“EFECTO DE LA AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR Y DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN LA CINÉTICA DE LA EXOCITOSIS EN MASTOCITOS”

Sergio Navas Inocencio

Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2007

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA MÉDICA Y BIOFÍSICA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Avda. Sánchez Pizjuan s/n 41009. Sevilla. España

Don Guillermo Álvarez de Toledo Naranjo, Catedrático de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla

CERTIFICA

que Sergio Navas Inocencio ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "EFECTO DE LA AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR Y DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN LA CINÉTICA DE LA EXOCITOSIS EN MASTOCITOS" que presenta para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Guillermo Álvarez de Toledo Naranjo

Sevilla, 16 de julio de 2007

Agradecimientos

Aunque los agradecimientos de una tesis aparecen al principio de esta, desconozco por qué he dejado su escritura para el final. Por lo que sé, no he sido el único en hacerlo en este orden, ya que se suele hacer de esta forma. Una posible explicación quizá sea que es la parte más personal y menos objetiva del trabajo científico que contiene una tesis doctoral. Los agradecimientos pueden considerarse como todo lo opuesto al conocido método científico, dejando a un lado la rigurosidad y la objetividad para dar paso a la subjetividad implícita que conlleva dar las gracias a otras personas. Tras esta breve reflexión que me ha permitido desconectar del contenido del resto de la tesis, me aventuro en algo en lo que, los que me conocen, saben que no es una de mis virtudes.

Lo primero es agradecer a mis padres el haberme apoyado y facilitado mediante todos sus medios la posibilidad de dedicarme a lo que he elegido y deseaba. Con su confianza y respeto hacia mi trabajo siempre me he sentido comprendido, algo que cuando te dedicas a la ciencia es algo digno de elogio.

Por supuesto quiero agradecer a Guillermo, mi director de tesis, el haberme dado la oportunidad de introducirme en la ciencia admitiéndome como doctorando en su grupo de investigación. De él he aprendido muchas cosas, tanto profesionales como personales. Él me ha sabido enseñar, además de lo que hace falta para escribir lo que no son los agradecimientos de una tesis, el tener una visión más amplia del trabajo en un laboratorio. Gracias a Guillermo he sido capaz de afrontar los problemas diarios que surgen al hacer experimentos y de tener una actitud positiva en todo momento. También me ha enseñado a compatibilizar el trabajo con el cachondeo, y doy fe de que he hecho todo lo posible por aplicar sus consejos. Por último quiero hacer hincapié en lo mucho que se ha preocupado por mi y mi futuro, y que a veces no he sabido valorar.

Del director de tesis hay que pasar a los compañeros de departamento. Son muchos y buenos, y han sabido estar ahí para cuando ha hecho falta, tanto para el trabajo como para la diversión, cada uno en distinta proporción: Bea, Juancho, Susana, Perico, Manolo, César, Pablo, Rocío y Eva. También a los últimos en llegar por los buenos ratos compartidos: Cata, Alexandra, Ángel, Marga, Imane, Rocío y Juanjo.

Entrando en mi grupo de investigación, la presencia de “la Mari” invita a invertir un ratito en relajación. También como integrante de mi grupo, amigo además de compañero, quiero dar las gracias de una forma muy especial a Carlos. Carlos es una de esas personas que dejan huella y con la que me siento afortunado por poder haber compartido muchas cosas dentro y fuera del laboratorio. Siempre dispuesto a ayudar en las cuestiones más complicadas para un biólogo y

envuelto en un halo de misterio al estar siempre metido en “sus asuntos”. Sin él, los momentos difíciles hubieran sido mucho peores.

A Lucía también quisiera agradecer su continua disposición a ayudarme cuando he necesitado de su experiencia como investigadora. A Rafa por desearme continuamente “lo mejor” y por el amable préstamo de la línea de ratones SCAMP1-beige que ha hecho posible gran parte de este trabajo. A Sabine Hilfiker por la cesión de la línea de ratones NDST-2, también fundamental para mi proyecto de tesis.

A Mariluz, amiga y excelente compañera de iniciativas empresariales por ofrecer una visión distinta de la vida a todos las que la rodean. A Uxi, por ser de inestimable ayuda en problemas técnicos y por estar siempre dispuesta a intercambiar una sonrisa.

Alejándome del departamento, aunque no mucho, quiero hacer mención especial a Itziar por su fundamental labor en el animalario. Hay que agradecer la dedicación de las personas responsables de la materia prima de nuestros experimentos, con un trabajo en la sombra muchas veces insuficientemente valorado. Aunque mi relación con Itziar comenzó girando en torno a ratones, con el tiempo fue mi vida la que terminó girando en torno a ella. Itziar se ha convertido en la persona más importante de mi vida y la que me ha proporcionado apoyo continuo dentro y fuera del laboratorio. Ella ha sido la persona que más confianza ha depositado en mi, dedicándome cantidades enormes de tiempo, cariño y preocupación. Itziar me ha ayudado a mejorar como persona y es a la última que desearía defraudar. Ella tiene la culpa de gran parte de lo que he conseguido y de todo lo consiga de aquí en adelante, puesto que siempre está en mis pensamientos.

Te quiero no por lo que eres, sino por

lo que soy yo cuando estoy contigo

A Itziar

La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.

F.M. Voltaire

I. INTRODUCCIÓN

1. LA VÍA EXOCÍTICA ..... pág. 3

   1.1. El ciclo de las vesículas secretoras ..... pág. 4

2. LA EXOCITOSIS REGULADA ..... pág. 6

3. LA MAQUINARIA PROTEICA DE LA EXOCITOSIS REGULADA ..... pág. 10

   3.1. SNAREs ..... pág. 11
   3.2. NSF y α-SNAP ..... pág. 14
   3.3. Proteínas Sec1 ..... pág. 15
   3.4. Rabs y efectores ..... pág. 15
   3.5. Proteínas de unión a Ca^{2+} ..... pág. 16

4. LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN QUE RIGEN LA EXOCITOSIS DE VESÍCULAS SECRETORAS ..... pág. 18

   4.1. Ca^{2+} ..... pág. 18
   4.2. AMPc ..... pág. 22
   4.3. Proteínas de unión a GTP ..... pág. 23

5. CINÉTICA DE LA SECRECIÓN EN DISTINTOS TIPOS CELULARES ..... pág. 25

   5.1. Tasa de secreción ..... pág. 25
   5.2. Proporción de vesículas secretoras ..... pág. 26
   5.3. Mecanismos de focalización de la respuesta secretora ..... pág. 26
   5.4. Activación y regulación de la secreción ..... pág. 27
   5.5. Matriz intravesicular ..... pág. 28

6. TÉCNICAS DE MONITORIZACIÓN DE LA SECRECIÓN EN TIEMPO REAL ..... pág. 30

   6.1. Patch-clamp ..... pág. 30
   6.2. Amperometría ..... pág. 31
   6.3. Análisis de imagen ..... pág. 33
   6.4. Métodos computacionales ..... pág. 34

7. PORO DE FUSIÓN Y EXOCITOSIS *KISS-AND-RUN* ..... pág. 36

II. OBJETIVOS

Objetivos ..... pág. 43

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES ..... pág. 47
2. CULTIVO AGUDO DE MASTOCITOS ..... pág. 49
3. REGISTROS ..... pág. 50

3.1. Solución externa de registro ..... pág. 50
3.2. Solución interna de registro ..... pág. 50
3.3. Modelo eléctrico de la membrana ..... pág. 51
3.4. La técnica de *patch-clamp* ..... pág. 52
3.5. Medida de la capacidad eléctrica de la membrana ..... pág. 54
3.6. Medida de la conductancia del poro de fusión exocitótico ..... pág. 64
3.7. Amperometría ..... pág. 66
3.8. Simulaciones ..... pág. 71
3.9. Sistema de registro ..... pág. 72
3.10. Procedimientos experimentales ..... pág. 78
3.11. Métodos de cálculo ..... pág. 80
3.12. Estadística ..... pág. 81

4. SOFTWARE ..... pág. 83

4.1. Software de adquisición de las señales ..... pág. 83
4.2. Software de análisis de registros simultáneos de capacidad y amperometría ..... pág. 85

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS EN MASTOCITOS DE RATONES SIN MATRIZ INTRAVESICULAR ..... pág. 91

2. EFECTO DE LA AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR DE HEPARINA EN LA DESGRANULACIÓN DE LOS MASTOCITOS ..... pág. 93

2.1. Incremento de capacidad tras la desgranulación ..... pág. 94
2.2. Tasa de desgranulación ..... pág. 96
2.3. Tiempo de desgranulación ..... pág. 97
2.4. Tamaño de las vesículas secretoras ..... pág. 98

3. EFECTO DE AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR DE HEPARINA EN LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN DE LAS MASTOCITOS ..... pág. 102

3.1. Amplitud de las espigas amperométricas ..... pág. 103
3.2. Anchura a media altura de las espigas amperométricas ..... pág. 104
3.3. Tiempo al pico de las espigas amperométricas ..... pág. 105
3.4. Carga de las espigas amperométricas ..... pág. 106

4. CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA EN EL INTERIOR DE LAS VESÍCULAS SECRETORAS ..... pág. 109

5. ESTUDIO DEL PORO DE FUSIÓN EXOCITÓTICO EN MASTOCITOS CARENTES DE MATRIZ INTRAVESICULAR ..... pág. 111

5.1. Retraso entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica ..... pág. 111
5.2. Estudio de los pies amperométricos ..... pág. 112

6. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS EN LA FASE DE EXPANSIÓN DEL PORO DE FUSIÓN pág. 117

7. EFECTO DE LA AUSENCIA DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN LA DESGRANULACIÓN DE LAS MASTOCITOS DE RATÓN *BEIGE* ..... pág. 118

7.1. Incremento de tamaño causado por la desgranulación ..... pág. 119
7.2. Tamaño de las vesículas secretoras ..... pág. 121

8. ESTUDIO LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN DE LAS MASTOCITOS DE RATÓN *BEIGE* ..... pág. 123

8.1. Amplitud de las espigas amperométricas ..... pág. 123
8.2. Anchura a media altura de las espigas amperométricas ..... pág. 123
8.3. Tiempo al pico de las espigas amperométricas ..... pág. 124
8.4. Carga de las espigas amperométricas ..... pág. 125

9. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN EL PORO DE FUSIÓN ..... pág. 127

9.1. Duración del poro de fusión ..... pág. 130
9.2. Conductancia del poro de fusión ..... pág. 131

10. MODELADO DE LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN DE MASTOCITOS MEDIANTE EL MÉTODO DE MONTECARLO ..... pág. 134

V. DISCUSIÓN

1. EFECTOS DE LA AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR EN LOS MASTOCITOS ..... pág. 142

1.1. Efectos de la matriz intravesicular en la morfología de los mastocitos ... pág. 142
1.2. Concentración de serotonina en ausencia de matriz intravesicular ..... pág. 142

2. DINÁMICA DEL PORO DE FUSIÓN EN AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR pág. 145

3. PAPEL DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN EL PROCESO SECRETOR ..... pág. 148

3.1. Nivel de expresión de SCAMP1 en mastocitos ..... pág. 150
3.2. Alteraciones morfológicas de los mastocitos en asuencia de SCAMP1 .. pág. 150
3.3. Cinética de la secreción de serotonina en ausencia de SCAMP1 ... pág. 151

4. PAPEL DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN EL PORO DE FUSIÓN ..... pág. 153

4.1. Límites en la resolución de la medida de la conductancia del poro de fusión ..... pág. 153
4.2. Duración de los poros de fusión en ausencia de SCAMP1 ..... pág. 154
4.3. Valores de conductancia de los poros de fusión en ausencia de SCAMP1 ..... pág. 155

4.4. Curso temporal de la fase de expansión del poro de fusión en ausencia de SCAMP1 ..... pág. 156

5. ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN MEDIANTE SIMULACIONES ..... pág. 164

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones ..... pág. 171

VII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía ..... pág. 175

VIII. ANEXOS

Anexo I: copia en soporte digital de códigos de software desarrollado ..... pág. 187

I. INTRODUCCIÓN

1. LA VIA EXOCÍTICA

El tráfico de las vesículas secretoras hacia la membrana plasmática de las células eucarióticas es esencial para la función celular. Este proceso es la base de la comunicación intercelular en organismos eucariotas a través de la liberación de una extensa variedad de moléculas. Existen dos tipos de exocitosis en función del nivel de control sobre el proceso, la exocitosis constitutiva y la exocitosis regulada (Kelly, 1985; Burgess and Kelly, 1987). En todas las células es necesaria la fusión de vesículas mediante exocitosis constitutiva para la incorporación de nuevos componentes de membrana. Algunas moléculas extracelulares (proteínas plasmáticas, anticuerpos, componentes de la matriz extracelular, etc.) son también secretadas por la vía constitutiva de la exocitosis. En muchos tipos celulares existe además otra vía en la cual la exocitosis está estrechamente regulada con el fin de permitir la liberación controlada del contenido vesicular o para regular la incorporación de nuevos componentes a la membrana. La exocitosis regulada ha sido extensamente estudiada en la sinapsis donde es el mecanismo por el cual los neurotransmisores son rápidamente liberados de forma controlada desde las vesículas sinápticas para mediar la neurotransmisión (Kelly, 1993; Zucker, 1996). Un gran número de tipos celulares no neuronales presentan los denominados gránulos densos, que sufren exocitosis regulada y poseen una gran variedad de funciones fisiológicas. Entre éstas destacan las células especializadas en la secreción de grandes cantidades de productos, como son las células neuroendocrinas, endocrinas o exocrinas.

Las vesículas secretoras y la exocitosis regulada están siendo intensamente estudiadas en varios tipos celulares elegidos por ser modelos que experimentalmente hacen muy factible su uso, o bien por ser de especial interés fisiológico o fisiopatológico. El estudio de las proteínas implicadas en secreción fue originalmente abordado en los experimentos de George Palade mediante experimentos en células exocrinas pancreáticas (Palade, 1975). Más recientemente, el tipo celular más estudiado ha sido la célula cromafín adrenal (y su derivado tumoral, la línea celular PC12) la cual ha sido objeto de estudios bioquímicos y electrofisiológicos. La célula β pancreática también ha sido utilizada de forma extensa debido a la importancia de la secreción de insulina y a su disfunción en forma de diabetes mellitus. Otros tipos celulares ampliamente utilizados son las células hematopoyéticas entre las que destacan los mastocitos (Lindau and Gomperts, 1991), las plaquetas (Lemons et al., 1997) y los neutrófilos (Borregaard et al., 1993) por su implicación en la respuestas inmunes normales y patológicas.

1.1. El ciclo de las vesículas secretoras

Inicialmente, la formación de vesículas inmaduras ocurre en el trans-Golgi. El proceso de deformación de la membrana necesaria para la escisión de fragmentos de membrana del Golgi es dependiente de cromogranina en células neuroendocrinas. Aunque no está demostrado, parece ser que la cromogranina A presenta unas propiedades de agregación y de interacción con las membranas que provoca el recubrimiento de estos agregados por membrana del trans-Golgi. La yema generada por la agregación sufre el proceso de escisión para dar lugar a una vesícula inmadura. La posterior maduración consiste en la incorporación y pérdida de componentes mediante la fusión con otras vesículas y la formación de nuevas yemas que sufrirán un nuevo proceso de escisión.

Una vez que las vesículas secretoras son sintetizadas en el trans-Golgi y sufren el proceso de maduración, las vesículas pasan a formar parte de un conjunto de vesículas estable pre-sintetizadas, denominado población, los cuales en algunos tipos celulares tienen una vida media muy larga en ausencia de estimulación (Corcoran et al., 1984; Hide et al., 1993). Este conjunto de vesículas puede ser totalmente exocitado si la exocitosis regulada es un proceso de todo o nada, como en el caso de los mastocitos (Lindau and Gomperts, 1991; Hide et al., 1993). En los tipos celulares en los que la exocitosis no es un proceso de todo o nada, existen varios conjuntos de vesículas con diferente probabilidad de ser secretados. En el caso de las células endocrinas, neuroendocrinas y exocrinas solamente un 1% de las vesículas secretoras son capaces de sufrir exocitosis de forma rápida, existiendo adicionalmente una gran población de reserva (RP, "*reserve pool*"). Existen tipos celulares en los que hay una serie de estados intermedios definidos desde que una vesícula pertenece a la población de reserva hasta que forma parte de la población de liberación rápida (*RRP*, *"ready releasable pool"*) (Heinemann et al., 1993; Neher and Zucker, 1993; Parsons et al., 1995; Rosenmund and Stevens, 1996; Neher, 1998; Olofsson et al., 2002) el cual puede sufrir exocitosis en decenas de milisegundos. Estas poblaciones han sido estudiadas y definidas (fig. I-1) mediante el uso de ensayos de exocitosis en células permeabilizadas (Holz et al., 1991; Lindau and Gomperts, 1991), medidas de la superficie celular mediante la técnica de "*patch-clamp*" (Hamill et al., 1981; Neher and Marty, 1982; Olofsson et al., 2002), detección del contenido liberado en vesículas únicas mediante amperometría (Leszczyszyn et al., 1990; Wightman et al., 1991) o mediante análisis de imágenes de fluorescencia de onda evanescente (Steyer and Almers, 2001).

En el ciclo de vesículas secretoras clásico, un aumento en el nivel de Ca^{2+} genera la fusión vesicular y la liberación de su contenido, tras lo cual se produce el colapso de la vesícula con la membrana. Durante este proceso los componentes de la membrana vesicular se mezclan con los de la membrana plasmática. Posteriormente, la clatrina origina invaginaciones que dan lugar a vesículas que formarán parte del sistema de cisternas del endosoma. La regeneración de vesículas secretoras a partir del endosoma permite la incorporación de nuevos granos al RP. Esta vía clásica se encuentra en la escala temporal de minutos. Alternativamente, existe otra vía de reciclado de vesículas secretoras con una duración de segundos, en la que las vesículas mantienen su identidad a lo largo de todo el ciclo al no mezclar sus componentes ni con la membrana plasmática ni con compartimentos del endosoma. Esta vía permite la liberación del contenido vesicular a través de un poro de fusión reversible, pudiendo una misma vesícula sufrir sucesivas liberaciones y permanecer en un estado de alta probabilidad de fusión con la membrana plasmática (fig. I-1).

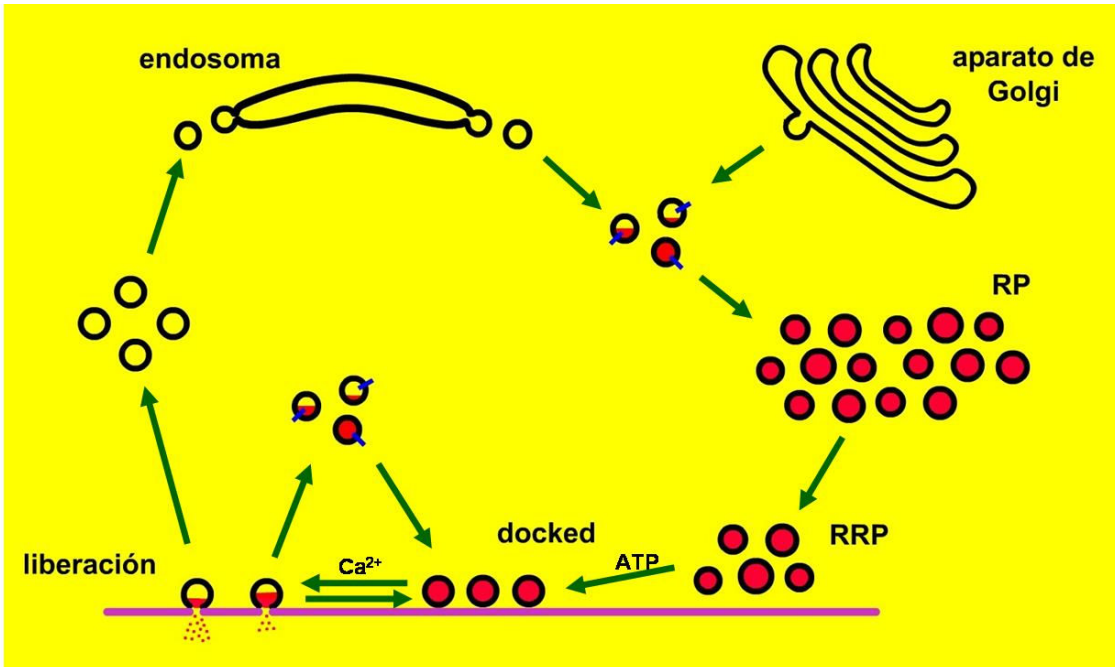

Figura I-1: Ciclo de las vesículas secretoras en células con poblaciones de vesículas con distinta probabilidad de fusión con la membrana. El paso del RRP al estado de anclaje ("*docked*") en la membrana está mediado por ATP. Un aumento de ión calcio es el responsable de disparar el proceso de fusión. RP: "*reserve pool*", RRP: "*ready releaseable pool*".

2. LA EXOCITOSIS REGULADA

En el caso de la exocitosis regulada, el proceso que sufre una vesícula secretora desde que pertenece a la población denominada "*ready releaseable pool*" (RRP) hasta que se produce la liberación del contenido vesicular está formado por varios estados funcionalmente definidos y secuenciales que se detallan a continuación (fig. I-2):

- Pasos dependientes de ATP de preparación de la vesícula (*priming*).
- Movimiento físico de las vesículas a la región cercana a la membrana de la célula.
- Unión de la vesícula a la membrana, lo cual engloba varios pasos que definen distintas fases: la fijación (*tethering*) y el anclaje a la membrana (*docking*) en los lugares de liberación.
- Maduración de la vesícula hacia un estado de preparación para la fusión con la membrana.
- Liberación del contenido vesicular o fusión propiamente dicha.
- La recuperación de la membrana vesicular.

En el caso de la exocitosis activada por el calcio, los iones Ca^{2+} pueden estimular varios estados antes de la fusión de la membrana, la propia fusión e incluso la endocitosis (Thomas et al., 1990; Neher and Zucker, 1993; Burgoyne, 1995; Smith and Neher, 1997; Engisch and Nowycky, 1998; Marks and McMahon, 1998; Palfrey and Artalejo, 1998).

