2 to the regulated secretory pathway confers the somatodendritic exocytosis of monoamines. *Neuron* **48**, 619-33.

Ma, L., Bindokas, V. P., Kuznetsov, A., Rhodes, C., Hays, L., Edwardson, J. M., Ueda, K., Steiner, D. F. and Philipson, L. H. (2004). Direct imaging shows that insulin granule exocytosis occurs by complete vesicle fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 9266-71.

Machado, J. D., Diaz-Vera, J., Dominguez, N., Alvarez, C. M., Pardo, M. R. and Borges, R. (2010). Chromogranins a and B as regulators of vesicle cargo and exocytosis. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 1181-7.

Machado, J. D., Montesinos, MS. and Borges, R. (2008). Good practices in single cell amperometry. In *Exocytosis and Endocytosis. Methods in Molecular Biology* vol. 440 (ed. A. I. Ivanov), pp. 297-313 Human Press

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

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

Mahapatra, N. R., Mahata, M., Hazra, P. P., McDonough, P. M., O'Connor, D. T. and Mahata, S. K. (2004). A dynamic pool of calcium in catecholamine storage vesicles. Exploration in living cells by a novel vesicle-targeted chromogranin A-aequorin chimeric photoprotein. *J Biol Chem* **279**, 51107-21.

Mahapatra, N. R., O'Connor, D. T., Vaingankar, S. M., Hikim, A. P., Mahata, M., Ray, S., Staite, E., Wu, H., Gu, Y., Dalton, N. et al. (2005). Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest* **115**, 1942-52.

Mahata, S. K., Marksteiner, J., Sperk, G., Mahata, M., Gruber, B., Fischer-Colbrie, R. and Winkler, H. (1992). Temporal lobe epilepsy of the rat: differential expression of mRNAs of chromogranin B, secretogranin II, synaptin/synaptophysin and p65 in subfield of the hippocampus, vol. 16, pp. 1-12.

Malosio, M. L., Giordano, T., Laslop, A. and Meldolesi, J. (2004). Dense-core granules: a specific hallmark of the neuronal/neurosecretory cell phenotype, vol. 117, pp. 743-749.

Marksteiner, J., Lechner, T., Kaufmann, W. A., Gurka, P., Humpel, C., Nowakowski, C., Maier, H. and Jellinger, K. A. (2000). Distribution of chromogranin B-like immunoreactivity in the human hippocampus and its changes in Alzheimer's disease, vol. 100, pp. 205-12.

Monck, J. R., Robinson, I. M., Escobar, A. L., Vergara, J. L. and Fernandez, J. M. (1994). Pulsed laser imaging of rapid Ca²⁺ gradients in excitable cells. *Biophys J* **67**, 505-14.

Montero-Hadjadje, M., Elias, S., Chevalier, L., Benard, M., Tanguy, Y., Turquier, V., Galas, L., Yon, L., Malagon, M. M., Driouich, A. et al. (2009). Chromogranin A promotes peptide hormone sorting to mobile granules in constitutively and regulated secreting cells: role of conserved N- and C-terminal peptides. *J Biol Chem* **284**, 12420-31.

Montero-Hadjadje, M., Vaingankar, S., Elias, S., Tostivint, H., Mahata, S. K. and Anouar, Y. (2008). Chromogranins A and B and secretogranin II: evolutionary and functional aspects, vol. 192, pp. 309-324.

Montesinos, M. S., Machado, J. D., Camacho, M., Diaz, J., Morales, Y. G., Alvarez de la Rosa, D., Carmona, E., Castaneyra, A., Viveros, O. H., O'Connor, D. T. et al. (2008). The crucial role of chromogranins in storage and exocytosis revealed using chromaffin cells from chromogranin A null mouse. *J Neurosci* **28**, 3350-8.

Mosharov, E. V., Gong, L. W., Khanna, B., Sulzer, D. and Lindau, M. (2003). Intracellular patch electrochemistry: regulation of cytosolic catecholamines in chromaffin cells. *J Neurosci* **23**, 5835-45.

Mosley, C. A., Taupenot, L., Biswas, N., Taulane, J. P., Olson, N. H., Vaingankar, S. M., Wen, G., Schork, N. J., Ziegler, M. G., Mahata, S. K. et al. (2007). Biogenesis of the Secretory Granule: Chromogranin A Coiled-Coil Structure Results in Unusual Physical Properties and Suggests a Mechanism for Granule Core Condensation. *Biochemistry* **46**, 10999-11012.

Nanavati, C. and Fernandez, J. M. (1993). The secretory granule matrix: a fast-acting smart polymer. *Science* **259**, 963-5.

Neher, E. (1998). Vesicle pools and Ca²⁺ microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release. *Neuron* **20**, 389-99.

Neher, E. and Marty, A. (1982). Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6712-6.

Nofal, S., Becherer, U., Hof, D., Matti, U. and Rettig, J. (2007). Primed vesicles can be distinguished from docked vesicles by analyzing their mobility. *J Neurosci* **27**, 1386-95.

Nonet, M. L., Saifee, O., Zhao, H., Rand, J. B. and Wei, L. (1998). Synaptic transmission deficits in *Caenorhabditis elegans* synaptobrevin mutants. *J Neurosci* **18**, 70-80.

Ñeco, P., Fernandez-Peruchena, C., Navas, S., Gutierrez, L. M., de Toledo, G. A. and Ales, E. (2008). Myosin II contributes to fusion pore expansion during exocytosis. *J Biol Chem* **283**, 10949-57.

Obermüller, S., Calegari, F., King, A., Lindqvist, A., Karanauskaite, J., Lundquist, I., Salehi, A., Francolini, M., Rosa, P., Rorsman, P. et al. (2010). Chromogranin-B deficient mice are diabetic despite normal insulin granule biogenesis, vol. 5: Plos One.

Oheim, M. and Stuhmer, W. (2000). Tracking chromaffin granules on their way through the actin cortex. *Eur Biophys J* **29**, 67-89.

Park, H. Y., So, S. H., Lee, W. B., You, S. H. and Yoo, S. H. (2002). Purification, pH-dependent conformational change, aggregation, and secretory granule membrane binding property of secretogranin II (chromogranin C). *Biochemistry* **41**, 1259-66.

Pereira, D. B. and Sulzer, D. (2012). Mechanisms of dopamine quantal size regulation. *Front Biosci* **17**, 2740-67.

Perrais, D., Kleppe, I. C., Taraska, J. W. and Almers, W. (2004). Recapture after exocytosis causes differential retention of protein in granules of bovine chromaffin cells. *J Physiol* **560**, 413-28.

Prasad, P., Yanagihara, A. A., Small-Howard, A. L., Turner, H. and Stokes, A. J. (2008). Secretogranin III Directs Secretory Vesicle Biogenesis in Mast Cells in a Manner Dependent upon Interaction with Chromogranin A, vol. 181, pp. 5024-5034.

Preece, N. E., Nguyen, M., Mahata, M., Mahata, S. K., Mahapatra, N. R., Tsigelny, I. and O'Connor, D. T. (2004). Conformational preferences and activities of peptides from the catecholamine release-inhibitory (catestatin) region of chromogranin A. *Regul Pept* **118**, 75-87.

Pyle, J. L., Kavalali, E. T., Piedras-Renteria, E. S. and Tsien, R. W. (2000). Rapid reuse of readily releasable pool vesicles at hippocampal synapses. *Neuron* **28**, 221-31.

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

Reigada, D., Díez-Pérez, I., Gorostiza, P., Verdaguer, A., Gámez de Aranda, I., Pineda, O., Vilarrasa, J., Marsal, J., Blasi, J., Aleu, J. et al. (2003). Control of neurotransmitter release by an internal gel matrix in synaptic vesicles, vol. 100, pp. 3485-3490.

Rizo, J. and Rosenmund, C. (2008). Synaptic vesicle fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 665-674.