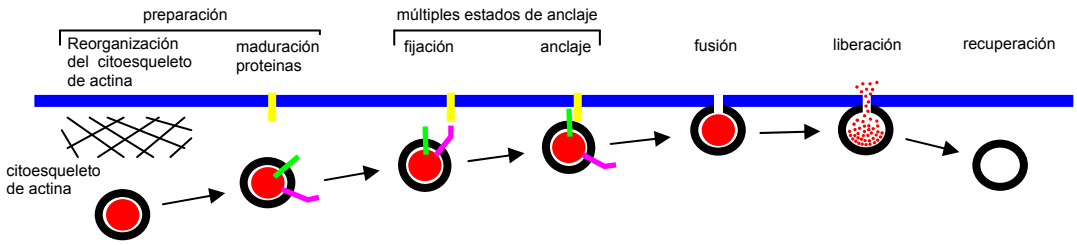

Figura I-2: El proceso de la exocitosis está dividido en una serie de estados funcionales en el que intervienen distintas proteínas y mensajeros intracelulares.

El proceso que define el término "*priming*" (preparación) fue originalmente descrito como un paso dependiente de ATP, estudiado por primera vez en células cromafines adrenales (Holz et al., 1989). Es un estado que precede a la fusión activada por Ca^{2+}. Este proceso no necesita concentraciones elevadas de Ca^{2+} y se ha demostrado que está soportada por distintas proteínas

citosólicas solubles (Hay and Martin, 1992; Chamberlain et al., 1995). El proceso puede dividirse a su vez en varias etapas, entre las que estarían la reorganización del citoesqueleto de actina (Cheek and Burgoyne, 1986; Burgoyne and Cheek, 1987; Vitale et al., 1995) que permitiría el reclutamiento de los gránulos en la región periplasmática y la modificación del grupo de proteínas SNARE por α-SNAP y la ATPasa *N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein* (NSF) (Sollner et al., 1993a; Sollner et al., 1993b; Chamberlain et al., 1995; DeBello et al., 1995; Morgan and Burgoyne, 1995; Banerjee et al., 1996; Kiraly-Borri et al., 1996; Barnard et al., 1997; Littleton et al., 1998; He et al., 1999; Graham and Burgoyne, 2000).

En el caso de las sinapsis, hay un contingente de vesículas que se encuentran en el denominado estado "*docked*" (Burns and Augustine, 1995). Estas vesículas aparecen muy cercanas a la membrana presináptica de las zonas activas en micrografías electrónicas. Mediante estudios electrofisiológicos, se ha visto que sólo una pequeña proporción de estas vesículas en estado "*docked*" (1-10%) son capaces de sufrir exocitosis en respuesta a un aumento de la concentración de Ca^{2+} tras la apertura de los canales de Ca^{2+} provocados por un único potencial de acción (Goda and Sudhof, 1997). Este pool de vesículas "*docked*" puede, además, ser liberado experimentalmente, por medio de un mecanismo desconocido mediante un tratamiento con sacarosa hipertónica (Rosenmund and Stevens, 1996). Se ha sugerido que las vesículas en este estado deben sufrir un proceso de maduración posterior para poder liberar su contenido. El proceso de maduración no está descrito en términos moleculares, pero es probable que implique el ensamblaje de la maquinaria de fusión, seguido de una interacción más fuerte con la membrana plasmática que le permita la rápida fusión con ésta.

Los eventos que inician y finalizan el proceso de fusión no se conocen en profundidad, aunque muchas de las proteínas implicadas están siendo identificadas. Mediante técnicas electrofisiológicas basadas en las propiedades biofísicas de las células, se ha determinado que la fusión de las membranas ocurre mediante la formación del denominado poro de fusión que puede abrirse de forma reversible y cerrarse rápidamente, evento conocido como exocitosis kiss-and-run (fig. I-3). La mayoría de los datos sobre el poro de fusión se han obtenido del análisis de la exocitosis de vesículas secretoras. La técnica de "*patch-clamp*" permite medir la capacidad eléctrica de la membrana con una resolución capaz de detectar incrementos de superficie debidos a la fusión de una única vesícula secretora. Mediante esta técnica se pueden observar los eventos de fusión reversibles, denominados "*flickers*", que demuestran la reversibilidad del proceso de fusión (Fernandez et al., 1984). Posteriores experimentos electrofisiológicos han caracterizado los eventos transientes de fusión (Breckenridge and Almers, 1987b; Monck et al.,

1990; Oberhauser et al., 1992; Oberhauser and Fernandez, 1996) y han determinado la corriente que los atraviesa en las primeras fases de formación (Breckenridge and Almers, 1987a; Rosenboom and Lindau, 1994; Lindau and Almers, 1995; Lollike et al., 1995; Albillos et al., 1997; Scepek et al., 1998). Se ha comprobado que esta corriente es similar a la que posee un canal iónico o unión tipo "*gap*". Tras una fase inicial de formación, el poro de fusión puede cerrarse o comenzar la denominada fase de expansión (Lindau and Almers, 1995). Incluso en esta fase, el poro puede volver a cerrarse (Ales et al., 1999). En caso contrario, se produce la fusión completa tras la fase de expansión del poro y por lo tanto la incorporación de la membrana vesicular a la plasmática. La tasa de apertura del poro de fusión es un proceso regulado y está potenciado por el aumento del Ca^{2+} intracelular en mastocitos de rata (Fernandez-Chacon and Alvarez de Toledo, 1995; Hartmann and Lindau, 1995) o bien por la activación de la proteína quinasa C en eosinófilos (Scepek et al., 1998). Una consecuencia fisiológica de la fusión a través de un poro de fusión reversible es la posibilidad de controlar la cantidad de secretagogo en cada evento de fusión. Se ha especulado que la tasa de expansión del poro de fusión en el caso de las vesículas sinápticas puede determinar el incremento de concentración de glutamato en la hendidura sináptica y, por lo tanto, determinar si la transmisión sináptica ocurre o no (Choi et al., 2000).

Figura I-3: Esquema de la formación del poro de fusión y su reversibilidad

El concepto de poro de fusión ha sido estudiado también mediante amperometría con electrodos de carbono, medida indirecta, pero que permite la detección de la liberación de serotonina en mastocitos. La amperometría detecta la liberación del contenido vesicular en las primeras fases de formación del poro y la posterior liberación que aparece en la fase de expansión (Alvarez de Toledo et al., 1993). La estructura y naturaleza del poro de fusión son desconocidas, habiéndose propuesto modelos (Monck and Fernandez, 1992; Nanavati et al., 1992; Monck and Fernandez, 1994; Monck et al., 1995; Zimmerberg et al., 1995; Chanturiya et al., 1997) desde estrictamente proteicos (como un canal iónico), hasta puramente lipídicos con un

componente proteico estructural. Estudios con ratones mutantes han demostrado que la ausencia de una proteína puede tener efectos sobre el poro de fusión. En ratones mutantes para la proteína SCAMP1 se ha mostrado el aumento de la proporción de los procesos de fusión reversibles frente al ratón control (Fernandez-Chacon et al., 1999), sin afectar al desarrollo del cerebro. Este estudio sugiere que la modificación de la expresión de proteínas puede afectar a las características de apertura/cierre del poro de fusión, a pesar de que las bases moleculares que sustentan el proceso están aún por determinar.

3. LA MAQUINARIA PROTEICA DE LA EXOCITOSIS REGULADA

Desde los años 70, la idea de que el acoplamiento estímulo-secreción ocurría mediante la exocitosis regulada en vesículas secretoras ha estado aceptada. A pesar de que está claro que el Ca^{2+} era el desencadenante clave de este proceso (Katz and Miledi, 1965; Douglas, 1968), las siguientes reacciones que llevan a la fusión de membranas eran totalmente desconocidas. Desde entonces, numerosos estudios de la exocitosis de vesículas secretoras en distintos tipos celulares no consiguieron iluminar este hecho. Irónicamente, los máximos avances en la comprensión del mecanismo de la exocitosis regulada proceden de estudios genéticos y bioquímicos de la secreción constitutiva (Pryer et al., 1992; Rothman, 1994). Estos abordajes experimentales sugieren que la exocitosis regulada en la sinápsis está constituida por los mismos mecanismos básicos que la fusión de membranas constitutiva, estableciendo el concepto de la existencia de un mecanismo universal de fusión de membranas (Bennett and Scheller, 1993; Ferro-Novick and Jahn, 1994; Rothman, 1994). Esta idea está ahora generalmente aceptada, aunque el debate aún existe sobre las funciones propuestas de los componentes individuales del núcleo de maquinaria conservada y sobre el mecanismo concreto de la fusión de membranas. Aquí se mostrarán las actuales ideas de las funciones bioquímicas de las proteínas SNARE y sus proteínas reguladoras, así como las evidencias de la implicación de estas proteínas en la exocitosis de vesículas secretoras.

Tabla I-1: Datos cuantitativos de las proteínas más abundantes en las vesículas sinápticas. Modificado de (Takamori et al., 2006).

Proteína	% masa del total de proteínas	Número de copias por vesícula
Sinaptofisina	10.20	31.5
VGLUT2	9.01	14.4
Sinaptobrevina 2	8.60	69.8
Sinaptotagmina 1	7.00	15.2

Un trabajo reciente basado en pruebas bioquímicas ha permitido determinar tanto cualitativamente como cuantitativamente la composición proteica y lipídica de la vesícula sináptica (Takamori et al., 2006). La figura I-4 muestra la variedad de proteínas que se pueden encontrar en una vesícula sináptica. En este trabajo, entre otros hallazgos, cabe destacar que solamente unas pocas proteínas son muy abundantes en las vesículas sinápticas. Por ejemplo, la proteína SNARE sinaptobrevina 2 (VAMP2) está presente con 70 copias por vesícula, con 30 copias la

sinaptofisina 1 y 15 copias la sinaptotagmina 1. En contraste, muchas proteínas presentan una única copia por vesícula. Los datos cuantitativos más relevantes de este estudio se resumen en la tabla I-1.

De las proteínas presentes en la vesícula sináptica, es de interés para este trabajo señalar que de la proteína SCAMP1 hay 0.8 moléculas por vesícula sináptica y que constituye el 0.3 % de la masa de proteína presente.

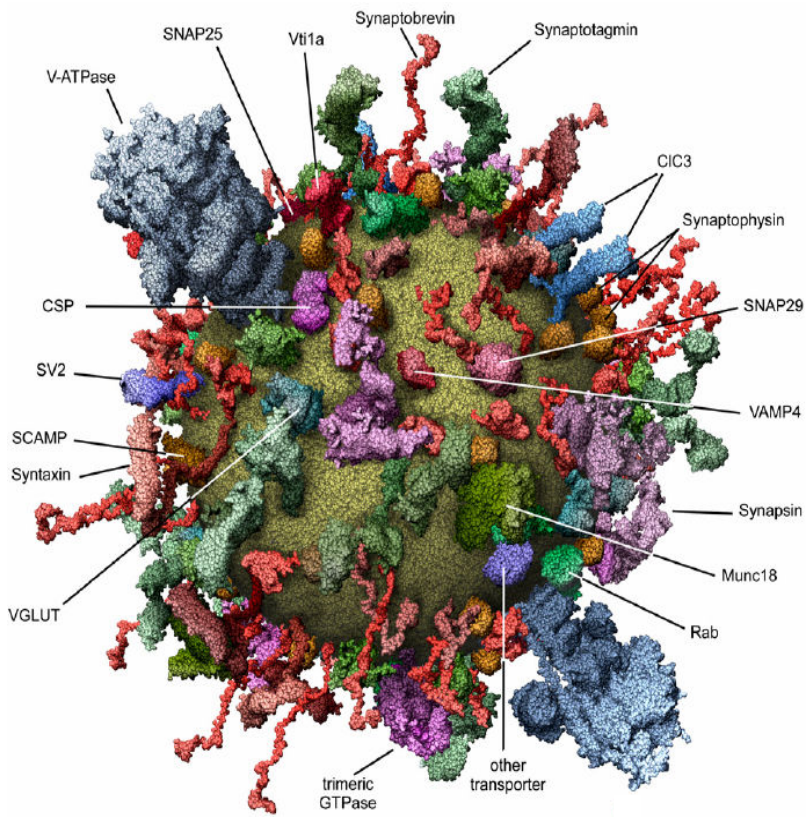

Figura I-4: Esquema de las proteínas de la vesícula sináptica identificadas hasta la fecha en el que se representan el número de cada una de ellas presentes por vesícula. Modificado de (Takamori et al., 2006)

3.1. SNAREs

Las SNAREs son proteínas de membrana localizadas en varios orgánulos intracelulares. Aunque originalmente fueron definidas como receptores de SNAP, actualmente la mayoría están definidas por una secuencia repetida de 7 aminoácidos conocida como el motivo SNARE. El denominado complejo SNARE en neuronas comprende a las proteínas integrales de membrana VAMP/sinaptobrevina (Trimble et al., 1988), la sintaxina 1 (Bennett et al., 1992) y la proteína asociada a membrana SNAP-25 (Bennett et al., 1992). VAMP es una proteína localizada en las

vesículas sinápticas, mientras que la sintaxina y SNAP-25 están presentes en la membrana presináptica. Las SNAREs están clasificadas en función de la presencia de un residuo de arginina (R) o glutamina (Q) en el motivo SNARE (Fasshauer et al., 1998b). En el complejo sináptico, la sintaxina contribuye con una hélice tipo Q, SNAP-25 contribuye con 2 hélices tipo Q y VAMP con una hélice tipo R (Poirier et al., 1998; Sutton et al., 1999). El complejo SNARE está constituido por lo tanto por 3 hélices tipo Q y una hélice R, aunque éste puede estar formado por 3 o 4 proteínas ya que los homólogos de SNAP-25 suelen aportar 2 hélices . Esta proporción 3Q:1R ha sido una combinación esencial en la cual, a modo de modelo "llave-cerradura", permite el emparejamiento específico y la consecuente fusión de membranas en ensayos de fusión de liposomas (McNew et al., 2000a; Parlati et al., 2000). Esto da lugar a un modelo funcional denominado "hipótesis SNARE" en el que la especificidad de las interacciones de Q y R-SNARE son las responsables del "*docking*" y posterior fusión de las membranas . Los residuos Q y R por sí mismos no son esenciales para la fusión de membranas (Graham et al., 2001); sin embargo, la mutación de estos residuos de aminoácidos impiden, como se explicará más adelante, el posterior desensamblaje del complejo SNARE por NSF y las SNAPs.

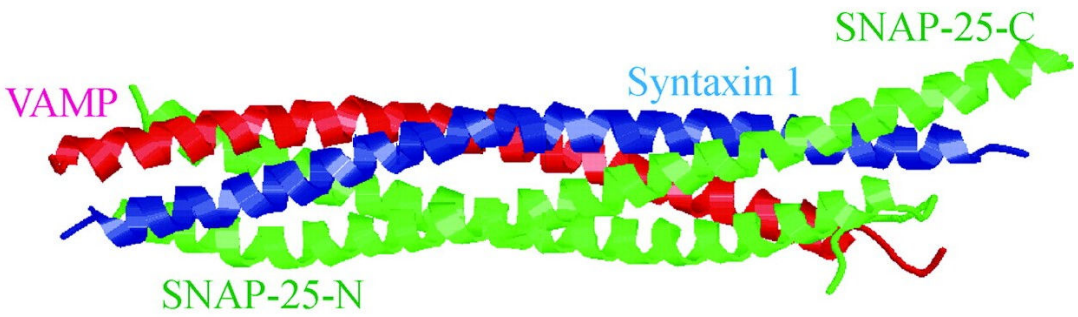

Figura I-5: Estructura tridimensional del complejo SNARE. Modificado de (Sutton et al., 1998)

La eliminación genética de las SNAREs sinápticas en *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* y *Mus musculus* elimina la neurotransmisión (Schulze et al., 1995; Nonet et al., 1998; Schoch et al., 2001; Washbourne et al., 2002). Adicionalmente a los estudios en animales genéticamente modificados, el uso de las neurotoxinas clostridiales ha proporcionado importantes pruebas de las funciones esenciales de las SNAREs en la exocitosis. El descubrimiento clave fue que la toxina tetánica y botulínica B son metaloendoprotasas que bloquean la neurotransmisión presinápticamente mediante la rotura selectiva de VAMP (Link et al., 1992; Schiavo et al., 1992). Tras este hallazgo, se estableció que las restantes seis toxinas botulínicas ejercían su acción bien sobre VAMP, sintaxina 1 o SNAP-25 (Schiavo et al., 1992;

Blasi et al., 1993; Schiavo et al., 1993a; Schiavo et al., 1993b; Binz et al., 1994; Schiavo et al., 1994; Vaidyanathan et al., 1999). La cadena ligera de la neurotoxina clostridial (la subunidad proteolítica) es capaz de bloquear la exocitosis de vesículas en células cromafines adrenales permeabilizadas y en células PC12 (Bittner and Holz, 1988; Ahnert-Hilger et al., 1989; Bittner et al., 1989; McInnes and Dolly, 1990; Lomneth et al., 1991), indicando que las SNAREs son necesarias para la exocitosis en estas células neuroendocrinas. Las toxinas clostridiales se han probado en numerosos tipos celulares secretores, en la mayoría de los cuales la secreción estaba bloqueada.

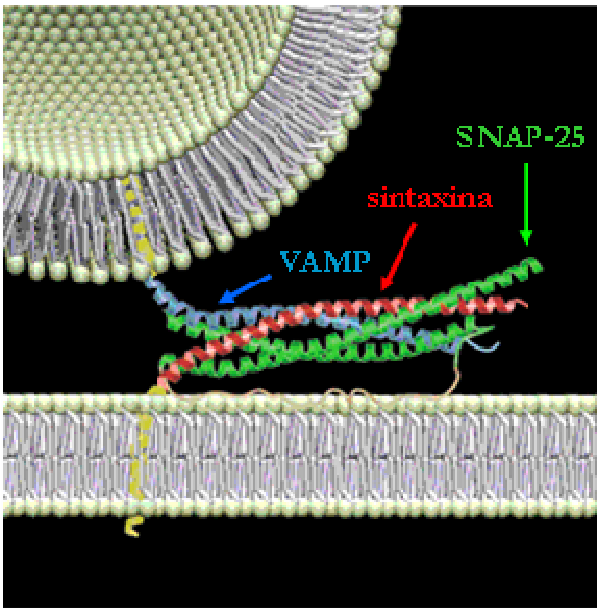

Figura I-6: Modelo de la estructura tridimensional del complejo SNARE interaccionando con las membranas de la vesícula y plasmática. Modificado de (Sutton et al., 1998).

Claramente, las SNAREs son críticas para la exocitosis vesicular, pero se desconoce cual es su papel en el proceso. Se ha comprobado que las SNAREs por sí mismas pueden generar la fusión de membranas. La aplicación de toxina tetánica genera la acumulación de vesículas sinápticas en estado *"docked"* en la sinapsis, sugiriendo que la función de las SNAREs es posterior a la fase de "*docking"* y de *"tethering"*. Por otra parte, la formación del complejo SNARE está energeticamente muy favorecida; los complejos SNARE son resistentes al SDS y son extremadamente estables térmicamente (Hayashi et al., 1994; Fasshauer et al., 1998a). Además, la estructura de los complejos SNARE sinápticos es tal, que la formación de la estructura "coiled-coil" coloca en oposición las proteínas ancladas a cada una de las membranas que serán fusionadas (VAMP y sintaxina) (Hanson et al., 1997b; Hohl et al., 1998; Poirier et al., 1998; Sutton et al., 1998). También la fusión de membranas entre liposomas artificiales es posible con la única presencia de SNAREs recombinantes (Weber et al., 1998; McNew et al., 1999; McNew et al.,

2000a; McNew et al., 2000b). Con todas estas pruebas se genera un modelo donde el cambio conformacional de la sintaxina expone su hélice H3, la cual funciona como lugar de nucleación para la interacción con el dominio "*coiled-coil"* de VAMP y las dos hélices de SNAP-25. Según este modelo, la formación del complejo triproteico permite la fusión de membranas al desencadenar suficiente energía para vencer la barrera de hidratación (fig. I-6).

Las proteínas SNARE más estudiadas son las isoformas presentes en tipos celulares neuronales. Ensayos bioquímicos apuntan a que en mastocitos las isoformas SNARE implicadas en la exocitosis de las vesículas secretoras son la SNAP-23 y sintaxina 4 como t-SNAREs y la VAMP-8 como v-SNARE (Paumet et al., 2000). La presencia de estas isoformas en los mastocitos explica la insensibilidad a las toxinas clostridiales y tetánicas de la exocitosis de este tipo celular (Guo et al., 1998; Vaidyanathan et al., 2001).

3.2. NSF y α-SNAP

Tanto NSF como α-SNAP son proteínas solubles que desensamblan los complejos SNARE. Debido a la estabilidad de los complejos SNARE, el desensamblaje requiere el aporte de energía que es obtenida de la hidrólisis de ATP catalizada por la proteína homosexamérica NSF (Sollner et al., 1993b). Se piensa que los cambios conformacionales en NSF inducidos por la hidrólisis de ATP son transducidos a través del "desenrollamiento" de las cuatro hélices del complejo SNARE. El uso de ensayos con células permeabilizadas y de técnicas electrofisiológicas de gran resolución han demostrado que α -SNAP/NSF actúan en la reacción de "*priming"* ATP-dependiente que precede al paso de fusión dependiente de Ca^{2+} (Chamberlain et al., 1995; Banerjee et al., 1996; Xu et al., 1999).

Esta reacción de preparación o "*priming"* es probable que consista en el desensamblaje de los complejos SNARE, dado que las moléculas α-SNAP modificadas genéticamente no pueden inducir la actividad ATPasa de NSF. De este modo, la ausencia de desensamblaje de los complejos SNARE impide la exocitosis (Barnard et al., 1997; Nagamatsu et al., 1999; Xu et al., 1999; Graham and Burgoyne, 2000).