- Rosa, P. and Zanini, A.** (1983). Purification of a sulfated secretory protein from the adenohipophysis. Immunochemical evidence that similar macromolecules are present in other glands, vol. 31, pp. 94-8.
- Salaün, C., J. James, D. and H. Chamberlain, L.** (2004). Lipid Rafts and the Regulation of Exocytosis, vol. 5, pp. 255-264.
- Santodomingo, J., Vay, L., Camacho, M., Hernandez-Sanmigu, E., Fonteriz, R. I., Lobaton, C. D., Montero, M., Moreno, A. and Alvarez, J.** (2008). Calcium dynamics in bovine adrenal medulla chromaffin cell secretory granules, vol. 28, pp. 1265-74.
- Sawada, K., Echigo, N., Juge, N., Miyaji, T., Otsuka, M., Omote, H., Yamamoto, A. and Moriyama, Y.** (2008). Identification of a vesicular nucleotide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5683-6.
- Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B. R. and Montecucco, C.** (1992). Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. *Nature* **359**, 832-5.
- Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T. C. and Kavalali, E. T.** (2001). SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. *Science* **294**, 1117-22.
- Schroeder, T. J., Borges, R., Finnegan, J. M., Pihel, K., Amatore, C. and Wightman, R. M.** (1996). Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. *Biophysical Journal* **70**, 1061-1068.
- Schroeder, T. J., Jankowski, J. A., Senyshyn, J., Holz, R. W. and Wightman, R. M.** (1994). Zones of exocytotic release on bovine adrenal medullary cells in culture. *J Biol Chem* **269**, 17215-20.
- Segura, F., Brioso, M. A., Gomez, J. F., Machado, J. D. and Borges, R.** (2000). Automatic analysis for amperometrical recordings of exocytosis. *Journal of Neuroscience Methods* **103**, 151-156.
- Smith, C., Moser, T., Xu, T. and Neher, E.** (1998). Cytosolic Ca²⁺ acts by two separate pathways to modulate the supply of release-competent vesicles in chromaffin cells. *Neuron* **20**, 1243-53.
- Smith, C. and Neher, E.** (1997). Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Cell Biol* **139**, 885-94.
- Somers, L. A., Maxson, M. M. and Ewing, A. G.** (2005). Loaded dopamine is preferentially stored in the halo portion of PC12 cell dense core vesicles. *J Neurochem* **93**, 1122-31.
- Somers, L. A., Maxson, M. M. and Ewing, A. G.** (2007). Multicore vesicles: hyperosmolarity and L-DOPA induce homotypic fusion of dense core vesicles. *Cell Mol Neurobiol* **27**, 681-5.

Stettler, H., Beuret, N., Prescianotto-Basc, C., Fayard, B., Taupenot, L. and Spiess, M. (2009). Determinants for chromogranin A sorting into the regulated secretory pathway are also sufficient to generate granule-like structures in non-endocrine cells, vol. 418, pp. 81-91.

Stevens, D. R., Schirra, C., Becherer, U. and Rettig, J. (2011). Vesicle pools: lessons from adrenal chromaffin cells. *Front Synaptic Neurosci* **3**, 2.

Steyer, J. A. and Almers, W. (1999). Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy. *Biophys J* **76**, 2262-71.

Steyer, J. A. and Almers, W. (2001). A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 268-75.

Steyer, J. A., Horstmann, H. and Almers, W. (1997). Transport, docking and exocytosis of single secretory granules in live chromaffin cells. *Nature* **388**, 474-8.

Sudhof, T. C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* **27**, 509-47.

Sudhof, T. C. (2012). The presynaptic active zone. *Neuron* **75**, 11-25.

Sudhof, T. C. and Rizo, J. (2011). Synaptic vesicle exocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.

Tabares, L., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G. (2003). Relationship between fusion pore opening and release during mast cell exocytosis studied with patch amperometry. *Biochem Soc Trans* **31**, 837-41.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E. A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P. et al. (2006). Molecular anatomy of a trafficking organelle. *Cell* **127**, 831-46.

Takiyuddin, M. A., Cervenka, J. H., Hsiao, R. J., Barbosa, J. A., Parmer, R. J. and O'Connor, D. T. (1990). Chromogranin A. Storage and release in hypertension, vol. 15, pp. 237-246.

Taraska, J. W. and Almers, W. (2004). Bilayers merge even when exocytosis is transient. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8780-5.