Debido a que los complejos trans-SNARE formados entre membranas opuestas son inaccesibles estéricamente para el hexámero NSF, parece probable que los sustratos de la reacción de "*priming"* son complejos cis-SNARE ya formados en la misma membrana. De hecho, se han encontrado niveles significativos de sintaxina y SNAP-25 tanto en vesículas sinápticas (Walch-Solimena et al., 1995) como en vesículas de cromafines (Tagaya et al., 1995; Hohne-Zell

and Gratzl, 1996; Tagaya et al., 1996), siendo los complejos SNARE formados en las vesículas desensamblados por α-SNAP/NSF (Otto et al., 1997). Estas observaciones sugieren que α-SNAP/NSF actúan como chaperonas moleculares, continuamente desensamblando complejos cis-SNARE para liberar las proteínas SNARE para que queden libres y posibilitar la formación de nuevos complejos trans-SNARE que generen nuevos eventos de fusión (Burgoyne and Morgan, 1998a).

3.3. Proteínas Sec1

Además de NSF, SNAPs y SNAREs, hay otro tipo de proteínas conservadas necesarias para el tráfico intracelular de membranas. Estudios genéticos han mostrado la importancia de una familia de genes denominada Sec-1 en la fusión de vesículas en una gran variedad de organismos, entre los que están incluidos levaduras, plantas, nemátodos, moscas y ratones (Munc-18) (Halachmi and Lev, 1996; Verhage et al., 2000; Assaad et al., 2001). La ausencia de Sec1 generalmente conlleva al bloqueo completo del tráfico de membrana, indicando un papel positivo en funciones esenciales. Estudios en células PC12 han mostrado que la unión de Sec1 con la sintaxina produce una activación de ésta, siendo la unión Sec1/sintaxina un intermediario necesario para la incorporación en el complejo SNARE (Dulubova et al., 1999; Bryant and James, 2001). Esta idea es consistente con los experimentos en células cromafines con mutantes de Munc-18 cuya afinidad por la sintaxina está disminuida. En estos mutantes se ha encontrado un incremento en la tasa de expansión del poro de fusión (Fisher et al., 2001), lo cual puede deberse a un incremento de sintaxina activada en la maquinaria de fusión.

3.4. Rabs y efectores

Las proteínas Rab forman la mayor familia dentro de la superfamilia de pequeñas GTPasas Ras. Individualmente, las proteínas Rab se localizan en distintos y característicos orgánulos, sugiriendo que cada una regula una etapa concreta dentro del tráfico de membrana. La función de las proteínas Rab parece ser la de actuar como interruptores moleculares, con un estado activo unido a GTP que determina el tiempo en el que las vesículas permanecen competentes para el *docking* o la fusión, justo antes de que la hidrólisis del GTP genere la forma inactiva de la proteína (Rybin et al., 1996). Existe un consenso general de que las proteínas Rab son los principales determinantes de la especificidad de los distintos compartimentos implicados en el tráfico de membrana, mediante interacciones selectivas con las distintas proteínas efectoras (Segev, 2001; Zerial and McBride, 2001). Estudios genéticos han mostrado interacciones entre los homólogos

de Sec1 y las proteínas Rab, siendo por lo tanto la familia Sec1 una clase de efectores de Rab (Halachmi and Lev, 1996; Segev, 2001).

Rab3 existe en mamíferos como 4 isoformas denominadas de la A a la D y es la de mayor implicación en la exocitosis regulada en neuronas y células neuroendocrinas. Rab3A es una proteína no esencial en mamíferos pero que regula la neurosecreción al limitar el reclutamiento de vesículas sinápticas en el "*releaseable pool"* para la posterior fusión de membranas (Geppert et al., 1994a; Geppert et al., 1997).

3.5. Proteínas de unión a calcio

El casi universal papel del calcio como activador de la exocitosis vesicular predice la existencia de proteínas conservadas responsables de activar la maquinaria de fusión al unirse a calcio. Se han propuesto varias candidatas para tal función (Burgoyne and Morgan, 1998b), pero la sinaptotagmina ha sido la que más atención ha recibido como el sensor de calcio de la exocitosis regulada. Las sinaptotagminas interaccionan con numerosas proteínas implicadas en la exocitosis vesicular, incluyendo canales de Ca^{2+} (Leveque et al., 1992), complejo SNARE (Sollner et al., 1993a), β-SNAP (Schiavo et al., 1995) y calmodulina (Fournier and Trifaro, 1988). Estas interacciones ocurren en ausencia de Ca^{2+}, pero en su presencia, la unión de, por ejemplo, la sinaptotagmina 1 al complejo SNARE está fuertemente potenciada (Davis et al., 1999; Gerona et al., 2000).

La propiedad de interaccionar con las membranas y con la maquinaria de fusión en respuesta a distintos niveles de Ca^{2+} sugiere que las sinaptotagminas sean unos sensores ubicuos de Ca^{2+}. Las pruebas experimentales que apoyan esta hipótesis proceden de estudios genéticos en *Drosophila*, *C. elegans* y ratones, donde los mutantes de sinaptotagmina tienen imposibilitada la transmisión sináptica (DiAntonio et al., 1993; Littleton et al., 1993; Nonet et al., 1993; Geppert et al., 1994b). En el caso de los ratones, una mutación en la sinaptotagmina 1 que causa una disminución de afinidad por el Ca^{2+} muestra una disminución similar en la dependencia de la exocitosis de las vesículas sinápticas por el Ca^{2+} (Fernandez-Chacon et al., 2001). Esto demuestra que la sinaptotagmina I es el principal sensor de calcio en la exocitosis de las vesículas sinápticas. En el caso de la exocitosis vesicular, el análisis de células cromafines procedentes de ratones "*knock-out*" de sinaptotagmina I revela la imposibilidad de la exocitosis rápida, pero tiene poco efecto en el componente lento de la exocitosis (Voets et al., 2001). Este efecto inhibitorio es específico sobre la fase de fusión de membranas por Ca^{2+}, sugiriendo que la sinaptotagmina I controla una de las fases tardías del proceso de fusión (Ohara-Imaizumi et al.,

1997; Desai et al., 2000). Además, la sobreexpresión de la sinaptotagmina I prolonga la transición de la formación del poro de fusión hacia su expansión (Wang et al., 2001).

4. LAS VIAS DE SEÑALIZACIÓN QUE RIGEN LA EXOCITOSIS DE VESÍCULAS SECRETORAS

4.1. Ca^{2+}

En los tipos celulares donde un aumento del Ca^{2+} intracelular es el principal o único disparador del inicio de la exocitosis regulada, la procedencia del Ca^{2+} puede ser el exterior celular, los almacenes intracelulares o ambos. El uso o importancia relativa de estas dos fuentes de Ca^{2+} varía considerablemente entre tipos celulares. Existen células en las que la entrada de Ca^{2+} es el único estímulo efectivo para la exocitosis y células en las que los almacenes de Ca^{2+} son la principal fuente de Ca^{2+}.

La elevación del Ca^{2+} citosólico desde un nivel basal de 0.1 μM hasta los niveles requeridos para desencadenar la exocitosis ocurre mediante la activación de canales de Ca^{2+}. Existe una gran variedad de canales de Ca^{2+}, entre los que se encuentran los activados por segundos mensajeros, por voltaje o por concentración de Ca^{2+} intracelular. Adicionalmente, muchos otros procesos pueden modificar la amplitud o la duración del incremento de Ca^{2+}. La difusión limitada del Ca^{2+}, provocada por la acción tampón de la entrada de Ca^{2+} al interior de la mitocondria (Giovannucci et al., 1999), es un ejemplo de esta limitación. Otros factores que afectan a la exocitosis regulada por Ca^{2+} son la distribución de los canales (Segura et al., 2000), las distintas vías de entrada del Ca^{2+} (Cheek et al., 1993) y los distintos lugares de almacén de Ca^{2+} respecto a las vesículas secretoras (Segura et al., 2000).

La sensibilidad de la maquinaria de la exocitosis ante el Ca^{2+} es una característica de gran importancia. Los experimentos realizados en esta línea permiten conocer la relación entre las señales fisiológicas de Ca^{2+} observadas y la eficiencia en la activación de la exocitosis. También se obtienen pistas sobre las propiedades de las proteínas fisiológicamente relevantes detectoras de Ca^{2+} implicadas en la exocitosis (Burgoyne and Morgan, 1998b). Para ello se han utilizado principalmente dos técnicas:

1) Medidas en poblaciones celulares de la liberación vesicular tras la permeabilización celular e introducción de Ca^{2+} en el interior celular.
2) Medidas de la capacidad eléctrica de células únicas mediante la técnica de "*patch-clamp*" con la que se monitoriza la cinética de la exocitosis.

El trabajo de Katz y Miledi (Katz and Miledi, 1965) estableció la importancia del Ca^{2+} mostrando la necesidad de Ca^{2+} externo para el proceso de liberación en la unión neuromuscular. Esto fue posteriormente extendido por el trabajo de Douglas (Douglas, 1968) en células cromafines y posteriormente en los terminales neurosecretores de la neurohipófisis. Adicionalmente, la activación de la exocitosis mediante ionóforos de Ca^{2+} (Douglas, 1968) y la medida de las señales de Ca^{2+} generadas en células secretoras tras estímulos fisiológicos (Cheek, 1991; Cheek et al., 1993), han reforzado el papel del Ca^{2+} en el acoplamiento estímulo-secreción. La utilización de la electropermeabilización de los huevos del erizo de mar y de células cromafines permite la introducción de tampones de Ca^{2+} en las células electroporadas. Estos estudios revelaron que la exocitosis de gránulos en estas células presentaban la mitad de activación máxima con una concentración de 1 μM de Ca^{2+} libre. Estos pioneros estudios fueron los primeros en medir directamente los requisitos de Ca^{2+} de la exocitosis regulada. El mismo tipo de dependencia ante el Ca^{2+} de la fusión de los granos corticales de los huevos del erizo de mar (Baker and Whitaker, 1978) y de las vesículas de las células cromafines (Baker and Knight, 1978) indicaron que el mecanismo sensor de Ca^{2+} es similar en ambos tipos celulares. A partir de entonces, se han aplicado con éxito técnicas de permeabilización en diferentes tipos celulares. Estos estudios no han demostrado únicamente la necesidad del Ca^{2+} para la exocitosis en diversos tipos celulares, sino que también sirvieron para mostrar la necesidad de ATP (Baker and Knight, 1978; Baker and Whitaker, 1978) en los primeros pasos de la fusión ("*priming*") (Holz et al., 1989), no siendo necesario durante la fusión de membranas (Holz et al., 1989; Lindau and Gomperts, 1991; Parsons et al., 1995; Haller et al., 1998; Xu et al., 1999). La permeabilización también ha sido una técnica muy utilizada para la introducción de proteínas recombinantes que permiten el estudio de la función de proteínas implicadas en la exocitosis.

En la mayoría de los casos, el uso de células permeabilizadas ha mostrado que el requerimiento para el disparo de la exocitosis se encuentra en el rango micromolar. Es cierto también que existen múltiples pasos dependientes de Ca^{2+} en la vía exocítica. Adicionalmente, los ensayos con células permeabilizadas tienen poca resolución temporal, ya que generan principalmente información sobre la intensidad de la liberación durante periodos de tiempo relativamente largos. Es por ello que la señal que provoca el Ca^{2+} en este tipo de ensayos no puede, por lo tanto, reflejar la verdadera dependencia de Ca^{2+} del paso final de la exocitosis, sino la concentración media requerida para mantener una liberación sostenida sobre el periodo de tiempo (varios minutos) que dura este tipo de ensayos.

La técnica utilizada posteriormente ha sido la medida de la capacidad eléctrica de la membrana mediante "*patch-clamp*" de alta resolución. Gracias a ella se ha establecido de forma más exacta la dependencia de Ca^{2+} del paso final de la fusión de membranas. Los registros de capacidad eléctrica mediante la técnica de "*patch-clamp"* en la configuración de célula completa ("*whole-cell"*) fueron desarrollados por Neher y Marty (Neher and Marty, 1982; Neher and Zucker, 1993) en estudios con células cromafines adrenales. La posibilidad de resolver los eventos de fusión individuales fue utilizada en estudios de la exocitosis en mastocitos, lo que permite el estudio de la cinética de la exocitosis con una gran resolución.

La capacidad eléctrica de la membrana es una propiedad inherente de la capa bilipídica que es capaz de cargarse eléctricamente cuando se aplica una diferencia de potencial a la bicapa. Debido a que la capacidad es directamente proporcional al área de la bicapa (la relación entre ambas es de 10 fF / μm^2), esta técnica permite una aproximación cuantitativa de la incorporación de membrana mediante exocitosis o de la eliminación de ésta mediante endocitosis. Inicialmente en estos estudios la estimulación de la exocitosis se realizaba mediante despolarización para provocar la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Neher and Zucker, 1993) o mediante la introducción de tampones de Ca^{2+} con la micropipeta al dializar el contenido celular (Augustine and Neher, 1992; Burgoyne and Handel, 1994). Utilizando ésta última aproximación se mostró que la dependencia de Ca^{2+} es similar a la obtenida mediante experimentos de permeabilización celular. Una determinación más precisa del requerimiento de Ca^{2+} del último paso de la fusión fue conseguida mediante el uso de la fotolisis de compuestos secuestradores de Ca^{2+} ("*flash photolysis of caged* Ca^{2+} *compounds"*) acoplado a las medidas de alta resolución de la capacidad de la membrana (Neher and Zucker, 1993; Thomas et al., 1993a). Los compuestos secuestradores de Ca^{2+} se introducen en la pipeta de "*patch*" en su forma unida a Ca^{2+}. Un destello de luz de gran intensidad rompe la unión entre el compuesto secuestrador y el Ca^{2+}, liberándose de forma casi instantánea y homogéneamente por todo el citoplasma. Estas características permiten el cálculo de la relación entre la concentración de Ca^{2+} libre y la tasa inicial de exocitosis de las vesículas pertenecientes a la denominada población preparada para liberarse (ready releaseable pool, RRP). Tales experimentos realizados en células cromafines (Heinemann et al., 1993; Neher and Zucker, 1993; Heinemann et al., 1994), melanotrofos de la pituitaria (Rupnik et al., 2000) y posteriormente en células β (Eliasson et al., 1996), PC12 (Eliasson et al., 1996) y células acinares pancreáticas (Ito et al., 1997) mostraron la existencia de una limitada población de vesículas preparadas para la liberación que pueden provocar la

exocitosis rápida (con un retraso de 20 a 50 ms) y con una dependencia de Ca^{2+} con un rango de 2 - 30 μM.

La determinación de la sensibilidad ante el Ca^{2+} de la maquinaria proteica ha permitido la identificación de la sinaptotagmina I (y miembros de su familia) como el principal sensor de Ca^{2+} para la exocitosis. Tanto el ratón *"knock-out"* de la sinaptotagmina I (Geppert et al., 1994b), como mutantes en *Drosophila* (DiAntonio et al., 1993; Littleton et al., 1993) y en *C.elegans* (Jorgensen et al., 1995) muestran un importante defecto en la neurotransmisión. La interacción dependiente de Ca^{2+} de la sinaptotagmina con la sintaxina obtenida experimentalmente *in vitro* señaló a la sinaptotagmina I como el principal sensor de Ca^{2+} para la exocitosis de vesículas sinápticas. Se ha sugerido también que las sinaptotagminas, incluida la sinaptotagmina I, puede regular la exocitosis en líneas celulares procedentes de mastocitos (Baram et al., 1998; Baram et al., 1999), aunque en mastocitos la exocitosis requiere de la activación de las proteínas de unión a GTP. Un reciente examen de la selectividad de iones de la exocitosis en células PC12 ha mostrado que la selectividad iónica de la exocitosis de gránulos secretores es consistente con la implicación de la sinaptotagmina como sensor de Ca^{2+} (Kishimoto et al., 2001) . Los datos obtenidos con un ratón *"knock-in"* con la mutación puntual R233Q en el dominio C2A (Fernandez-Chacon et al., 2001) muestran que esta mutación reduce la afinidad de la unión con fosfolípidos dependiente de Ca^{2+} de la sinaptotagmina I y disminuye también la sensibilidad del Ca^{2+} de la exocitosis evocada de las vesículas sinápticas, sugiriendo que la sinaptotagmina I es el sensor de Ca^{2+} para la exocitosis en tipos celulares neuronales. Otro aspecto de la sinaptotagmina que se ha puesto de manifiesto es la habilidad de afectar a la cinética de la liberación de vesículas únicas en células PC12, sugiriendo que puede funcionar durante la fusión de membranas a nivel del poro de fusión (Wang et al., 2001).

Otro tema importante para la comprensión de la relación entre el Ca^{2+} y la exocitosis es la distribución espacial entre las vesículas secretoras y la fuente de Ca^{2+} (Neher, 1998; Segura et al., 2000). Como se comenta posteriormente, esto puede determinar la efectividad de la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes intracelulares en la activación de la exocitosis. Adicionalmente, se le ha dado bastante importancia a la cuestión de cómo de cerca de los canales ocurre la fusión y el grado de acoplamiento ante la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis. En las vesículas sinápticas, se asume de forma general que la rápida velocidad de la neurotransmisión (que ocurre en una escala inferior al milisegundo siendo de 60 μs en las sinapsis más rápidas centrales (Sabatini and Regehr, 1996)), implica que las vesículas que se fusionan interaccionan con el Ca^{2+} que no ha

podido difundir más allá del poro del canal. Éste debe ser el caso también si la exocitosis de las vesículas sinápticas implica un sensor de baja afinidad como se sugiere para las neuronas bipolares de la retina de la carpa dorada (Heidelberger et al., 1994). Se han demostrado interacciones moleculares entre algunas de las proteínas que componen la maquinaria de la exocitosis como la sintaxina, la sinaptotagmina y varias subunidades de los canales de Ca^{2+}, sugiriendo que los canales de Ca^{2+} voltaje dependientes implicados en la neurotransmisión están situados en el lugar de exocitosis (Catterall, 1998; Catterall, 2000). De estos experimentos también se ha concluido que es poco probable que exista un estrecho acoplamiento físico entre los canales de Ca^{2+} y las vesículas secretoras en células cromafines. Esto no descarta la posibilidad de que la exocitosis ocurra predominantemente en determinados dominios de la célula y de que haya dominios ricos en canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes, ya que tales dominios han sido de hecho observados experimentalmente (Monck et al., 1994; Robinson et al., 1996).

La discusión anterior se refiere a células en las que el Ca^{2+} actúa como el activador de la exocitosis. En los tipos celulares en los que el Ca^{2+} no es el activador, se ha demostrado que el Ca^{2+} puede tener otro papel adicional en la exocitosis. En mastocitos y en eosinófilos, la exocitosis puede provocarse por la introducción de análogos de GTP no hidrolizables. El aumento de la concentración de Ca^{2+} en estos tipos celulares hasta 1.5 μM no incrementa el número de eventos de fusión sobre los observados a muy bajas concentraciones de Ca^{2+}, pero afecta a un estado tardío en el evento de fusión que se refleja en un incremento en la tasa de expansión del poro de fusión (Fernandez-Chacon and Alvarez de Toledo, 1995; Hartmann and Lindau, 1995; Scepek et al., 1998). Esto indica que una proteína de unión a Ca^{2+} debe actuar también durante o inmediatamente después del proceso de fusión.

4.2. AMP cíclico

Existen ciertos tipos celulares en los que los incrementos de concentración intracelular de AMP cíclico (AMPc), y por lo tanto la activación de la proteína quinasa A (PKA), son capaces de regular la exocitosis disparada por Ca^{2+}. Se ha comprobado la existencia de un potenciamiento de la exocitosis por AMPc por ejemplo en sinapsis (Chavez-Noriega and Stevens, 1994), células cromafines adrenales (Knight et al., 1988) y células PC12 (Rabe et al., 1982) entre otras. En ciertas sinapsis, la activación constitutiva de la PKA parece que es necesaria para mantener el proceso de la exocitosis (Hilfiker et al., 2001). En todos estos tipos celulares, sin embargo, una elevación de AMPc sin aumento en la concentración de Ca^{2+} no es suficiente para activar la exocitosis. En contraste, un limitado número de tipos celulares (Hilfiker et al., 2001), incluyendo

las glándulas salivares, usan el AMPc como el principal activador de la exocitosis. Las vías exocíticas dependientes del AMPc y del Ca^{2+} coexisten en estas células y es probable que utilicen un mecanismo final común dependiente de SNARE. La implicación de otros componentes SNARE o de la maquinaria general de fusión en la exocitosis activada por AMPc, no ha sido investigada todavía. Adicionalmente, los mecanismos moleculares por los cuales el AMPc induce la exocitosis no han sido establecidos.

El papel regulador del AMPc en la exocitosis activada por Ca^{2+}, que ha sido observado en varios tipos celulares, puede ser debido a la fosforilación de una o más de las proteínas de la maquinaria general de la exocitosis que son sustratos de la PKA (Turner et al., 1999). El principal candidato para este papel es la proteína CSP (cysteine string protein), la cual es sustrato de la PKA *in vitro* e *in vivo*. La fosforilación de la CSP reduce su afinidad de unión por las proteínas sintaxina y sinaptotagmina I (Evans and Morgan, 2002).

4.3. Proteínas de unión a GTP

Anteriormente se ha discutido la importancia general de la familia Rab de GTPasas en el control de la maquinaria de fusión y en la exocitosis. El papel exacto de las proteínas Rab en la exocitosis regulada no está claro, y se han descrito pruebas que apoyan funciones tanto inhibitorias como activadoras de las proteínas Rab (Darchen and Goud, 2000). Algunas pruebas han sugerido que otras proteínas de unión a GTP pueden regular la exocitosis. Se ha realizado un gran esfuerzo para abordar el análisis del papel regulador de las proteínas de unión a GTP en la exocitosis en un gran número de tipos celulares secretores (Lindau and Gomperts, 1991). El punto de partida para estos estudios fue la demostración de que la guanosina 5'-O-(3-tiotrifosfato) (GTPγS), un análogo no hidrolizable de GTP, podía activar la exocitosis detectada mediante la medida de la capacidad de la membrana en ausencia de un aumento intracelular de Ca^{2+} en mastocitos (Fernandez et al., 1984), lo que llevó a interpretar que los análogos no hidrolizables inician la exocitosis por la activación de la proteína G heterotrimérica en el núcleo de la maquinaria exocitótica (Diaz et al., 1989). Los efectos de los análogos de GTPγS pueden ser muy complejos, y pueden estar implicadas varias proteínas de unión a GTP. Adicionalmente, la activación de las proteínas G sólo actúa como un activador de la exocitosis independiente de Ca^{2+} en algunos tipos celulares, entre los que se encuentran los mastocitos. La posible importancia de las proteínas de unión a GTP en la exocitosis de mastocitos fue desvelada por la posibilidad de introducir los análogos de GTP en el interior de la célula, estimulando así la exocitosis (Gomperts, 1983). Posteriores trabajos con mastocitos permeabilizados (Hide et al., 1993; Lillie and

Gomperts, 1993), medidas de capacidad mediante "*patch-clamp*" (Fernandez et al., 1984) y microinyección (Tatham and Gomperts, 1991), han establecido que la activación de las proteínas de unión a GTP es suficiente para activar la exocitosis sin la necesidad de un incremento de Ca^{2+} en este tipo celular. La activación de la exocitosis en mastocitos requiere de la presencia de Ca^{2+}, pero el aumento de Ca^{2+} es incapaz de desencadenar la exocitosis por si mismo (Howell et al., 1987; Koopmann and Jackson, 1990). No está claro, por lo tanto, si las proteínas de unión a GTP que activan la exocitosis en mastocitos es una única proteína o si son varias las que actúan para la activación. A pesar de esta diferencia en el activador, la exocitosis dependiente de GTP en mastocitos emplea la maquinaria SNARE (Baram et al., 1998; Guo et al., 1998). Los mecanismos finales implicados en la fusión de gránulos en mastocitos son, por lo tanto, probablemente los mismos que la exocitosis activada por Ca^{2+} en otros tipos celulares.

Algunos de los efectos reguladores en la exocitosis de la activación de proteínas G están mediados por las subunidades α de las proteínas G. Trabajos realizados en mastocitos (Pinxteren et al., 1998) y en células secretoras de insulina (Zhang et al., 1998) han sugerido que las subunidades β y γ de las proteínas G son necesarias para la exocitosis.

Las células cromafines adrenales son un tipo celular muy bien caracterizado donde la clave en la activación es un incremento del Ca^{2+} citosólico, siendo suficiente para estimular la exocitosis (Burgoyne, 1991). En este tipo celular se ha demostrado que el GTPγS puede potenciar la exocitosis dependiente de Ca^{2+} (Burgoyne et al., 1989; Morgan and Burgoyne, 1990).

5. CINÉTICA DE LA SECRECIÓN EN DISTINTOS TIPOS CELULARES

La exocitosis regulada de vesículas secretoras ha sido estudiada durante muchos años en un gran número de tipos celulares. Ello ha dado como resultado una exhaustiva caracterización de la regulación fisiológica de la secreción y la identificación de las señales intracelulares implicadas. Durante mucho tiempo se sospechó que los mecanismos que soportaban la exocitosis regulada debían ser bastante diferentes entre tipos celulares y en particular, a la sinapsis, donde la exocitosis es más rápida. En los últimos años se ha producido un gran avance en nuestro conocimiento de muchas proteínas que son necesarias para la exocitosis y que regulan el proceso. Uno de los aspectos más sorprendentes ha sido el descubrimiento, al principio de los años 90, de que proteínas muy similares tienen la misma función en la exocitosis sináptica y en la exocitosis constitutiva en levaduras. La expresión de isoformas de SNARE y sus reguladores está siendo ahora extensamente catalogada en muchos tipos celulares secretores. Parece por lo tanto que el mismo conjunto básico de proteínas (o isoformas de ellas) funcionan en la exocitosis en todos los tipos celulares que han sido examinados, y que estas son probablemente las proteínas universales para el proceso. Un núcleo de maquinaria proteica semejante también funciona en otros eventos de fusión en el interior de la célula pero sin control de un sensor que requiera un aumento de Ca^{2+} intracelular u otro tipo de señal (AMPc o activación de proteínas de unión a GTP). La universalidad de los mecanismos que soportan la exocitosis ha simplificado enormemente nuestro pensamiento, lo que significa que estos no necesitan ser estudiados en detalle en todos los tipos celulares.

A pesar de las numerosas similitudes en el proceso de la exocitosis regulada en la mayoría de tipos celulares, existen diferencias evidentes que reflejan las diferentes funciones fisiológicas de cada tipo celular de forma particular. Entre estas peculiaridades se encuentran, por ejemplo, las variaciones en la tasa de exocitosis, el tiempo de retraso hasta que comienza su curso temporal y la proporción de vesículas que sufren fusión en respuesta a la estimulación.

5.1. Tasa de secreción

El terminal nervioso posee un tipo muy especializado de exocitosis diseñado para permitir un inicio muy rápido del proceso en una escala temporal de submilisegundos (Sabatini and Regehr, 1996) y es terminado de forma muy rápida para permitir la transmisión de la señal rápida y corta a través de la sinapsis. Algunas células endocrinas y neuroendocrinas pueden iniciar la exocitosis en decenas de milisegundos (Chow et al., 1992; Ammala et al., 1993; Thomas et al.,

1993a; Thomas et al., 1993b; Heinemann et al., 1994), pero en otros muchos tipos celulares el inicio es lento (Fernandez et al., 1984), del orden de segundos, y la exocitosis se prolonga durante largos periodos. Habitualmente en el caso de la secreción hormonal, la exocitosis no es un proceso rápido dado que sus efectos son sistémicos tras el transporte por el sistema circulatorio.

5.2. Proporción de vesículas secretadas

La proporción de vesículas que sufren exocitosis en repuesta a la estimulación es variable entre los distintos tipos celulares. En el caso de las células cromafines adrenales, por ejemplo, un estímulo fisiológico (un potencial de acción) en la medula adrenal resulta en una liberación menor de una vesícula por célula de media, a pesar de la existencia de una población ("*pool")* de reserva de 30.000 vesículas por célula (Phillips, 1982). De hecho, la liberación masiva de las células cromafines adrenales sería fatal para el organismo. En contraste, los mastocitos funcionan de forma todo o nada. Dentro de una población, los mastocitos o se desgranulan o no, y si lo hacen, prácticamente todas las vesículas sufren exocitosis (Hide et al., 1993). Esto es fisiológicamente importante para permitir una concentración elevada de histamina a partir de un número reducido de mastocitos en tejidos concretos.

5.3. Mecanismos de focalización de la respuesta secretora

Otra diferencia entre tipos celulares secretores que puede estar relacionada con su función es la existencia de exocitosis compuesta. En este tipo de exocitosis, la fusión de una vesícula secretora con la membrana plasmática es seguida por fusiones adicionales de otras vesículas con la que inicialmente se había fusionado con la membrana. Esto se ha observado mediante microscopía electrónica al distinguirse invaginaciones hacia el interior celular generados por la fusión de varias vesículas. La existencia de este tipo de exocitosis ha sido muy controvertida en algunos tipos celulares incluyendo las células cromafines adrenales (Baker and Knight, 1981; Furuya et al., 1989; Plattner et al., 1997), donde es probable que sea un evento raro. En contraste, esto tipo de exocitosis puede darse con mayor frecuencia o incluso ser predominante en algunos tipos celulares como en el caso de los eosinófilos. La principal función de los eosinófilos es eliminar parásitos secretando proteínas citotóxicas sobre ellos. La restricción de la exocitosis compuesta focalizada en un sitio concreto cercano al parásito sería un mecanismo fisiológico obvio para dirigir la secreción únicamente hacia el organismo invasor. La exocitosis compuesta en eosinófilos ha sido visualizada por microscopía electrónica (Newman et al., 1996),

y estudios electrofisiológicos han establecido que puede ser disparada por GTPγS introducido durante el registro de la capacidad eléctrica de la membrana (Scepek et al., 1994; Hartmann and Lindau, 1995). En eosinófilos, la exocitosis compuesta puede estar precedida por fusión vesícula-vesícula en el interior celular de forma que se fusionan varias vesículas con la membrana celular (Scepek et al., 1994). En otros tipos celulares, la exocitosis compuesta no aparece acompañada por la fusión vesícula-vesícula anterior al evento exocitótico. Las células que sufren exocitosis compuesta son capaces de prevenir la fusión vesícula-vesícula, pero la exocitosis compuesta requiere de los componentes de membrana para que la primera fusión tenga lugar. La exocitosis compuesta también puede explicar el todo o nada que ocurre en mastocitos, dado que la fusión de una vesícula puede llevar a provocar la fusión del resto en la célula. Esto es consistente con las micrografías electrónicas de mastocitos desgranulados, que apoyan la idea de la exocitosis compuesta (Chandler, 1991; Lindau and Gomperts, 1991).

5.4. Activación y regulación de la secreción

La maquinaria básica para la fusión exocitótica de membranas que implica a las proteínas SNARE y a los reguladores de SNARE es indudablemente la misma en todos los tipos celulares secretores. En muchos de ellos la misma señal celular, un aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+}, es utilizado para activar la exocitosis. Cada tipo celular es sensible, sin embargo, a diferentes tipos de estímulos externos que generan la elevación de Ca^{2+} y también difieren en los mecanismos reguladores. Los estímulos externos que generan una activación de las proteínas de unión a GTP pueden tener muchos efectos diversos sobre la exocitosis en algunos tipos celulares. Adicionalmente, los agentes que elevan la concentración de AMP_C o activan a la PKC podrían tener efectos específicos del tipo celular regulando de una forma más fina la maquinaria exocítica a través de la fosforilación de componentes clave.

En condiciones fisológicas, la activación de los mastocitos está provocada por el entrecruzamiento de los receptores de alta afinidad de inmunoglobulina E (FcεRI). Este receptor una vez activado inicia una cascada de señalización que culmina en una respuesta que incluye la secreción de mediadores inflamatorios. En esta cascada intervienen las proteínas Lyn y Syk de la familias de las tirosina-quinasas (PTK) (Eiseman and Bolen, 1992). La activación de Syc lleva a por un lado a la activación de la fosfolipasa C (PKC) y por otro a las activación de las proteínas Sos y Vav pertenecientes a las familias Ras y Rac GTPasas respectivamente. La activación de estas dos vías de señalización provocan, a través de proteínas efectoras desconocidas, la

transcripción de genes de citoquinas y a la exocitosis de las vesículas secretoras (Nadler et al., 2000).

5.5. Matriz intravesicular

Un evento fundamental en la secreción regulada es el empaquetamiento de los productos de secreción y su condensación dentro de las vesículas secretoras. Existen muchos tipos celulares en los que se ha demostrado que el interior de las vesículas secretoras contiene una matriz cargada eléctricamente. En estos casos, las moléculas de secretagogo cargadas interaccionan con la red iónica que forma la matriz. Las moléculas a secretar son almacenadas en el interior vesícular de forma osmóticamente inerte produciendo la condensación de la matriz. La unión o separación de las moléculas de secretagogo de la matriz es un proceso de intercambio iónico (fig. I-7).

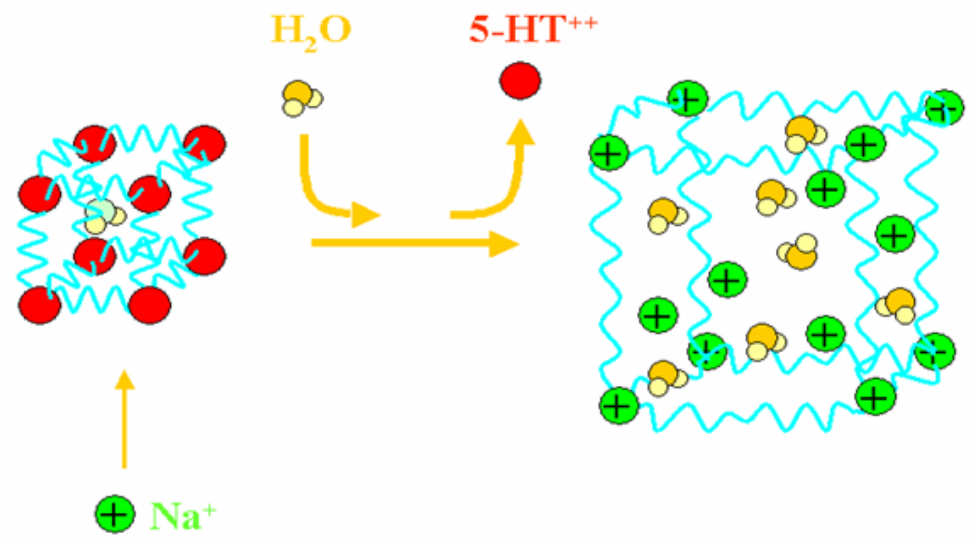

Figura I-7: Esquema del proceso de intercambio iónico entre la solución extracelular y la matriz de heparina (líneas curvas azules). La sustitución de los iones de Na^+ por las moléculas de serotonina provoca que esta pase a estar libre en disolución. Al mismo tiempo se produce el hinchamiento de la matriz.

En los mastocitos la matriz intravesicular está principalmente constituida por heparina, un polisacárido sulfatado (Tantravahi et al., 1986). La matriz intravesicular de heparina es sintetizada inicialmente como un proteoglicano no sulfatado con unas 10 o 15 cadenas de polisacárido unidas a un núcleo proteico, formando largas cadenas ramificadas con 100 a 200 unidades de disacáridos cada una. A continuación, los polímeros glucídicos son sulfatados heterogéneamente, originándose complejos patrones con una gran densidad de carga negativa, lo que caracteriza a los glicosaminoglicanos. El proteoglicano resultante está muy cargado y es altamente hidrofílico,

siendo capaz de atraer gran cantidad de moléculas de agua para formar un gel hidratado que posee un gran volumen respecto a su masa.

Existen evidencias que apuntan a que la liberación de aminas desde vesículas secretoras mediante exocitosis no obedecen a las leyes difusionales (Alvarez de Toledo et al., 1993; Wightman et al., 1995). Las medidas de la liberación de sustancias oxidables mediante amperometría en células cromafines y mastocitos sugieren que la tasa de liberación es demasiado lenta para ser explicada por difusión únicamente y parece que puede depender de la matriz intravesicular de las vesículas secretoras. Por ejemplo, en las vesículas cromafines la disociación de catecolaminas desde la matriz proteica parece que es uno de los factores reguladores de la tasa de liberación de catecolaminas (Schroeder et al., 1996). Existen también evidencias que apuntan a que, en mastocitos, la tasa de liberación de serotonina durante la exocitosis está limitada por el intercambio iónico entre la matriz y el medio extracelular (Marszalek et al., 1996). Otro papel que ha sido atribuido a la matriz es la de intervenir en la fase de expansión del poro de fusión aportando la energía necesaria para su total apertura e incorporación completa de la membrana vesicular en la membrana de la célula (Monck et al., 1991).

6. TÉCNICAS DE MONITORIZACIÓN DE LA EXOCITOSIS

Las técnicas que permiten medir la exocitosis, endocitosis y el reciclado de vesículas en tiempo real han permitido un aumento importante en la comprensión de estos procesos en neuronas y otros tipos celulares secretores. Varias aproximaciones experimentales desarrolladas durante los últimos 20 años han jugado un papel fundamental en el aumento de este conocimiento. Las tres principales técnicas que han permitido el avance son la monitorización de la capacidad eléctrica de la membrana, los métodos de detección electroquímica de los productos secretados y los métodos de microscopía óptica de imágenes de membranas teñidas con colorantes fluorescentes. Cada una de las técnicas contribuye con información única y complementaria sobre la exocitosis, la endocitosis, el reciclado de las vesículas y de la cinética de estos procesos. Obviamente cada una de ellas presenta unas limitaciones inherentes pero esto ha sido solventado mediante la combinación de técnicas de forma simultánea.

6.1. *Patch-clamp*

La técnica de "*patch-clamp"* (Hamill et al., 1981) es una potente herramienta para el estudio de la exocitosis (Neher and Marty, 1982) y de las propiedades del poro de fusión exocitótico (Almers and Neher, 1987; Zimmerberg et al., 1987; Alvarez de Toledo and Fernandez, 1988). Las medidas de la exocitosis y endocitosis mediante la técnica de "*patch-clamp"* se basan en el incremento de la superficie de membrana cuando una vesícula se fusiona con la membrana y en su decremento cuando la membrana es recuperada mediante endocitosis (fig. I-8). Los cambios en la superficie de la célula pueden ser monitorizados eléctricamente como cambios en la capacidad eléctrica de la membrana. Esta técnica ha sido ampliamente empleada en el estudio de la secreción en células aisladas como mastocitos (Fernandez et al., 1984), células neuroendocrinas (Neher and Marty, 1982), e incluso terminales nerviosos (Parsons et al., 1994).

Las medidas de capacidad pueden realizarse mediante la configuración de "*whole-cell*" o mediante parche perforado. La elección del método depende del diseño experimental. La diálisis que provoca la configuración de "*whole-cell"* permite el control directo de la composición iónica y de segundos mensajeros de la célula, así como la introducción de concentraciones conocidas de indicadores de Ca^{2+}, quelantes y compuestos secuestradores, péptidos, anticuerpos o proteínas purificadas para el estudio de los procesos moleculares implicados en la exocitosis y la endocitosis. Por otro lado, los registros mediante parche perforado puede ser una opción más recomendable para realizar un estudio en condiciones más próximas a las fisiológicas.

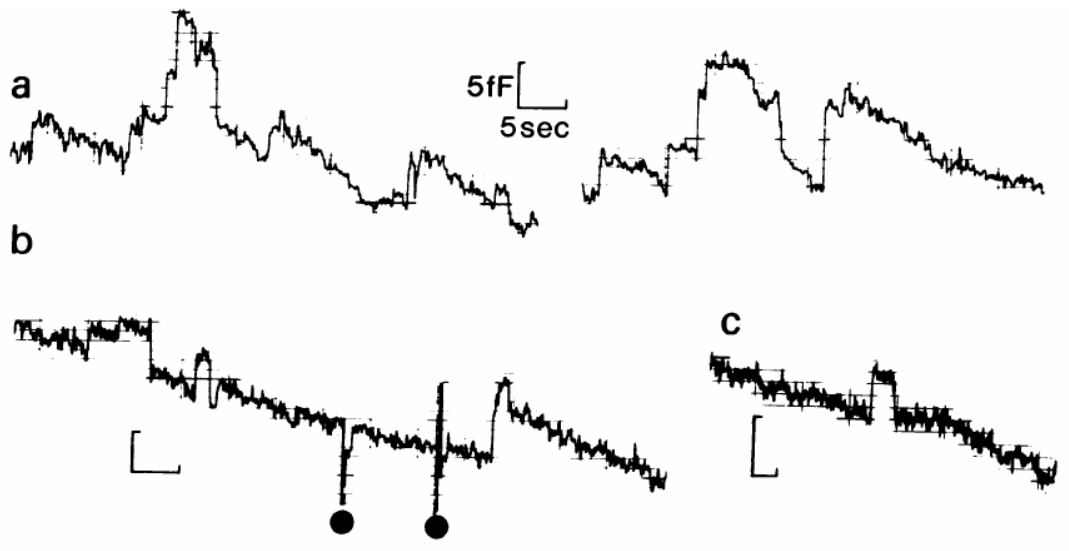

Figura I-8: Registros de la capacidad eléctrica de células cromafines realizado con la técnica de *patch-clamp* en configuración de célula completa y con fijación de voltaje. Los potenciales de membrana son -67, -60 y -69 mV en los paneles a, b y c respectivamente. En el panel b se realizan dos despolarizaciones (●) de -60 mV de 20 y 200 milisegundos de duración. En todos los registros se pueden apreciar saltos de capacidad reversibles. Modificado de (Neher and Marty, 1982).

Una de las características más ventajosas de las medidas de capacidad es la alta resolución temporal con la que la exocitosis y la endocitosis pueden ser monitorizadas. La sensibilidad de las medidas de capacidad permite la detección de eventos únicos exo-endocitóticos si las vesículas secretoras tienen un tamaño suficientemente grande, como los presentes en mastocitos y cromafines. Para tamaños menores se utiliza la configuración de "*cell-attached*", que permite detectar fusiones por debajo de 0.1 fF y que ha permitido detectar fusiones individuales en neutrófilos (Lollike et al., 1995) entre otros tipos celulares.

La principal limitación de la técnica son los requerimientos espaciales para el acceso de la pipeta y la geometría necesaria para la formación del sello. Esta limitación ha causado que sólo en algunos tipos de neuronas hayan podido ser registrada la capacidad eléctrica. Las células bipolares de la retina (von Gersdorff and Matthews, 1994) y los fotorreceptores (Rieke and Schwartz, 1994) son dos tipos neuronales que gracias al tamaño de sus terminales, ha sido posible registrar su capacidad eléctrica.

6.2 Amperometría

Las técnicas de amperometría y voltametría cíclica permiten la detección de los productos liberados por los gránulos secretores mediante detectores extracelulares. La optimización del

tamaño de los electrodos por los trabajos de Wightman y sus colaboradores (Wightman et al., 1991) ha permitido un intensivo uso de estas técnicas en células aisladas principalmente en mastocitos y células cromafines. La detección está basada en la corriente generada por la oxidación o reducción del producto secretado en la superficie del electrodo de fibra de carbón situado cercano a la célula. La técnica está limitada a las células que secretan sustancias detectables, tales como serotonina o catecolaminas. La amperometría ha sido utilizada también para la detección de catecolaminas liberadas de neuronas del ganglio cervical de la rata (Zhou et al., 1996) y de la serotonina liberada por neuronas de la sanguijuela (Bruns and Jahn, 1995). Los últimos trabajos basados en esta técnica están realizados en neuronas del mesencéfalo de rata, detectando la liberación de dopamina desde vesículas sinápticas (Staal et al., 2004).

La velocidad y sensibilidad con la que los eventos únicos exocitóticos son detectados mediante amperometría ha sido utilizada para caracterizar la relación espacial y temporal entre el flujo de Ca^{2+} dependiente de voltaje y los eventos exocitóticos generados en células cromafines. La combinación de esta técnica con la medida de la capacidad eléctrica permite la monitorización del mismo proceso mediante dos técnicas independientes, lo que aporta información que ninguna de las técnicas por separado facilita. Mediante esta combinación, el estudio de la secreción en mastocitos y células cromafines ha demostrado que los productos secretores pueden ser liberados durante eventos reversibles de fusión aislados o durante estados del proceso de fusión incompletos que preceden a fusiones completas. Esta aproximación experimental ha permitido el estudio de, por ejemplo, el papel de la matriz intravesicular en mastocitos.