Taraska, J. W., Perrais, D., Ohara-Imaizumi, M., Nagamatsu, S. and Almers, W. (2003). Secretory granules are recaptured largely intact after stimulated exocytosis in cultured endocrine cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2070-5.

Taupenot, L., Harper, K. L., Mahapatra, N. R., Parmer, R. J., Mahata, S. K. and O'Connor, D. T. (2002). Identification of a novel sorting determinant for the regulated pathway in the secretory protein chromogranin A, vol. 115, pp. 4827-4841.

Taupenot, L., Harper, K. L. and O'Connor, D. T. (2003). The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* **348**, 1134-49.

Thiele, C. and Huttner, W. B. (1998). Protein and lipid sorting from the trans-Golgi network to secretory granules--recent developments. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **9**, 511-516.

Toomre, D., Steyer, J. A., Keller, P., Almers, W. and Simons, K. (2000). Fusion of constitutive membrane traffic with the cell surface observed by evanescent wave microscopy. *J Cell Biol* **149**, 33-40.

Trifaro, J. M., Gasman, S. and Gutierrez, L. M. (2008). Cytoskeletal control of vesicle transport and exocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 165-72.

Trifaro, J. M., Glavinovic, M. and Rose, S. D. (1997). Secretory vesicle pools and rate and kinetics of single vesicle exocytosis in neurosecretory cells. *Neurochem Res* **22**, 831-41.

Trouillon, R. and Ewing, A. G. (2013). Single Cell Amperometry Reveals Glycocalyx Hinders the Release of Neurotransmitters During Exocytosis. *Anal Chem*.

Tse, F. W. and Tse, A. (1999). Regulation of exocytosis via release of Ca(2+) from intracellular stores. *Bioessays* **21**, 861-5.

Tsien, R. Y., Pozzan, T. and Rink, T. J. (1982). Calcium homeostasis in intact lymphocytes: cytoplasmic free calcium monitored with a new, intracellularly trapped fluorescent indicator. *J Cell Biol* **94**, 325-34.

Tsuboi, T. and Fukuda, M. (2007). Synaptotagmin VII modulates the kinetics of dense-core vesicle exocytosis in PC12 cells. *Genes Cells* **12**, 511-9.

Tsuboi, T. and Rutter, G. A. (2003). Multiple forms of "kiss-and-run" exocytosis revealed by evanescent wave microscopy. *Curr Biol* **13**, 563-7.

van Kempen, G. T., vanderLeest, H. T., van den Berg, R. J., Eilers, P. and Westerink, R. H. (2011). Three distinct modes of exocytosis revealed by amperometry in neuroendocrine cells. *Biophys J* **100**, 968-77.

Videen, J. S., Mezger, M. S., Chang, Y. M. and O'Connor, D. T. (1992). Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation. *J Biol Chem* **267**, 3066-73.

Vitale, M. L., Seward, E. P. and 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**, 353-63.

Voets, T., Neher, E. and Moser, T. (1999). Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron* **23**, 607-15.

Wasle, B. and Edwardson, J. M. (2002). The regulation of exocytosis in the pancreatic acinar cell. *Cell Signal* **14**, 191-7.

Wegrzyn, J., Lee, J., Neveu, J. M., Lane, W. S. and Hook, V. (2007). Proteomics of neuroendocrine secretory vesicles reveal distinct functional systems for biosynthesis and exocytosis of peptide hormones and neurotransmitters, vol. 6, pp. 1652-65.

Westerink, R. H. and Ewing, A. G. (2008). The PC12 cell as model for neurosecretion. *Acta Physiol (Oxf)* **192**, 273-85.

Wightman, R. M., Jankowski, J. A., Kennedy, R. T., Kawagoe, K. T., Schroeder, T. J., Leszczyszyn, D. J., Near, J. A., Diliberto, E. J., Jr. and Viveros, O. H. (1991). Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 10754-8.

Willis, M., Prokesch, M., Hutter-Paier, B., Windisch, M., Stridsberg, M., Mahata, S. K., Kirchmair, R., Wietzorrek, G., Knaus, H. G., Jellinger, K. et al. (2008). Chromogranin B and Secretogranin II in transgenic mice overexpressing human APP751 with the London (V717I) and Swedish (K670M/N671L) mutations and in Alzheimer patients, vol. 13, pp. 123-35.