Se ha comprobado en el trabajo presentado en esta tesis que la liberación de las moléculas de secretagogo desde la matriz intravesicular afecta a la cinética de liberación de serotonina en mastocitos. El hinchamiento de la matriz es producido por el intercambio de moléculas de serotonina y cationes monovalentes (Marszalek et al., 1995; Marszalek et al., 1997). Este intercambio produce una tasa de liberación de las moléculas que afecta a la forma de las espigas amperométricas. Una vez que las moléculas son liberadas de la matriz, han de pasar a través del poro de fusión. El tamaño del poro en sus estadíos iniciales genera una limitación estérica al paso de las moléculas, de forma que es un factor que también puede retrasar la liberación. Una vez que las moléculas son liberadas de la matriz y atraviesan el poro de fusión, el recorrido hasta el detector está determinado por la difusión. Las distintas fases por las que pasan las moléculas secretadas pueden ser estudiadas por métodos computacionales, como se detalla más adelante en este trabajo.

6.3. Análisis de imagen

Actualmente, para el estudio de la secreción, se utilizan dos técnicas que permiten monitorizar el reciclado de membranas en tiempo real.

Colorantes de membrana

El desarrollo de los colorantes fluorescentes del tipo FM ha permitido un notable avance en la comprensión de los fenómenos de reciclado de membranas en el ciclo de las vesículas secretoras. Los colorantes fluorescentes FM tiñen las vesículas secretoras, vesículas sinápticas y endosomas en una amplia variedad de tipos celulares de forma dependiente a la actividad secretora de la célula. La distinta cinética de unión a la membrana de los colorantes tipo FM es lo que distingue unos de otros, siendo el más utilizado el FM 1-43. Los colorantes tipo FM se insertan de forma reversible en la hemimembrana que está en contacto con la solución que contiene el colorante sin penetrar en la bicapa lipídica. Por lo tanto, el colorante puede ser internalizado por endocitosis y posteriormente liberado por sucesivas rondas de exocitosis. La propiedad más importante de los colorantes tipo FM es que la intensidad de la fluorescencia es 350 veces mayor cuando el colorante se encuentra unido a la membrana que cuando las moléculas se encuentran en disolución. Esto permite la tinción de las membranas mientras el colorante está presente en la solución externa y la eliminación del marcaje cuando se lava con solución externa sin colorante.

La mayor ventaja que posee el estudio de las imágenes de células teñidas con FM es que permite obtener información espacial del ciclo de las vesículas secretoras. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada para el estudio del trafico de vesículas sinápticas de la unión neuromuscular de la rana (Kraszewski et al., 1995; Ryan and Smith, 1995). Esta misma técnica ha sido utilizada para el estudio de la unión neuromuscular en *Drosophila* (Ramaswami et al., 1994), células cromafines (Smith and Betz, 1996) y células bipolares de la retina de la carpa (Lagnado et al., 1996).

A pesar de que las técnicas de imagen aportan información espacial muy valiosa respecto al tráfico y reciclado vesicular, presentan una resolución temporal muy inferior a la de las técnicas electrofisiológicas.

pHluorinas

Aunque los colorantes tipo FM han permitido un gran avance en lo que a nuestro conocimiento del ciclo de las vesículas secretoras se refiere, su uso tiene varios inconvenientes.

Dado que las medidas con FM constan de 2 fases, carga y descarga, separadas por un tiempo relativamente largo (minutos), no permiten el seguimiento continuo del proceso secretor. Además, los colorantes de membrana tiñen inespecíficamente la membrana, y no proporcionan información sobre el ciclo de proteínas específicas. Las pHluorinas son una aproximación novedosa que salva algunas de las limitaciones de los colorantes tipo FM. Las pHluorinas están basadas en la proteína fluorescente verde (GFP, "*green fluorescent protein"*), la cual se puede encontrar unida a la región luminal de alguna proteína asociada a la membrana de vesículas sinápticas (Miesenbock et al., 1998). Para el estudio del ciclo secretor, la GFP de la que derivan las pHluorinas es la variante eclíptica, que se encuentra protonada cuando el pH es inferior a 7.1, no emitiendo en estas condiciones fluorescencia. La acidificación de las vesículas sinápticas provoca que en su interior la GFP de la pHluorina esté protonada y no emita fluorescencia. Durante el proceso de fusión, el pH luminal vesicular pasa a ser superior a 7.1, y la pHluorina emite fluorescencia. De este modo se pueden monitorizar los eventos exocitóticos con la emisión de luz. Adicionalmente, la reacidificación que ocurre en el ciclo de las vesículas protona de nuevo la GFP y deja de emitir fluorescencia. La pHluorina más utilizada es la sinaptopHlurina. La sinaptopHluorina es una proteína de fusión de la GFP eclíptica y la proteína VAMP (*vesicle-associated membrane protein*). La sinaptopHluorina se ha empleado para el estudio de la endocitosis (Sankaranarayanan and Ryan, 2001), de la exocitosis (Schwarz, 2004) y del ciclo de las vesículas sinápticas (Li et al., 2005) en neuronas.

6.4. Métodos computacionales

Los métodos computacionales permiten el estudio de las diversas fases que componen el proceso exocítico. El principal método computacional clásicamente utilizado ha sido el método de Monte Carlo. El método de Monte Carlo está basado en la generación, mediante un ordenador, de trayectorias aleatorias de las moléculas de secretagogo. En este método diseñado por Neher y colaboradores (Haller et al., 1998) las trayectorias están compuestas por pasos discretos de una longitud fija y poseen un curso temporal calculado en función del coeficiente de difusión de la molécula objeto del estudio. La diversidad de las trayectorias se consigue mediante la aleatoriedad de la dirección en la que se produce el movimiento de la partícula, de forma que cada molécula emplea un tiempo distinto en llegar al detector. De este modo se consiguen simular tasas de liberación que generan espigas amperométricas que pueden compararse con las registradas e inferir las condiciones que la generaron. Adicionalmente, las simulaciones de Monte Carlo permiten establecer las diferentes condiciones geométricas del registro, pudiéndose variar diversos parámetros que afectan al proceso de liberación de los productos de secreción. Es por

ello que, mediante el uso de simulaciones, se pueden estudiar por separado las distintas fases del proceso y estudiar el modo en que afectan a la cinética de liberación.

7. POROS DE FUSIÓN Y EXOCITOSIS KISS-AND-RUN

El poro de fusión es una estructura molecular que conecta los lúmenes de dos compartimentos membranarios durante su fusión. A pesar de su vital importancia para el proceso de la exocitosis, se desconoce su naturaleza. Para su estudio se han utilizado diversas técnicas, aunque inicialmente su existencia se puso de manifiesto por técnicas de microscopía electrónica en mastocitos (Chandler and Heuser, 1980) y células cromafines (Schmidt et al., 1983) entre otros. Las micrografías obtenidas muestran poros de 20 a 100 nm de diámetro que proporcionan una vía acuosa entre el lumen de las vesículas secretoras y el medio extracelular (fig. I-9). Otra importante observación es la aparición en las micrografías de estructuras filamentosas situadas entre las vesículas secretoras y la membrana plasmática (Chandler and Heuser, 1980). Estos filamentos están compuestos de actina (Segawa and Yamashina, 1989). Las estructuras filamentosas se observan en regiones donde se localizan los eventos exocitóticos, por lo que es posible que componentes del citoesqueleto, a través de la interacción con otras proteínas, puedan estar implicados en las propiedades del poro de fusión. Esto podría ocurrir formando parte de una estructura macromolecular que puede dirigir y regular la formación y expansión del poro de fusión. Esta estructura puede ser considerada como un andamiaje que permite la aproximación de las dos membranas y genera las condiciones necesarias para la fusión de estas.

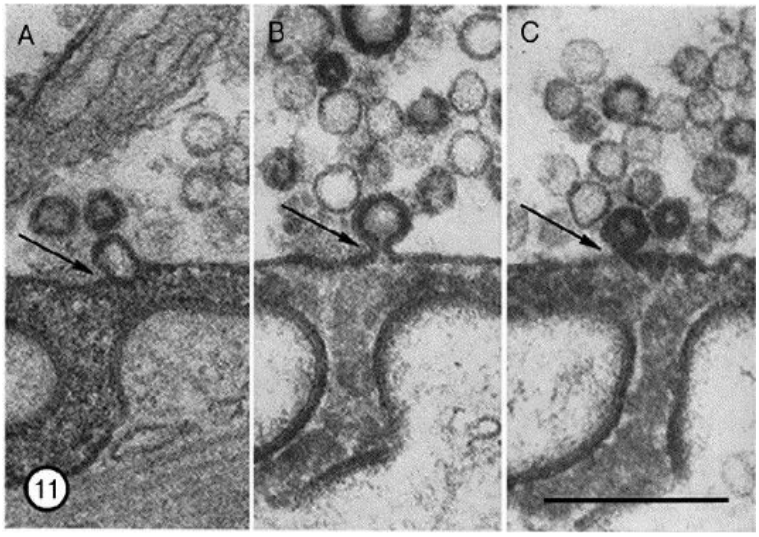

Figura I-9: Micrografías electrónicas de las zonas activas de 3 uniones neuromusculares teñidas con peroxidasa de rábano. Se pueden apreciar distintas fases en la fusión de vesículas con la membrana plasmática (flechas). Cal.: 0.25 μm. (Ceccarelli et al., 1973)

La observación de la estructura del poro de fusión mediante micrografías electrónicas no aporta información cinética del proceso de fusión. La técnica de "*patch-clamp*" permite obtener información cuantitativa del poro de fusión al medir directamente sus propiedades biofísicas (Breckenridge and Almers, 1987a). Los primeros experimentos mediante "*patch-clamp*" se realizaron en mastocitos procedentes de ratones mutantes *beige*, que se caracterizan por un

tamaño anormalmente grande de las vesículas (Chi and Lagunoff, 1975; Chi et al., 1978). Así se definieron tamaños de poro de fusión menores que los detectados mediante micrografía electrónica (Breckenridge and Almers, 1987a). Otra aportación muy importante al conocimiento del proceso exocitótico mediante la técnica de "*patch-clamp"* procede de los experimentos que demuestran que la conexión entre el medio extracelular y el interior de la vesícula secretora es anterior al hinchamiento de la matriz intravesicular (Zimmerberg et al., 1987). Este trabajo descartó la posibilidad de que el hinchamiento de la matriz fuese la responsable de la fusión de membranas en el proceso exocítico (fig. I-10). Posteriormente se postuló que el hinchamiento que sufre la matriz proporcionaba la fuerza motriz responsable de la expansión del poro de fusión una vez formado (Monck et al., 1991). Este planteamiento será tratado en el trabajo presentado en esta tesis doctoral. Todos estos datos han aportado importantes hallazgos acerca de la naturaleza y sobre los mecanismos que permiten la formación y desarrollo del poro de fusión.

Por otro lado, la técnica de la amperometría permite la monitorización mediante oxidación de los productos de secreción. Una fibra de carbono sometida a un potencial eléctrico adecuado es capaz de oxidar las moléculas de secretagogo de mastocitos (serotonina), células adrenales cromafines (adrenalina y noradrenalina) y algunos tipos de neuronas (Staal et al., 2004). Los electrones obtenidos generan una corriente que es registrada en forma de espigas amperométricas, ofreciendo información sobre la cantidad de moléculas liberadas en un único evento exocitótico e, indirectamente, permitiendo determinar las propiedades dinámicas del proceso de secreción. Como se explicará más adelante, la existencia del denominado pie amperométrico en los registros de amperometría es un método de estudio de las características de la fase de expansión del poro de fusión.

El proceso de exocitosis mediante "*kiss-and-run*" está basado en la reversibilidad de la fase de expansión del poro de fusión. Mediante este tipo de exocitosis es posible la liberación de secretagogo desde una vesícula sin la necesidad de la incorporación completa entre las membranas vesicular y plasmática. De esta forma, el proceso reversible permite la recaptación de la membrana de la vesícula para una posterior reutilización (Ceccarelli et al., 1973; Fesce et al., 1994).

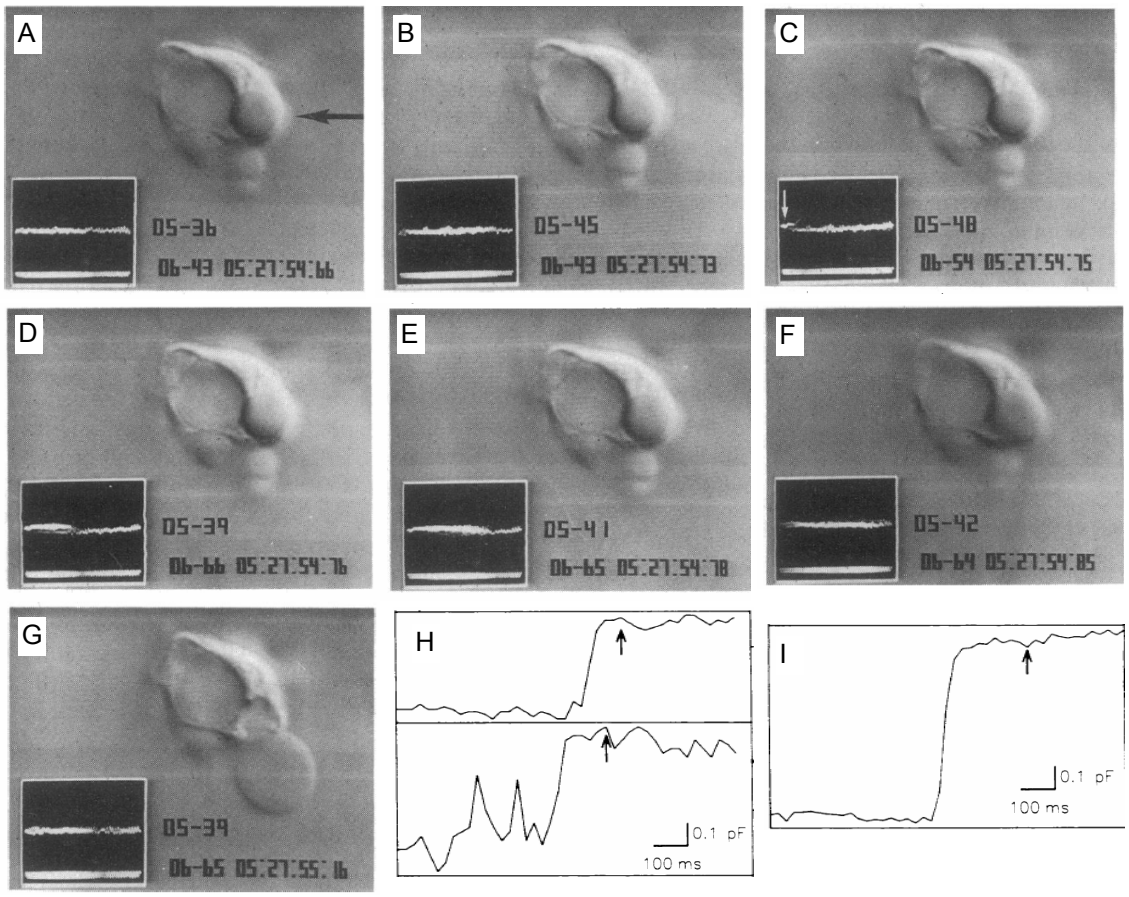

Figura I-10: Experimentos realizados en mastocitos de ratón *beige* de medida de la capacidad eléctrica y de microscopía óptica de forma sincronizada que demuestran que el hinchamiento de la matriz es posterior a la fusión de la vesícula secretora. (A-G) Fotografías realizadas durante la degranulación mostrando la capacidad y la conductancia del registro en la configuración de célula completa. En el panel C se señala con una flecha el momento en el que se produce la fusión de la vesícula señalada en A con la flecha. (H,I) Paneles con 3 ejemplos de registro de capacidad eléctrica en la que se aprecia el salto de capacidad correspondiente a una fusión de una vesícula secretora individual y se señala con una flecha el momento en el que se produce el hinchamiento de la matriz intragranular obtenido de las imágenes de microscopía. Modificado de (Zimmerberg et al., 1987).

El uso de técnicas que miden directamente las propiedades biofísicas de la membrana han permitido el estudio de las propiedades dinámicas del poro de fusión. La técnica de la medida de la capacidad eléctrica de la membrana mediante "*patch-clamp"* permite un análisis cuantitativo del poro de fusión (Neher and Marty, 1982) al obtenerse los valores de conductancia eléctrica del poro de fusión en sus estadíos iniciales. Este abordaje permite estudiar la función de proteínas implicadas en la exocitosis en el poro de fusión mediante ratones nulos ("*knock-out*") para estas proteínas.

El tiempo empleado en la liberación del contenido de una vesícula está por debajo del segundo a través de poros de fusión detectados en mastocitos (Breckenridge and Almers, 1987a), células cromafines (Albillos et al., 1997), eosinófilos (Scepek et al., 1998) y neutrófilos (Lollike et

al., 1995). En el caso de la vesícula sináptica, la medición biofísica del *"kiss-and-run"* posee dificultades técnicas, pero se han obtenido datos que demuestran su existencia mediante la pérdida de colorantes lipofílicos fluorescentes desde la membrana plasmática. Existen trabajos que han resuelto de forma individual los eventos de fusión procedentes de la exocitosis de vesículas sinápticas promediando varios miles de eventos individuales de fusión (Sun et al., 2002). La funcionalidad del "*kiss-and-run*" en la regulación de la liberación de neurotransmisor permanece en controversia. La liberación de catecolaminas mediante "*kiss-and-run"* ha sido demostrada directamente usando de forma combinada la capacidad eléctrica de la membrana y la amperometría bajo concentraciones altas de Ca^{2+} (Albillos et al., 1997; Ales et al., 1999). También, la fusión mediante "*kiss-and-run"* ha sido demostrada basándose en la captura de marcadores extracelulares tras la exocitosis en vesículas intracelulares que aun retienen las características de los gránulos cromafines, incluyendo la presencia del *dense core* (núcleo denso) (Henkel et al., 2001). Estos datos independientes son consistentes con la liberación parcial de los productos de secreción desde las vesículas secretoras cromafines.

Existen pruebas que sugieren que el *"kiss-and-run"* puede ser un proceso regulado, permitiendo que la exocitosis ocurra predominantemente mediante fusión completa o mediante kiss-and-run bajo ciertas condiciones (Burgoyne et al., 2001a; Burgoyne et al., 2001b). Aunque probablemente el *"kiss-and-run"* permite la liberación de todo el contenido de las vesículas sinápticas, en el caso de las vesículas secretoras de núcleo denso es posible que liberen parcialmente su contenido a través del poro de fusión, permitiendo la regulación de la cantidad de producto exocitado por evento de fusión (Elhamdani et al., 2001; Burgoyne and Barclay, 2002). La regulación de la cantidad de contenido liberado mediante *"kiss-and-run"* se ha demostrado en células cromafines (Graham and Burgoyne, 2000; Graham et al., 2000) y en células β pancreáticas (Smith et al., 1995). También se ha comprobado que una gran variedad de condiciones puede modificar la cantidad liberada por vesícula (*quantal size*) en células cromafines, que concuerdan con cambios en la cinética de los eventos únicos secretores consistentes con alteraciones en la dinámica del poro de fusión. Estos efectos se han visto tras el tratamiento con ésteres de forbol (Graham et al., 2000), modificación de Ca^{2+} intracelular (Elhamdani et al., 2001), en células con sobreexpresión de proteínas CSP (Graham and Burgoyne, 2000) o expresando mutantes de Munc18 (R39C) (Fisher et al., 2001) entre otros.

Una cuestión importante sobre la reversibilidad del poro y, por lo tanto del *"kiss-and-run"*, es como ocurre el cierre del poro de fusión. Existen dos posibilidades extremas. En la primera de ellas es necesario asumir que la maquinaria exocítica que permite la fusión puede actuar de

forma reversible. Esta idea no concuerda bien con el hecho de una fusión conducida por la formación de los muy estables complejos SNARE (Hanson et al., 1997a; Sutton et al., 1998) los cuales sólo pueden ser desensamblados tras la fusión por la lenta acción de α-SNAP y NSF (Sollner et al., 1993a). Esta hipótesis no puede ser descartada, pero los datos experimentales se muestran contrarios a la necesidad del mantenimiento de un complejo SNARE estable durante un proceso de fusión (Graham et al., 2001). Un argumento a favor de este primer modelo que implica la reversibilidad de la maquinaria de fusión es la presencia de oscilaciones (*flickering*) del poro de fusión cuando es detectado mediante técnicas biofísicas (Fernandez et al., 1984). En el segundo modelo, la maquinaria de fisión responsable de la formación de las vesículas endocíticas envueltas por clatrina (acción basada en la actividad de la dinamina (Fernandez et al., 1984)) sería capaz de realizar su función de estrangulamiento en milisegundos sobre las vesículas en el proceso de fusión. La segunda explicación está apoyada por los estudios realizados en un mutante de *Drosophila* con un defecto sensible a temperatura en la dinamina (*Shibire*). Este mutante muestra una neurotransmisión en la que la recaptación de vesículas está disminuida en la escala temporal de milisegundos (Ohara-Imaizumi et al., 1997). Es difícil asumir que hay tiempo suficiente para el ensamblaje de las proteínas de la envuelta de clatrina (Cremona and De Camilli, 1997; Wigge and McMahon, 1998; Marsh and McMahon, 1999) y de la maquinaria de la endocitosis en el sitio de la fusión. Otra posibilidad es que la escisión esté llevada a cabo por la dinamina pero de forma independiente a la clatrina (Artalejo et al., 1995). Además de un mecanismo rápido para la recaptación de la membrana vesicular, existen pruebas de la existencia de múltiples vías endocíticas en las células secretoras (Schmidt et al., 1983; Smith and Neher, 1997). Existe la posibilidad de que la vía dependiente de clatrina es únicamente utilizada para el reciclaje de membrana más lento tras una fusión completa o tras un largo periodo de exocitosis (Palfrey and Artalejo, 1998).

II. OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Se ha avanzado mucho en el conocimiento de la biofísica y en la relación estructura-función de proteínas que participan en la exocitosis. Sin embargo, debido a la complejidad molecular y la vida extremadamente corta del poro de fusión, aún se desconoce la estructura molecular del mismo y si éste está sujeto o no a regulación celular. En el presente trabajo nos hemos marcado como objetivo general estudiar las últimas etapas del proceso secretor utilizando modelos animales en los que se eliminan proteínas que pueden contribuir a etapas concretas del proceso.

Nos hemos centrado en dos aspectos fundamentales:

1) Estudiar el papel de la matriz intravesicular de heparina en el proceso secretor en mastocitos del peritoneo. Para ello hemos utilizado animales carentes de heparina (ratones carentes del enzima responsable de la síntesis de heparina) y comparar la cinética de la exocitosis con animales controles.
2) Estudiar la cinética de la exocitosis en animales carentes de proteínas de las vesículas de secreción que podrían estar implicadas en el proceso de fusión y expansión del poro de fusión. Para ello hemos utilizado ratones nulos de la proteína SCAMP1.

Este doble abordaje nos permitirá disecar la cinética de la exocitosis de una forma novedosa en el laboratorio, ya que no existen precedentes en la literatura de haber estudiado el fenómeno secretor con técnicas resolutivas, como lo son la medida de la capacidad eléctrica de la membrana y el registro simultáneo mediante amperometría en vesículas únicas de mastocitos peritoneales.

Los objetivos concretos del presente trabajo son:

1) Desarrollo de un sistema optimizado de análisis de registros simultáneos de capacidad eléctrica de la membrana y amperometría basado en el programa Igor Pro.
2) Obtención de registros de vesículas secretoras únicas en mastocitos peritoneales de ratones mutantes carentes de heparina y comparar los resultados con los animales controles.

3) Estudiar las últimas etapas del proceso secretor en animales carentes de heparina y estudiar el comportamiento del poro de fusión en ausencia de matriz vesicular.
4) Asignar un papel a la matriz vesicular en el modelo de expansión del poro de fusión.
5) Estudiar la cinética de la exocitosis en animales carentes de la proteína vesicular SCAMP1.
6) Plantear un modelo de regulación de la expansión del poro de fusión por proteínas vesiculares.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES

Los animales utilizados para la realización de esta tesis han sido ratones (*Mus musculus*). Todos los ratones han sido mantenidos en el estabulario de la Facultad de Medicina en Sevilla (centro autorizado para estos fines por la autoridad competente, número de registro SE-1).

Las condiciones en las que han sido mantenidos los animales se ajustan a lo establecido en el articulo 4 del capitulo II sobre condiciones de alojamiento y manejo de animales (Real decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos). Las condiciones ambientales fueron las siguientes: temperatura de 20 a 22ºC, humedad relativa entre el 40 y 60 %, ciclos de luz-oscuridad de 12 h y sistema de ventilación que permite de 10 a 15 renovaciones de aire por hora. Las necesidades nutricionales de dichos animales son cubiertas por una dieta comercial de fórmula cerrada en forma de pellets (A04 y A03, en función de la edad de los animales) administrada *ad-libitum*. Tanto la salud como el bienestar animal fue supervisado de forma diaria por personal competente.

En cuanto al sacrificio de los animales, el método de eutanasia elegido ha sido la decapitación que implica la separación del cuello del animal muy cerca de la cabeza usando un instrumento afilado y diseñado para este fin, asegurando una separación rápida en posición correcta. Para la elección de dicho método, nos hemos basado en "Recomendaciones para la eutanasia de los Animales de Experimentación" (FELASA). Este documento fue elaborado para la DGXI de la Comisión Europea, para ser utilizado con la Directiva 86/609/EEC del 24 de Noviembre de 1986, *relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados miembros respecto a la protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos* (Nº L358, ISSN 0378-6978).

Las ratones que se han empleado para este trabajo pertenecen a líneas de ratones modificadas genéticamente, concretamente "*knock-out*" de dos proteínas diferentes:

- Línea de ratones mutantes en el gen del enzima N-deacetil/N-sulfotransferasa 2 (NDST-2)(Forsberg et al., 1999). Esta línea de ratones fue generósamente cedida por Sabine Hilfiker (Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC). El genotipado de los ratones de la línea NDST-2 fue realizado por cortesía de Rocío Ruiz, perteneciente al grupo de investigación de la Dra. Tabares (Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla).

- Línea de ratones mutantes en el gen que codifica para la proteína SCAMP1 en ratones *beige* (SCAMP1-Bg). La línea de ratones SCAMP1 fue generada (Fernandez-Chacon et al., 1999) y cedida por el Dr. Fernández-Chacón (Departamento de Fisiología Médica y Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Sevilla). La línea se generó por cruces entre la línea SCAMP1 y la línea *beige* en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla realizados por Manuel Castellano, perteneciente al grupo del Dr. Fernández-Chacón. El genotipado de los ratones resultantes de esta línea también fue realizado por Manuel Castellano.

Los animales elegidos para los experimentos eran adultos de sexo masculino con las siguientes características:

- Línea NDST-2: peso de 36 a 46 gramos y edad de 14 a 18 semanas.
- Línea SCAMP1-beige: peso de 40 a 50 gramos y edad de 50 a 60 semanas.

El número de animales utilizados fue de 3 ratones NDST-2 y 2 ratones control procedentes de dos camadas de los mismos progenitores para los experimentos de la implicación de la matriz intravesicular en la cinética de la secreción.

Para el estudio del papel de la proteína SCAMP1 en la cinética de la secreción, se utilizaron 4 ratones SCAMP1-beige y 3 ratones *beige*, procedentes de 2 camadas distintas de 2 parejas de progenitores.

2. CULTIVO DE MASTOCITOS

El tipo celular utilizado para la realización de este estudio han sido mastocitos peritoneales. Para el cultivo agudo de los mastocitos se realizaron lavados peritoneales tras el sacrificio y desangrado de los ratones. El lavado peritoneal consiste en la inyección intraperitoneal de 5 ml. de solución de extracción (Tabla III-1). Tras un suave masaje en la zona abdominal, se realiza una incisión en la piel y en el peritoneo para la absorción de la solución de extracción con una pipeta *pasteur* de plástico. La solución extraída es centrifugada a 800 r.p.m. durante 5 minutos a 4ºC y el pellet es resuspendido en 2 ml. de solución externa de extracción (Tabla III-1). Tras resuspender el pellet se añaden 0.5 mg. de serotonina y se siembran las células. Una vez sembradas se incuban a 37ºC y 5% de CO_2 y 95% de aire en un incubador Thermo-Forma Mod. 371 (Thermo Electron Corporation). Todos los registros se realizaron tras una hora de incubación para que las células se adhieran a la camarita de registro y antes de las 8 horas de cultivo. El pH de todas las soluciones ha sido medido en un pHmetro MicropH 2002 (Crison). Para la medida de la osmolaridad se ha utilizado un osmómetro de presión de vapor (Wescor 5500, Utah, EE.UU.). Todas las soluciones empleadas para la realización del estudio fueron realizadas con agua tratada mediante ósmosis inversa (Milli-Ro 6 Plus, Millipore) y posteriormente desionizada mediante resina de intercambio iónico (Milli-Q Plus, Millipore) presentando una resistividad de 18.2 $M\Omega \cdot cm^{-1}$.

Tabla III-1: Composición de la solución externa de extracción y cultivo. pH 7.22. Osm: 305 mmol/Kg

Compuesto	NaCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	KOH	HEPES	glucosa	$NaHCO_3$
Concentración (mM)	150	1	2	2	10	5.6	4.5
Marca / código	Sigma S7653	Sigma C3881	Sigma M8266	Panreac 141515.1211	Sigma H3375	Sigma G7528	Sigma S8875

Para la preparación de esta solución se pesan NaCl y HEPES (ácido 4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico) sólidos y se añaden a agua desionizada. A continuación se utilizaron disoluciones 1 M de $CaCl_2$, $MgCl_2$ y KOH preparadas con anterioridad para completar la solución. Se preparan 2 litros de solución externa *stock* que son conservados a 4ºC y utilizados durante 2 semanas aproximadamente. Inmediatamente antes de la realización del cultivo, a la solución stock se añade glucosa (5.6 mM, Sigma G7528), $NaHCO_3$ (4.5 mM, Sigma S8875) y serotonina (0.5 mM, Sigma H9523) pesando la cantidad necesaria y añadiéndola a 50 ml de solución externa stock. Esta solución se introduce 30 minutos en el incubador de CO_2 antes de ser inyectado en el animal.

3. REGISTROS

3.1. Solución externa de registro

Esta solución baña a las células durante el registro. La composición se detalla en la Tabla III-2. Esta solución se prepara a partir del stock de solución externa (Tabla III-1) a la que se añade glucosa y se introduce en el incubador durante 1 hora antes de ser utilizada. Esta solución sustituye a la solución externa de extracción para la realización del registro.

Tabla III-2: Composición de la solución externa de registro. pH 7.22. osmolaridad: 310 mmol/Kg

Compuesto	**NaCl**	**$CaCl_2$**	**$MgCl_2$**	**KOH**	**HEPES**	**glucosa**
Concentración (mM)	150	1	2	2	10	5.6
Marca / código	Sigma S7653	Sigma C3881	Sigma M8266	Panreac 141515.1211	Sigma H3375	Sigma G7528

3.2. Solución interna de registro

Esta solución sustituye al citoplasma al ser dializado en la configuración de "*whole-cell*". Se introduce en la pipeta de *"patch"* antes de realizar el registro. La composición se detalla en la Tabla III-3.

Tabla III-3: Composición de la solución interna de registro. pH 7.22. osmolaridad: 300 mmol/Kg

Compuesto	**L-glutamato-K**	**$MgCl_2$**	**HEPES**	**K_2-EGTA**	**Ca-EGTA**	**Mg-ATP**	**GTP-γS**
Concentración (mM)	125	7	10	2.5	7.5	0.2	0.001
Marca / código	Fluka 49601	Panreac 141515.1211	Sigma H3375	Sigma E0396	Sigma E0396	Sigma A9187	Sigma G8634

En la solución interna de registro la concentración de calcio libre se determina mediante las concentraciones relativas de K_2-EGTA y Ca-EGTA. El EGTA (N,N,N',N',áctido tetraacético etilen-glicol bis (β-aminoetil éter)) es un tampón de Ca^{2+} cuyas sales de K y Ca^{2+} fueron introducidas en la proporción adecuada (1:3) para obtener una concentración final de Ca^{2+} libre de 0.44 μM (Neher, 1988).

Ambos tampones de Ca^{2+} se preparan a partir de una solución 200 mM de EGTA titulada con KOH hasta un pH de 6,5. La mitad de esta solución se diluyó hasta 100 mM y se llevó hasta

un pH de 7.2 y almacenada a -20ºC como la sal de potasio (K_2-EGTA). La otra mitad de la solución sirvió para la elaboración de la sal de calcio (Ca-EGTA). Para su preparación, se añaden volúmenes pequeños de $CaCl_2$ y para cada adición se tituló el pH hasta pH 6,5. Cuando el EGTA está cercano a la saturación, la solución se diluyó hasta 100 mM, se ajustó el pH con KOH y se almacenó a -20ºC. Con este tampón, un mol de KOH neutraliza la modificación de pH producida por un mol de $CaCl_2$.

3.3. Modelo eléctrico de membrana

Según el modelo eléctrico de la membrana, los canales iónicos inmersos en la bicapa lipídica se comportan como una resistencia eléctrica y la bicapa lipídica como un dieléctrico impermeable al paso de iones (fig. III-1). El condensador está formado por lo tanto con los medios extracelulares, eléctricamente conductores, y la bicapa lipídica como dieléctrico. La membrana de las vesículas secretoras poseen las mismas propiedades eléctricas. La capacidad eléctrica de la vesícula secretora se suma a la que posee la membrana plasmática al fusionarse con esta, de forma que la capacidad total aumenta.

La capacidad eléctrica de un condensador plano está determinada por la fórmula

$$C = \varepsilon\varepsilon_0 \frac{A}{d} \qquad [1]$$

donde ε es la constante dieléctrica relativa del material aislante que separa dos placas conductoras de superficie *A* y *d* es la distancia que las separa. La constante dieléctrica relativa a la del vacío de la bicapa lipídica (ε) es de 18.6 x 10^{-12} $CV^{-1}m^{-1}$ siendo la del vacío (ε_0) de 8.85 x 10^{-12} $CV^{-1}m^{-1}$. Modelando la membrana plasmática como un condensador, y teniendo en cuenta que el espesor de la bicapa lipídica es constante e igual a 15 nm, la capacidad eléctrica depende únicamente de la superficie de la célula. La sustitución de los valores de ε,ε_0 y *d* permite el cálculo de la capacidad específica de la membrana que es de 1 $\mu F/cm^2$.

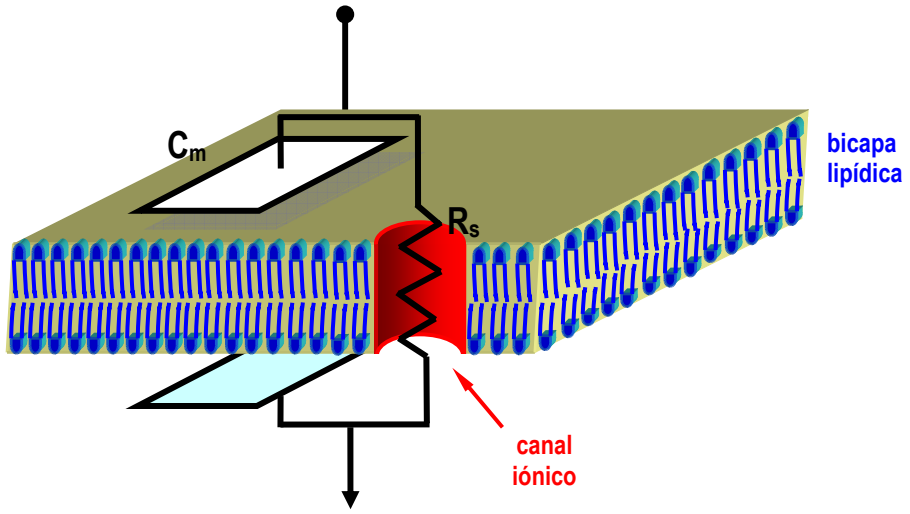

Figura III-1 : Modelo eléctrico de membrana, mostrando el circuito equivalente formado por la capacidad eléctrica de la membrana (C_m) y la resistencia de los canales iónicos (R_m).

3.4. La técnica de "*patch-clamp*"

La técnica del *"patch-clamp"* consiste en la formación de un sello entre la punta de una micropipeta de cristal y la membrana celular. Este sello, denominado "giga-sello" por tener una resistencia eléctrica del orden de gigaohmios, permite conseguir el aislamiento químico y eléctrico entre el interior de la micropipeta y el medio extracelular. Una vez que la membrana y la micropipeta entran en contacto, la aplicación de presión negativa al interior de la pipeta provoca la invaginación de parte de la membrana celular en el interior de la punta de la pipeta, produciéndose la formación del gigasello.

Existen distintas configuraciones de la técnica de "*patch-clamp"*. La anteriormente descrita es denominada "*cell-attached*", a partir de la cual se originan el resto de configuraciones de la técnica.

En la configuración del célula completa ("*whole-cell"*), tras la formación del sello, el parche de membrana que se encuentra debajo de la punta de la micropipeta es escindido mediante la aplicación de presión negativa (fig. III-2). Se consigue de esta forma la continuidad eléctrica y química entre el interior de la pipeta y el citosol, siendo este último sustituido por la solución del interior de la pipeta, lo que permite el control de su contenido. Un amplificador de "*patch-clamp"* es conectado entre el electrodo situado en el interior de la pipeta de "*patch*" y otro de referencia situado en el medio extracelular. Mediante esta configuración se puede establecer el potencial de

membrana (“*voltage-clamp*”) y medir la corriente que atraviesa la membrana, pudiendo distinguir entre dos tipos de corrientes iónicas: resistivas y capacitativas. Las corrientes resistivas son debidas a la permeabilización de iones a través de los canales iónicos. Las corrientes capacitativas se corresponden con el flujo de iones requeridos para cargar el condensador que forma la membrana celular y alcanzar un determinado potencial. La carga total necesaria depende linealmente del área celular dado que las membranas biológicas poseen una constante específica de capacidad. Por lo tanto, la capacidad eléctrica de la membrana puede ser utilizada para medir el incremento de la superficie celular cuando las vesículas secretoras se funden con la membrana celular durante la exocitosis. Esta técnica se emplea para detectar la actividad exocitótica y endocitótica de células secretoras (Neher and Marty, 1982; Lindau and Neher, 1988).

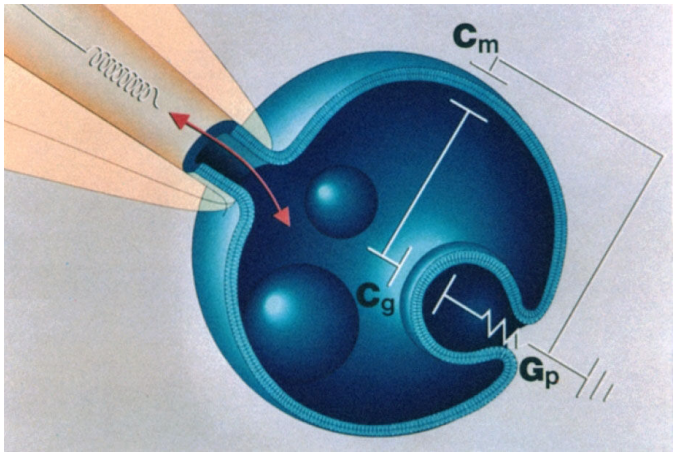

Figura III-2 : Esquema de la configuración de “whole-cell” de la técnica de patch-clamp. Se muestran los parámetros eléctricos del circuito equivalente. C_m, capacidad eléctrica de la célula. C_g, capacidad de la vesícula. G_p, conductancia del poro. Modificado de (Monck and Fernandez, 1992).

3.5. Medida de la capacidad eléctrica de membrana

En la configuración de "*whole-cell*" el circuito eléctrico formado es el representado en la figura III-3 .

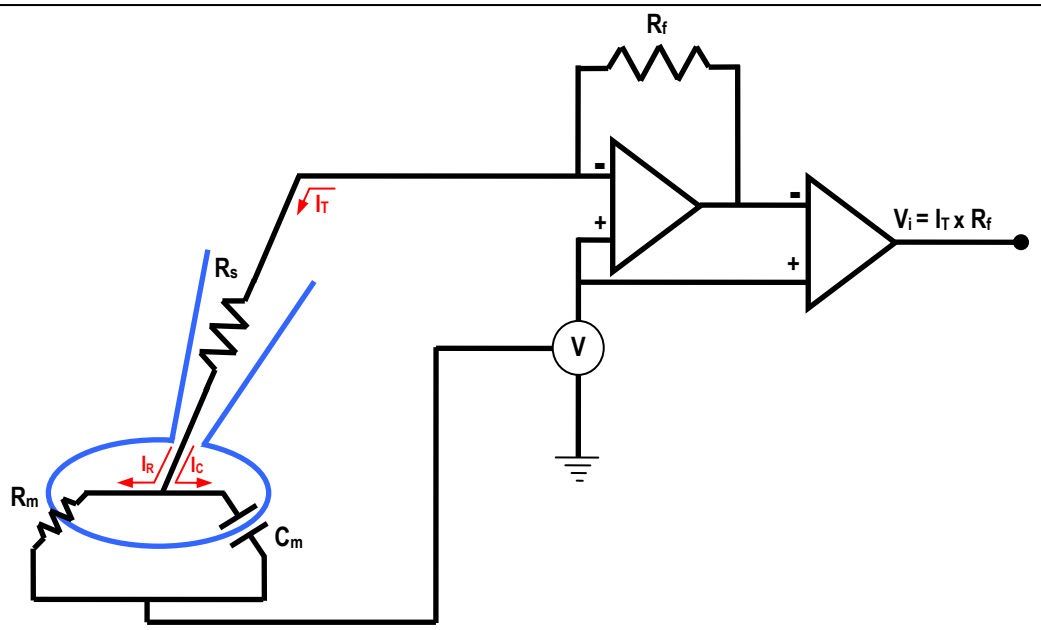

Figura III-3 : Técnica de "*patch-clamp*" en configuración de célula completa. La pipeta está en continuidad eléctrica con el interior celular a través de la resistencia de acceso (R_S). Al aplicar un voltaje V a la entrada no inversora del amplificador operacional, la corriente generada (I_T) presenta dos componentes, el componente resistivo (I_R) y el capacitativo (I_C). Existe otro componente en el circuito no representado en la figura que es un condensadordebido, entre otros, a la pipeta (C_P).

La capacidad debida a la pipeta (C_p) es del orden de picofaradios (pF) y puede ser cancelada usando el circuito de compensación del amplificador. R_s es la resistencia de acceso o resistencia en serie, que se debe a la geometría de la pipeta y a cualquier obstrucción existente de la pipeta a causa del contenido celular. El valor de R_s es del orden de 10 MΩ. Su recíproco en términos de conductancia se denota como G_s. C_m es la capacidad de la membrana y R_m es su resistencia. Esta última viene determinada por las propiedades de los canales iónicos de la membrana. R_m no es lineal a potenciales que activen los canales dependientes de voltaje en células excitables y, en nuestro caso, del orden de 1 GΩ.

Como se ha explicado anteriormente, la aplicación de un voltaje a la célula en configuración de *whole-cell* genera una corriente eléctrica. Esta corriente es suma de los componentes resistivo (I_R) y capacitativo (I_C),

$$I = I_R + I_C \qquad [2]$$

En términos de voltaje, considerando que la corriente en la rama del condensador es proporcional a la derivada del cambio de potencial a través del condensador, puede escribirse lo siguiente:

$$I = C_m \frac{dV}{dt} + \frac{V}{R_m} \qquad [3]$$

La técnica de "*patch-clamp*" permite registrar tanto la corriente iónica resultado de un incremento en la conductancia de la membrana celular como la corriente capacitativa resultado de un incremento de la superficie de la membrana plasmática.