Wimalasena, K. (2011). Vesicular monoamine transporters: structure-function, pharmacology, and medicinal chemistry. *Med Res Rev* **31**, 483-519.

Winkler, H. (1993). The adrenal chromaffin granule: a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J Anat* **183 (Pt 2)**, 237-52.

Winkler, H. and Westhead, E. (1980). The molecular organization of adrenal chromaffin granules. *Neuroscience* **5**, 1803-23.

Wu, Y., Gu, Y., Morphew, M. K., Yao, J., Yeh, F. L., Dong, M. and Chapman, E. R. (2012). All three components of the neuronal SNARE complex contribute to secretory vesicle docking. *J Cell Biol* **198**, 323-30.

Xu, J., Tang, K. S., Lu, V. B., Weerasinghe, C. P., Tse, A. and Tse, F. W. (2005). Maintenance of quantal size and immediately releasable granules in rat chromaffin cells by glucocorticoid. *Am J Physiol Cell Physiol* **289**, C1122-33.

Yang, Y. and Gillis, K. D. (2004). A highly Ca²⁺-sensitive pool of granules is regulated by glucose and protein kinases in insulin-secreting INS-1 cells. *J Gen Physiol* **124**, 641-51.

Yoo, S. H. (1993). pH-dependent binding of chromogranin B and secretory vesicle matrix proteins to the vesicle membrane. *Biochim Biophys Acta* **1179**, 239-46.

Yoo, S. H. (1995). pH- and Ca(2+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin B. Comparison with chromogranin A and implication in secretory vesicle biogenesis. *J Biol Chem* **270**, 12578-83.

Yoo, S. H. (2000). Coupling of the IP3 receptor/Ca2+ channel with Ca2+ storage proteins chromogranins A and B in secretory granules. *Trends Neurosci* **23**, 424-8.

Yoo, S. H. (2009). Secretory granules in inositol 1,4,5-trisphosphate-dependent Ca2+ signaling in the cytoplasm of neuroendocrine cells, pp. fj.09-132456.

Yoo, S. H. and Albanesi, J. P. (1990). Ca2(+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin A. *J Biol Chem* **265**, 14414-21.

Yoo, S. H. and Albanesi, J. P. (1991). High capacity, low affinity Ca2+ binding of chromogranin A. Relationship between the pH-induced conformational change and Ca2+ binding property. *J Biol Chem* **266**, 7740-5.

Yoo, S. H. and Ferretti, J. A. (1993). Nature of the pH-induced conformational changes and exposure of the C-terminal region of chromogranin A. *FEBS Lett* **334**, 373-7.

Yoo, S. H., You, S. H., Kang, M. K., Huh, Y. H., Lee, C. S. and Shim, C. S. (2002). Localization of the secretory granule marker protein chromogranin B in the nucleus. Potential role in transcription control. *J Biol Chem* **277**, 16011-21.

Yoshizaki, T. (1974). Effects of cholinergic drugs and their blockers on adrenaline release from rat adrenal. *Biochem Pharmacol* **24**, 1401-1405.

Zhang, B., Tan, Z., Zhang, C., Shi, Y., Lin, Z., Gu, N., Feng, G. and He, L. (2002). Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population. *Neuroscience Letters* **323**, 229-233.

Zhao, E., Zhang, D., Basak, A. and Trudeau, V. L. (2009). New insights into granin-derived peptides: evolution and endocrine roles. *General and Comparative Endocrinology* **164**, 161-174.

Zhou, X. F., Marley, P. D. and Livett, B. G. (1991). Substance P modulates the time course of nicotinic but not muscarinic catecholamine secretion from perfused adrenal glands of rat. *Br J Pharmacol* **104**, 159-65.

Zhou, Z. and Misler, S. (1996). Amperometric detection of quantal secretion from patch-clamped rat pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **271**, 270-7.

Zimmerberg, J., Curran, M., Cohen, F. S. and Brodwick, M. (1987). Simultaneous electrical and optical measurements show that

Bibliografía

membrane fusion precedes secretory granule swelling during exocytosis of beige mouse mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 1585-9.