Existen distintos métodos para detectar y cuantificar cambios en la corriente total de la célula que son debidos única y exclusivamente a incrementos de la capacidad eléctrica. Los más utilizados son las técnicas de dominio de frecuencia por su alta resolución temporal. Estas técnicas están basadas en la asunción de que a una determinada frecuencia pequeños cambios en la conductancia de la membrana (G_m) y en la resistencia en serie (R_s) tienen poco efecto en la determinación de los cambios de la capacidad eléctrica de la célula (C_m). De entre este tipo de técnicas, la utilizada para los experimentos descritos en este trabajo es la técnica de Neher y Marty (Neher and Marty, 1982) por su alta resolución en la medida de la capacidad.

La técnica consiste en realizar una fijación de voltaje en la configuración de célula completa de "*patch-clamp*". En estas condiciones, la corriente (I) debida a un estímulo de voltaje variable sinusoidal viene determinada por:

$$I = V \cdot Y = V \cdot \frac{G_m + j\omega C_m}{G_m / G_s + j\omega C_m / G_s + 1} \qquad [4]$$

donde V es el voltaje aplicado ($V = V_{com}(\omega t)$) e Y es la admitancia (inversa de la impedancia) total de la célula, suma de la admitancia resistiva y la capacitativa. El cálculo de la impedancia del circuito equivalente de una célula en la configuración de célula entera o *whole-cell* se explica a continuación. Primero se calcula la impedancia del circuito en paralelo de C_m y R_m (fig. III-3). El inverso de la impedancia de membrana (Z_m) es la suma de las inversas de la resistencia de la membrana e impedancia capacitativa ($1/ j\omega C_m$)

$$\frac{1}{Z_m} = \frac{1}{R_m} + j\omega C_m = G_m + j\omega C_m \qquad [5]$$

siendo $\omega=2\bullet\pi\bullet f$ y f la frecuencia del voltaje sinusoidal.

Al añadir la resistencia en serie (R_s) al circuito, la impedancia total (Z_t) es la suma de la impedancia de la membrana y la resistencia en serie (R_s):

$$Z_t = Z_m + R_s = \frac{1}{G_m + j\omega C_m} + \frac{1}{G_s} = \frac{1 + \frac{G_m}{G_s} + \frac{j\omega C_m}{G_s}}{G_m + j\omega C_m} \qquad [6]$$

dado que $Y = \frac{1}{Z_t}$

$$Y = \frac{1}{Z_t} = \frac{G_m + j\omega C_m}{1 + \frac{G_m}{G_s} + \frac{j\omega C_m}{G_s}} \qquad [7]$$

En nuestro caso, interesa aislar el componente de la corriente total que sea proporcional sólo a cambios de capacidad. Sin embargo, cambios en cualquiera de los parámetros C_m, G_m o G_s producirán cambios en la corriente a través de la membrana celular. Para conseguir la separación de las corrientes que atraviesan cada uno de los circuitos se utiliza la siguiente aproximación:

El cambio total de corriente ΔI puede ser separado en los siguientes componentes:

$$\Delta I = \Delta I_{C_m} + \Delta I_{G_s} + \Delta I_{G_m} \qquad [8]$$

donde ΔI_{Cm}, ΔI_{Gs}, ΔI_{Gm} son los cambios que ocurren debido a pequeños cambios en C_m, G_s y G_m respectivamente. Los componentes relevantes de la corriente de ΔI vienen dados por sus derivadas parciales:

$$\Delta I_{G_m} = \frac{\partial I}{\partial G_m} \cdot \Delta G_m = V \cdot B^2(\omega) \cdot \Delta G_m \qquad [9]$$

$$\Delta I_{C_m} = \frac{\partial I}{\partial C_m} \cdot \Delta C_m = V \cdot j \cdot \omega \cdot B^2(\omega) \cdot \Delta C_m \qquad [10]$$

$$\Delta I_{G_s} = \frac{\partial I}{\partial G_s} \cdot \Delta G_s = V \cdot \frac{(G_m + j \cdot \omega \cdot C_m)^2}{G_s^{\,2}} \cdot B^2(\omega) \cdot \Delta G_s \qquad [11]$$

siendo,

$$B^2(\omega) = \frac{1}{(1 + \frac{G_m}{G_s} + j \cdot \omega \cdot \frac{C_m}{G_s})^2} \qquad [12]$$

La aproximación lineal establece que pequeños cambios en cada uno de los tres parámetros inducen cambios en la corriente sinusoidal dada por:

$$\Delta I \approx \frac{\partial I}{\partial G_s} \Delta G_s + \frac{\partial I}{\partial G_m} \Delta G_m + \frac{\partial I}{\partial C_m} \Delta C_m \qquad [13]$$

La ecuación [13] es válida cuando los cambios en los parámetros son pequeños. En caso de que los cambios sean acumulativos, las derivadas parciales has de ser recalculadas. Por ello, un cambio grande en cualquiera de los parámetros, cambia los valores de las derivadas parciales. En la práctica, es necesario que un cambio en la corriente sinusoidal pueda relacionarse con un cambio en la capacidad y distinguir cambios de C_m de los que se originan por desviaciones en G_m y G_s. Para ello, se usa un detector de fase.

Detección de fase

El detector de fase separa el componente capacitativo del resistivo de la corriente y determina los valores de G_m, G_s y C_m. A nivel experimental esto se realiza mediante un amplificador *lock-in*. El detector suministra una onda sinusoidal (señal de referencia) que es la señal de comando (V_{com}) que se aplica a la célula. Tras atravesar el circuito que forma la célula, el amplificador recibe una corriente sinusoidal que está desfasada respecto a V_{com} (fig. III-4).

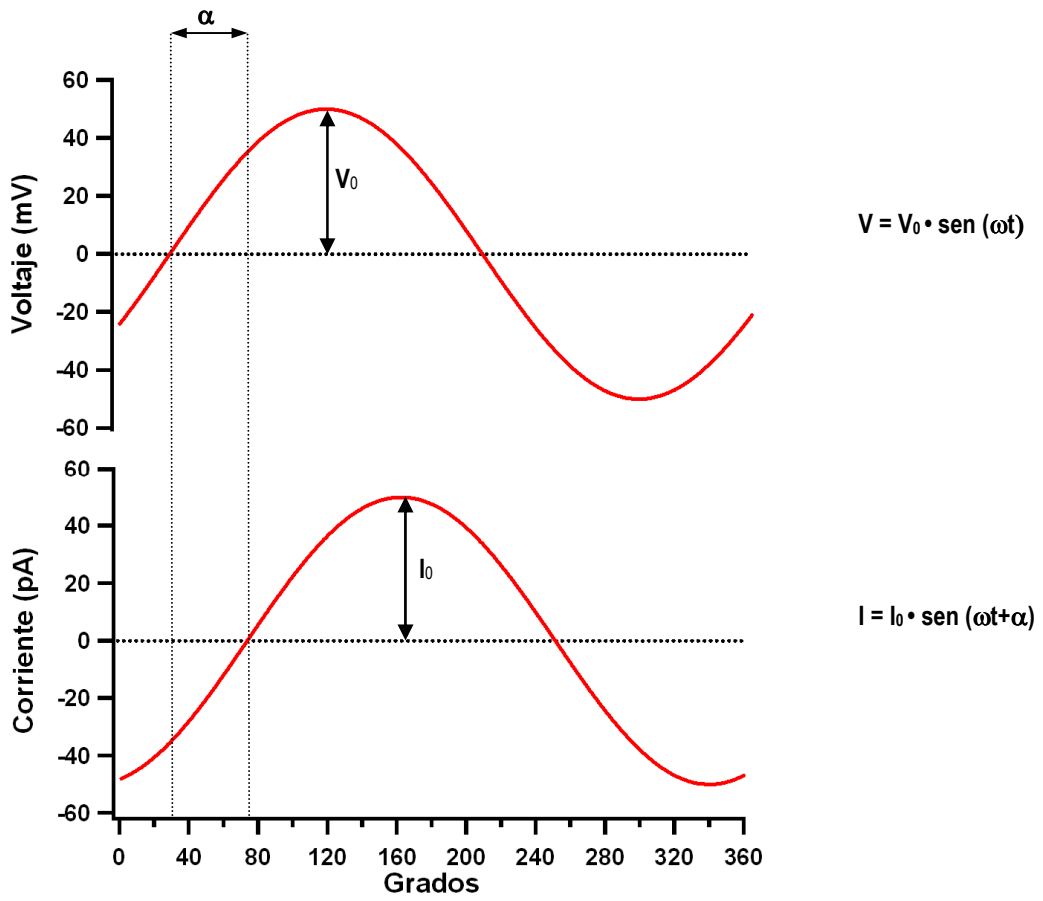

Figura III-4: Las dos señales sinusoidales (voltaje y corriente resultante) están desfasadas entre si un cierto ángulo que depende de los valores C_m, G_m y G_s de la célula

Las señales que varían en el tiempo de forma periódica se pueden representar en el plano complejo de forma vectorial. Cada vector consta de dos componentes, la parte real y la parte imaginaria que determinan en el plano complejo el módulo y el ángulo del vector. La representación de dos señales sinusoidales desfasadas entre sí es la representada en la figura III-5.

El componente resistivo de la corriente vendrá dado por la ecuación

$$I_R = \frac{V}{R} = V_0 \cdot \frac{sen(\omega t)}{R} \qquad [14]$$

y el componente capacitativo

$$I_c = C \cdot \frac{\partial V}{\partial t} = C \frac{\partial (V_0 \cdot sen(\omega t))}{\partial t} \qquad [15]$$

por lo que

$$I_t = V_0 \cdot \frac{sen(\omega t)}{R} + C \cdot V_0 \cdot \cos(\omega t) = V_0 \frac{sen(\omega t)}{R} + C \cdot V_0 \cdot sen(\omega t + 90^{\circ}) \qquad [16]$$

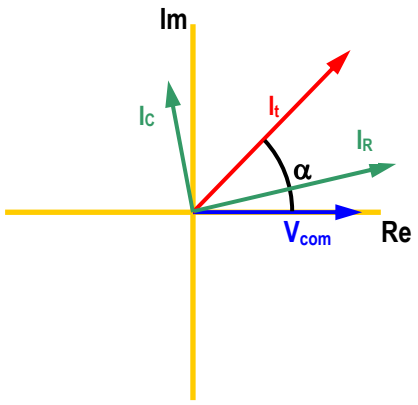

Figura III-5: El voltaje de referencia (V_{com}) se representa sobre el eje real (ángulo 0) y la corriente generada (I_t) como suma de I_C e I_R con un ángulo de desfase respecto a éste (α). Los ejes de ordenadas y abcisas representan los ejes imaginario (Im) y real (Re) respectivamente.

El vector de corriente total se puede descomponer en suma de dos vectores: I_C e I_R. Según la ecuación [16], el componente de la corriente proporcional a la capacidad está adelantado 90º con respecto al componente proporcional a la resistencia y el voltaje (fig. III-5).

La corriente capacitativa y resistiva es electrónicamente compensada antes de aplicar la señal de voltaje sinusoidal en el amplificador de "*patch-clamp*" mediante la sustracción de una señal ajustable antes del paso de amplificación final. Por ello, el detector de fase sólo capta señales debidas a incrementos de corriente total (ΔI) y las separa en sus componentes (ΔI_C e ΔI_R). Esta separación se hace digitalmente al multiplicar la corriente total por dos señales sinusoidales desfasadas entre si 90º e integrar un ciclo completo. Estas dos señales son sen(ωt) y cos(ωt):

Partiendo de la fórmula:

$$I_t = I_R + I_C = V_0 \cdot \frac{sen(\omega t)}{R} + C \cdot V_0 \cdot \cos(\omega t) \qquad [17]$$

$$I_C = \int \frac{1}{R} \cdot V_0 \cdot sen(\omega t) \cdot \cos(\omega t)\, dt + \int C \cdot V_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \cdot \cos(\omega t)\, dt = C \cdot V_0$$

[18]

$$I_R = \int \frac{1}{R} \cdot V_0 \cdot sen(\omega t) \cdot sen(\omega t)\, dt + \int C \cdot V_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \cdot sen(\omega t)\, dt = \frac{1}{R} \cdot V_0 \cdot kte$$

[19]

En la ecuación [18] el término $\frac{1}{R} \cdot V_0 \cdot sen(\omega t) \cdot \cos(\omega t)$ es igual a 0, por lo que I_C viene dada por el componente capacitativo, mientras que I_R viene determinado por el componente resistivo ya que el término $C \cdot V_0 \cdot \omega \cdot \cos(\omega t) \cdot sen(\omega t)$ es nulo en la ecuación [19].

Las variaciones en la corriente debidas a modificaciones en los valores de C_m y R_s se calculan derivando la corriente respecto al parámetro que varía (ecuaciones [10] y [11]).
El paso más importante para monitorizar la capacidad de la membrana celular con la técnica de detección de fase es determinar el ángulo de fase del vector ΔI_C. A partir de la ecuación [10] podemos obtener la proyección del vector ΔI_c, permitiéndonos calcular su argumento:

$$\theta = \arg(\Delta I_C) = arctag \frac{\mathrm{Im}(\Delta I_C)}{\mathrm{Re}(\Delta I_C)} = 180^{\circ} - 2 \cdot arctag(\frac{\omega C_m}{G_s}) \quad [21]$$

Respecto al componente resistivo de la corriente, el vector proporcional a los cambios en la conductancia de la membrana plasmática ΔI_{Rm} puede despreciarse puesto que en los mastocitos no hay canales dependientes de voltaje y contribuyen muy poco a los cambios que experimenta la corriente.

Como se ha visto anteriormente, en el inicio del experimento la posición de los vectores ΔI_R e ΔI_C en el plano complejo respecto a nuestra referencia (V_{com}) es desconocida (fig. III-6). Posteriormente, durante el transcurso del experimento también puede variar significativamente debido al cambio de los parámetros eléctricos de la célula. Ello provoca que un cambio en la capacidad se refleje no sólo en el componente imaginario sino en el real también. Es necesario, por lo tanto, detectar cual es el ángulo de fase respecto al voltaje y mover los ejes de referencia hasta hacer que el vector ΔI_R esté en fase sobre el eje real y el vector ΔI_C sobre el eje imaginario.

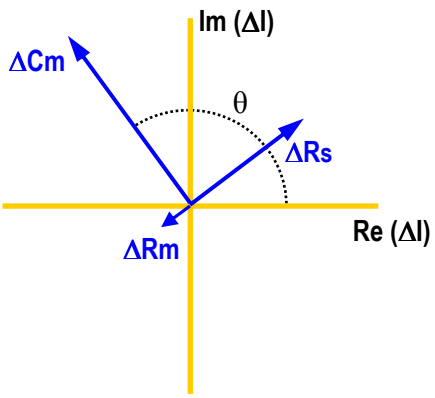

Figura III-6: Representación en el plano complejo de las variaciones de corriente provocadas por incrementos de capacidad, resistencia en serie y resistencia de la membrana tras cancelar la corriente con el amplificador de patch-clamp. Los vectores de ΔC_m y ΔR_s son perpendiculares entre si, pero debido a los parámetros eléctricos de la célula, los incrementos de R_s no proyectan en el eje real unicamente ni los de C_m en el imaginario. El ángulo que forma el vector ΔCm con el eje real (θ) se denomina ángulo de fase.

La detección del ángulo de fase se lleva a cabo utilizando una técnica denominada "phase tracking" (Fidler and Fernandez, 1989). Esta técnica permite ajustar la fase al conectar una resistencia en serie conocida con la célula, entre el electrodo del baño y la tierra. Un interruptor conectado en paralelo con la resistencia y la tierra puede ser transitoriamente abierto, causando un cambio proporcional y conocido en ΔI_R. A partir de este cambio, se determina su módulo y su argumento, que está desfasado 90º con respecto a ΔI_C, por lo que este se puede determinar también. El desfase total se puede eliminar de forma aritmética con una simple sustracción de ángulos para llevar los vectores en fase con el voltaje. En nuestro sistema, de forma automática se genera un cambio de resistencia equivalente a 100 fF de capacidad en el circuito de compensación de la corriente del amplificador del "*patch-clamp*", permitiendo determinar la fase del vector ΔI_C. Además este cambio provocado y conocido nos permite tener una calibración para convertir el cambio de corriente en un cambio equivalente de capacidad (fig. III-7).

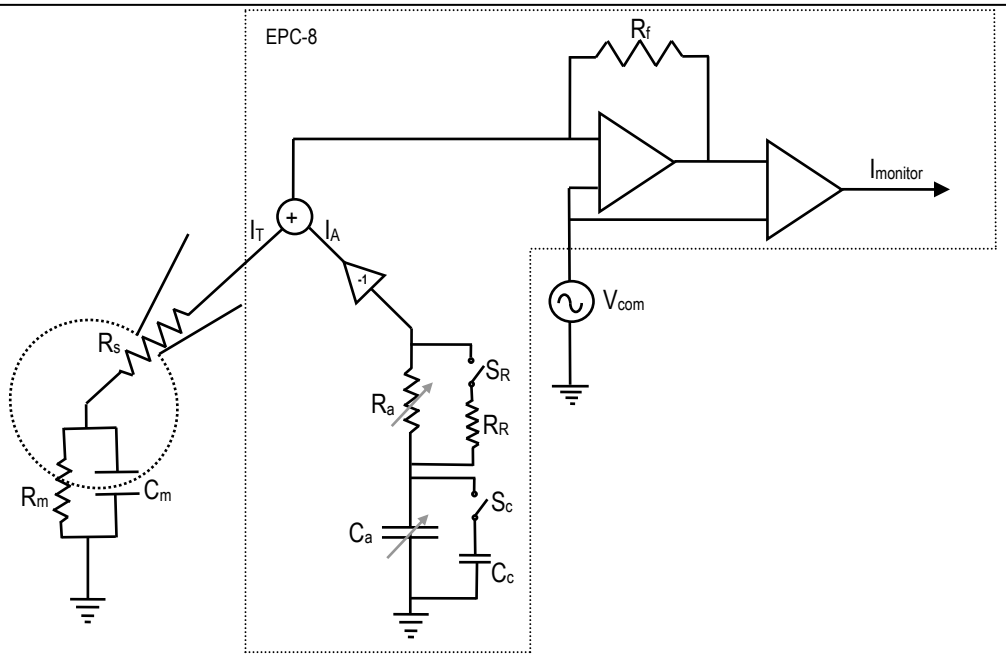

Figura III-7: Esquema que muestra el circuito equivalente de una célula en configuración whole-cell de la técnica de patch-clamp y el circuito necesario para el cálculo de la fase del vector ΔI_C. La región dentro del recuadro forma parte del amplificador de patch-clamp EPC-8. El circuito de compensación está formado por una resistencia y capacidad variables (R_a y C_a). Dos interruptores (S_c y S_R) controlados electrónicamente introducen en el circuito variaciones conocidas de resistencia y capacidad (R_R y C_c). Tras cancelar la corriente ($I_T = I_A$) modificando R_a y C_a, se introducen de forma transitoria en el circuito primero R_R para calcular el ángulo de fase y posteriormente C_c que permite la calibración del registro.

La sensibilidad de este método en la configuración de whole-cell para la medida de la capacidad es del orden de 1 fF y permite la identificación de eventos de fusión de gránulos únicos de un diámetro de 300 nm (Neher and Marty, 1982; Nusse and Lindau, 1988).

Al argumento del vector ΔI_C es denominado ángulo de fase (θ). Una vez ajustada la fase, el vector ΔI_C en el plano complejo se sitúa sobre el eje imaginario, a 90º respecto al vector de referencia o voltaje. El argumento del vector ΔI_R (θ - 90º) coincide con el eje real en esta situación. Un amplificador *lock-in* descompone la admitancia total en sus dos componentes real e imaginario que son proporcionales a ΔI_R e ΔI_C. Así, la fusión de una vesícula producirá un cambio en la corriente que sólo se observará en el trazo del componente imaginario mientras que el real permanecerá inalterado. Adicionalmente, un cambio en la resistencia en serie únicamente tendrá proyección sobre el eje real.

Parámetros medidos en los registros de capacidad

Los registros de capacidad proporcionan una medida directa de la superficie de la célula, es decir, de la cantidad de membrana citoplasmática que contienen. Esta técnica permite por lo

tanto detectar tanto la exocitosis como la endocitosis. Debido a la alta resolución de la técnica se obtienen numerosos parámetros del proceso de fusión de membranas que permite conocer sus características cinéticas.

El primer dato que se obtiene de los registros de capacidad es la capacidad inicial de la célula lo que permite conocer su tamaño inicial. La desgranulación de los mastocitos genera el aumento de la capacidad eléctrica y al final del registro se conoce el valor final de capacidad. Con ambos datos se puede calcular el aumento de superficie que han sufrido los matocitos en el proceso de desgranulación.

La resolución de la técnica permite la detección de eventos de fusión individuales de las vesículas secretoras. La monitorización en tiempo real de los eventos de fusión individuales se puede realizar un análisis cuantitativo del proceso exocitótico. Los parámetros analizados en los registros de capacidad son el tamaño del salto y el retraso entre este y la espiga amperométrica (fig. III-8). Para este último parámetro se necesita del registro de amperometría cuyo análisis se explica más adelante.

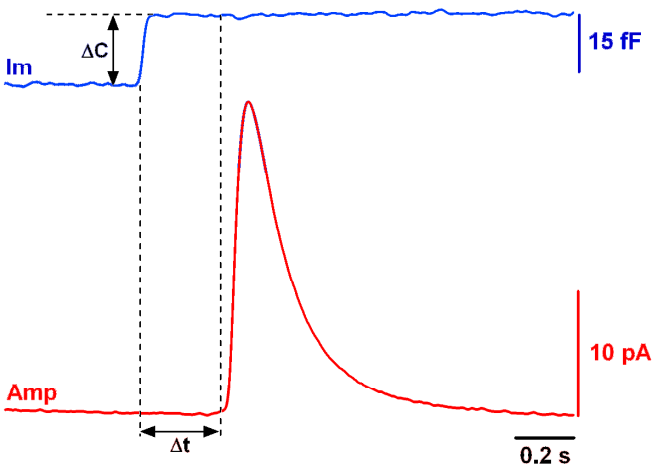

Figura III-8: Parámetros medidos para el análisis de los saltos de capacidad. El tamaño del salto (ΔC) permite conocer las características del grano secretor que se fusiona con la membrana. Mediante la combinación de la medida de la capacidad eléctrica y la amperometría se puede estimar la duración de la fase de expansión del poro de fusión utilizando el retraso entre el salto de capacidad y el comienzo de la espiga amperométrica (Δt).

3.6. Medida de la conductancia del poro de fusión exocitótico

Cuando una vesícula se funde con la membrana celular se produce por una parte, un incremento en la superficie celular y por tanto en la capacidad eléctrica y por otra, una conexión eléctrica entre el lumen de la vesícula con la membrana celular a través de una estructura de naturaleza desconocida denominada poro de fusión (fig. III-9).

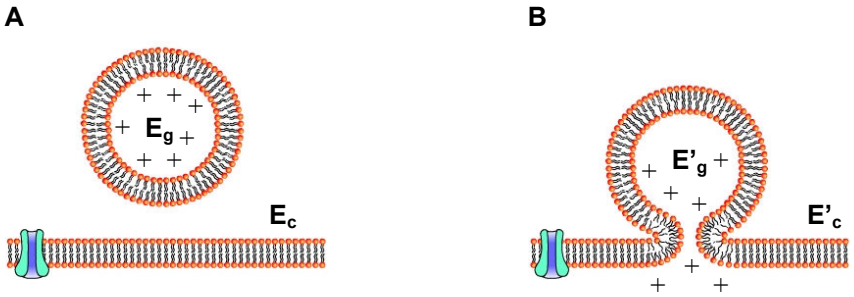

Figura III-9: El poro de fusión es una conexión eléctrica entre el lumen de la vesícula y el medio extracelular, con características similares a las de un canal iónico. E_g y E_c, los potenciales del grano secretor y la membrana celular respectivamente, difieren inicialmente (A). Una vez que la conexión se ha formado (B), E_g y E_c tienden a igualarse ($E'_g = E'_c$), cambiando la carga de la capacidad del grano (C_g) una cantidad Q, ($Q=C_g(E_c - E_v)$). El movimiento de carga aparece como una corriente transitoria cuya amplitud (I_0) se relaciona con la conductancia (G_0) por $G_0=I_0/(E_c-E_g)$ (Breckenridge and Almers, 1987a).

El circuito eléctrico equivalente durante la existencia del poro de fusión se esquematiza en la figura III-10.

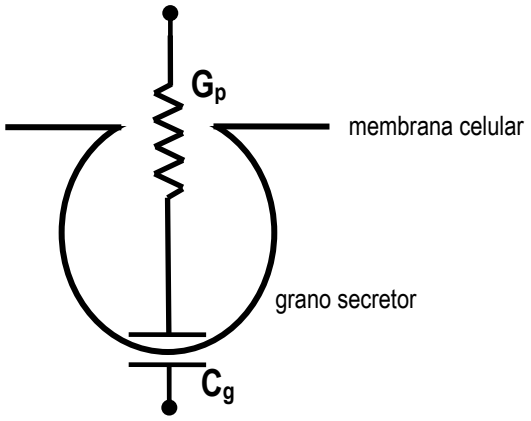

Figura III-10: circuito equivalente durante la fusión de un grano secretor con la membrana plasmática, siendo G_p la conductancia del poro de fusión y C_g la capacidad eléctrica del grano secretor

En estas condiciones, la admitancia del circuito equivalente del poro de fusión viene dada por:

$$Y = \frac{\frac{(\omega C_g)^2}{G_p} + j\omega C_g}{1 + \left(\frac{\omega \cdot C_g}{G_p}\right)^2} \qquad [22]$$

Durante la fusión de una vesícula se espera una combinación en la contribución de ambos componentes, el real y el imaginario. La teoría predice que mientras la conductancia del poro crece de cero a infinito, el componente imaginario (Im) debe crecer hasta su valor final (proporcional al incremento de C_m, es decir a la capacidad de la membrana de la vesícula), mientras que el componente real (Re) debe crecer y luego disminuir a cero (fig. III-11).

A partir del componente imaginario y real se pueden calcular mediante derivaciones matemáticas C_g y G_p:

$$C_g = \frac{\mathrm{Re}^2 + \mathrm{Im}^2}{\mathrm{Im} \cdot \omega} \qquad [25]$$

$$G_P = \frac{\mathrm{Re}^2 + \mathrm{Im}^2}{\mathrm{Re}} \qquad [26]$$

$$\frac{\mathrm{Im}}{\mathrm{Re}} = \frac{G_P}{\omega C_g} \Rightarrow G_P = \frac{\mathrm{Im}}{\mathrm{Re}} \cdot \omega \cdot C_g \qquad [27]$$

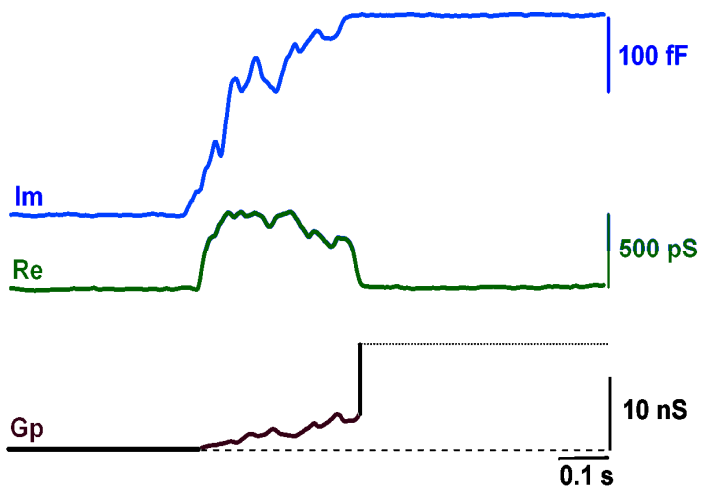

Figura III-11: Cálculo de la conductancia del poro de fusión de una vesícula secretora de un mastocito peritoneal de ratón *beige* mediante análisis de la admitancia. Los valores de conductancia del poro de fusión se obtienen a partir de los incrementos de la parte real e imaginaria obtenidos mediante la técnica de "*patch-clamp*".

El análisis de los trazos de Im y Re de los registros permite determinar la conductancia eléctrica del poro de fusión.

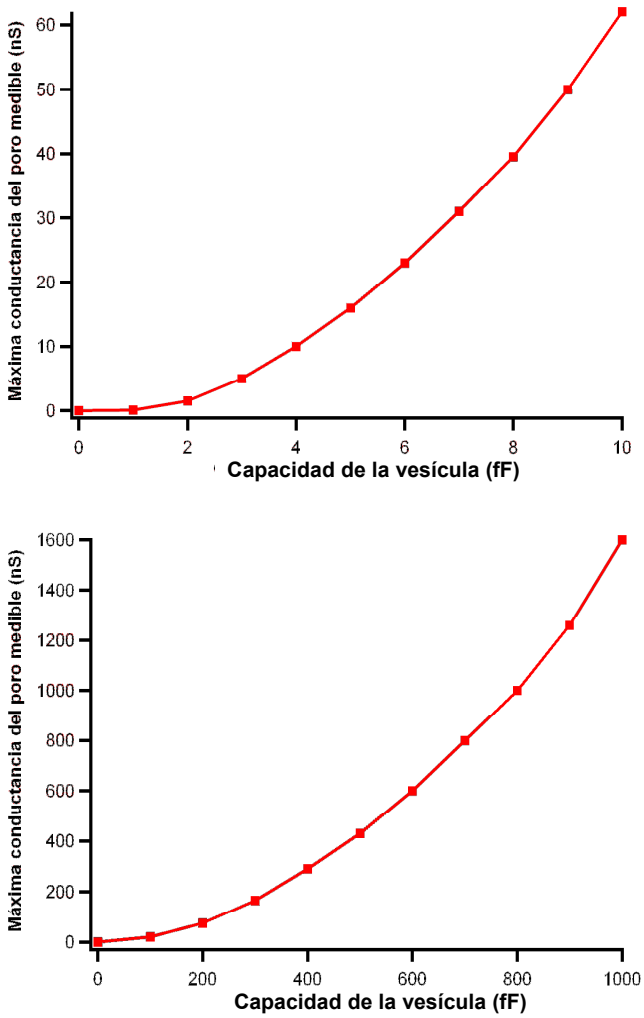

Figura III-12: El tamaño máximo del poro de fusión que se puede medir mediante la técnica de patch-clamp depende del tamaño de la vesícula secretora según la ecuación [27]. Modificado de (Fernandez-Peruchena et al., 2005).

De la ecuación [27] se puede observar que el límite superior de conductancia medible con está técnicas depende del tamaño de la vesícula. Por ello, para el estudio de la cinética del poro clásicamente se han utilizado células con vesículas secretoras de gran tamaño, como mastocitos de ratón *beige* (con un diámetro de 1 a 5 μm) y eosinófilos (0.5 – 2 μm). La conductancia del poro de fusión sólo se ha podido medir durante las etapas iniciales del mismo desde 1 a 20 nS, posteriormente se expande rápidamente y el nivel de ruido del modo de registro de célula entera impide seguir midiendo durante más tiempo las proyecciones de los vectores Im y Re y por tanto, el tamaño del poro (fig. III-12).

3.7. Amperometría

La amperometría es un método electroquímico que permite la detección de la secreción en células aisladas. Los métodos electroquímicos se basan en la reducción y/u oxidación de sustancias específicas secretadas por células aisladas. Estas técnicas se han utilizado desde

hace años en el estudio 'in vivo' de cambios en la concentración de neurotransmisor en el cerebro pero desde hace unos años se ha aplicado a células aisladas (Wightman et al., 1991; Alvarez de Toledo et al., 1993).

La amperometría es un método no invasivo ya que la monitorización de los productos liberados se realiza sin la diálisis del citoplasma, a diferencia de la medida de la capacidad eléctrica en la configuración de célula completa. Muchos de los productos secretados por algunos tipos celulares tales como noradrenalina, adrenalina, dopamina o serotonina son fácilmente oxidables. La primera medida electroquímica de secreción de células únicas fue en células cromafines (Leszczyszyn et al., 1991). Posteriormente se han detectado eventos de secreción cuántica no sólo en células cromafines (Wightman et al., 1991; Chow et al., 1992), sino también en mastocitos (Alvarez de Toledo et al., 1993), y células β pancreáticas (Kennedy et al., 1993) entre otras.

La técnica consiste en la detección de productos secretados que son capaces de sufrir un proceso de oxido-reducción. La detección de los productos secretados oxidables (o reducibles) requiere de un detector apropiado que pueda ser polarizado. Cuando estas moléculas difunden hacia la superficie del electrodo y entran en contacto con él se produce un intercambio de electrones entre las moléculas de secretagogo y el detector, generándose un flujo de electrones y por lo tanto una corriente eléctrica. El potencial que es necesario aplicar al electrodo para que se genere una corriente eléctrica está referido al electrodo de hidrógeno estándar, en el que la mitad de las moléculas están en el estado oxidado y la otra mitad en el estado reducido en condiciones de equilibrio. Para favorecer la reacción redox en todas las moléculas secretadas, el potencial que se aplica al electrodo debe ser superior al potencial redox de las moléculas. Los materiales típicos usados para los electrodos son el carbón, el platino y el oro.

En nuestro caso los electrodos de amperometría se han construido con fibras de carbón. Los electrodos son sometidos a un potencial fijo que permite la oxidación de ciertas moléculas y cuyos electrones son transferidos produciendo un flujo de electrones. El voltaje que se ha de aplicar al electrodo debe exceder al del potencial redox del compuesto a oxidar en al menos 200 mV para aumentar la velocidad de oxidación. Mediante la amperometría, no es posible la identificación de las sustancias oxidadas, teniendo que recurrir a la técnica denominada voltametría para este fin. Los voltamogramas consisten en curvas corriente-voltaje. La aplicación de una rampa de voltaje produce una corriente eléctrica que varía en función del voltaje aplicado. La representación del voltaje aplicado frente a la corriente generada muestra unos picos de

máxima oxidación característicos de cada sustancia que permiten su identificación. Actualmente se conocen los voltamogramas para muchas sustancias. En nuestros experimentos detectamos electroquímicamente la serotonina (5-hidroxi-triptamina, 5-HT) como secretagogo de los mastocitos (fig. III-13). La serotonina tiene un pico de oxidación a 500 mV a pH 7.25.

La amperometría posee una gran resolución temporal y permite monitorizar la dinámica de la secreción a nivel de vesícula secretora única. La mayor limitación de la técnica es que el potencial de oxidación de la sustancia a detectar no puede exceder el rango ±1 V ya que fuera de este intervalo existen interferencias con las corrientes producidas por la hidrólisis del agua.

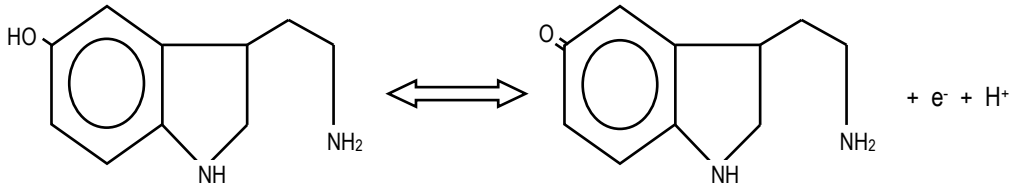

Figura III-13: Reacción de oxidación de la serotonina. El anillo bencénico posee un grupo hidróxilo que al oxidarse genera un electrón y un protón.

A partir de la corriente amperométrica registrada, es posible cuantificar el número de moléculas que han sido oxidadas siempre que sea una única sustancia la que es oxidada y que conozcamos el número de electrones que forman parte de la reacción de oxidación. Para ello, se aplica la ley de Faraday:

$$Q = \int \mathrm{I}\,\mathrm{dt} = \frac{zFM}{N_A} = zeM \qquad [28]$$

siendo M el número de moléculas de la reacción, z es el número de electrones transferidos por molécula, F es la constante de Faraday (96.485 C/mol), N_A el número de Avogadro (6.023×10^{23} moles^{-1}) y e es la carga elemental del electrón ($1{,}6 \times 10^{-19}$ C).

La posibilidad de calcular el número de moléculas que son liberadas en un evento único exocitótico posee un importante valor cuantitativo puesto que es posible estimar la concentración de secretagogo en la vesícula secretora cuando la amperometría se combina con la medida de la capacidad (fig. III-14).

Las características cinéticas de las espigas dependen de varios factores. Una molécula secretada en una suspensión acuosa presenta un movimiento determinado por su coeficiente de difusión. Mediante este coeficiente se puede estimar el tiempo que tarda una molécula en llegar

al detector. En un proceso de secreción estrictamente difusional, la cinética de las espigas amperométricas está únicamente afectada por la distancia existente entre el lugar de liberación y el detector. A pesar de esta simplificación, existen otros factores que afectan a la cinética de las espigas amperométricas: la liberación de las moléculas de secretagogo de la matriz intravesicular y el poro de fusión. Ambos procesos limitan la difusión libre, enlenteciendo el proceso de liberación de las moléculas al añadir un retraso entre la puesta en contacto del interior de la vesícula con el medio extracelular y la llegada de las moléculas al medio extracelular.

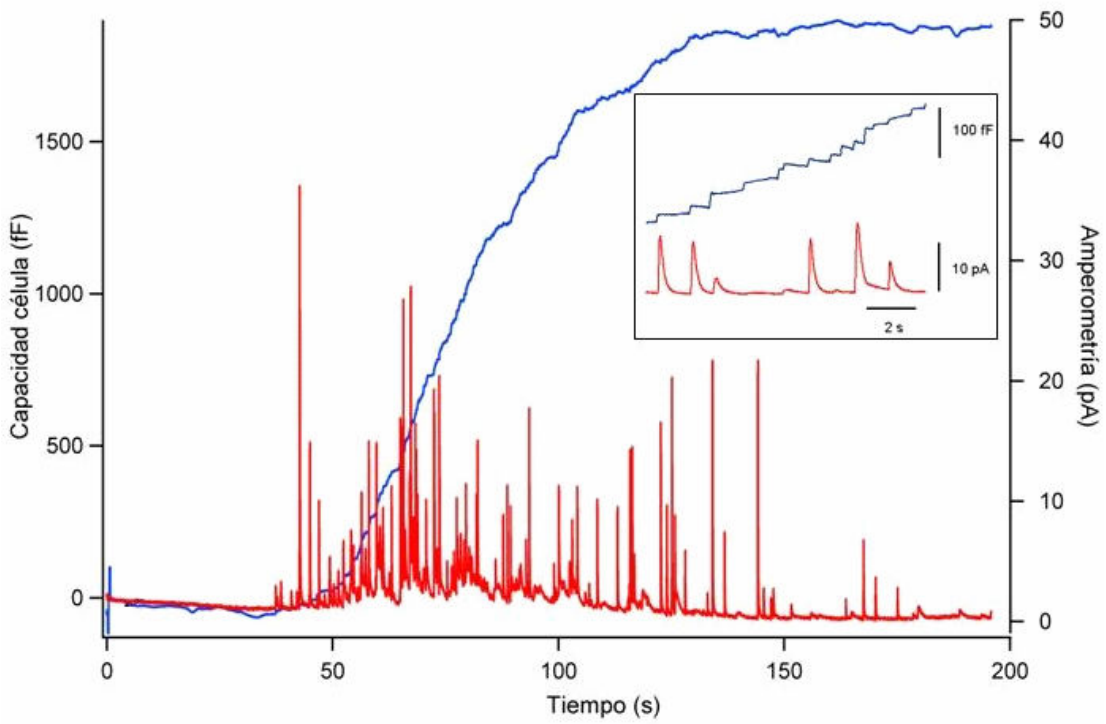

Figura III-14: Registro simultáneo de la capacidad electrica de membrana (azul) y de la detección electroquímica de serotonina mediante amperometría (rojo) en tiempo real durante la degranulación completa de un mastocito peritoneal de ratón. Se puede observar la liberación cuántica de serotonina por la coincidencia temporal de los saltos de capacidad con las espigas amperométricas.

Parámetros medidos en los registros de amperometría

El estudio de la cinética de la secreción está basado en las propiedades de las espigas amperométricas. Las espigas amperométricas se obtienen mediante la detección de la liberación de productos secretados de forma cuántica por el proceso de la exocitosis. En nuestro caso se monitoriza mediante amperometría la secreción de serotonina en mastocitos. Las características de las espigas amperométricas son una muestra de las propiedades cinéticas de la liberación de

serotonina. Para el estudio de la cinética de la secreción de serotonina se miden los parámetros de las espigas amperométricas que se señalan en la figura III-15.

Adicionalmente a los parámetros cinéticos de las espigas, se puede medir el tiempo de retraso entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica. Debido al tamaño de las vesículas secretoras de los mastocitos, mediante la configuración célula completa de "*patch-clamp*" no es posible medir directamente la conductancia del poro de fusión. Es entonces cuando el parámetro de retraso entre el salto de capacidad y la espiga es de gran utilidad por proporcionar información cuantitativa sobre el poro de fusión (fig. III-8).

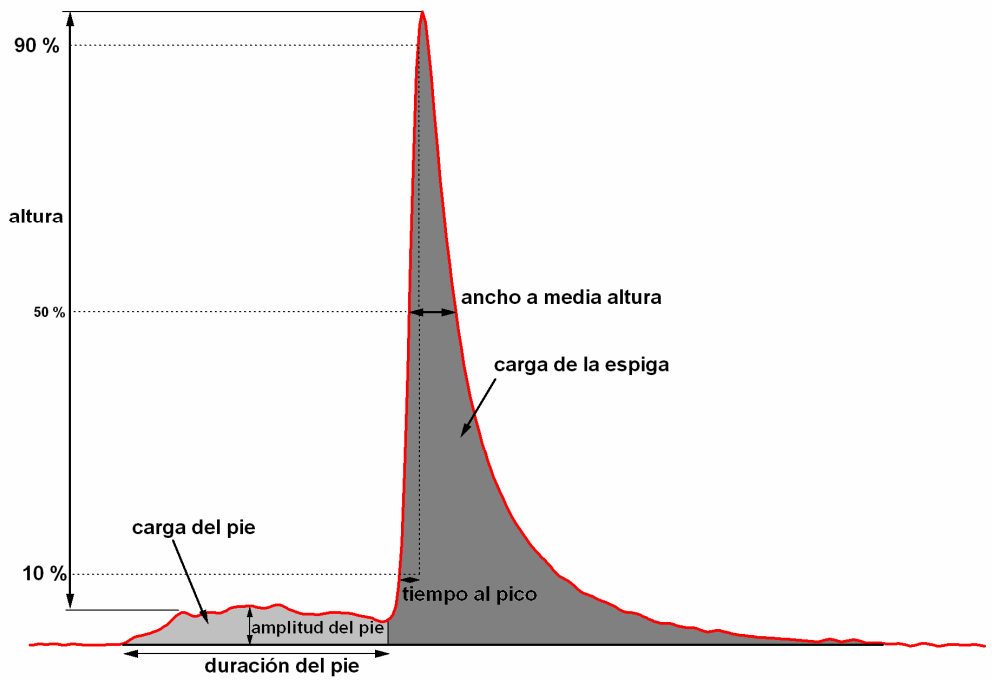

Figura III-15: Esquema mostrando los parámetros cinéticos utilizados para el análisis de las espigas amperométricas.

3.8. Simulaciones

El uso de métodos computacionales permite estudiar la biofísica de la liberación de moléculas teniendo en cuenta un gran número de los factores que la afectan. Uno de los métodos más empleados es el basado en la simulación de Monte Carlo (Haller et al., 1998), mediante el cual la generación de números aleatorios establece el recorrido de las moléculas individuales desde que son liberadas hasta alcanzar el detector. Es posible de este modo condicionar el recorrido de las moléculas a la geometría de la vesícula, del poro de fusión, y del recorrido hasta el detector (fig. III-16). Cambios en esta geometría permiten simular el proceso exocitótico de distintos tipos celulares y bajo distintas condiciones. Mediante la comparación de las espigas obtenidas por la simulación y espigas reales, se pueden obtener las condiciones en las que ocurrió el proceso. El método de Monte Carlo ha sido un abordaje clave en el estudio de la implicación en la secreción de la matriz intravesicular de heparina en mastocitos. Los ratones mutantes en el gen NDST-2 (N-deacetil-N-sulfotransferasa 2) carecen de matriz intravesicular en los mastocitos (Forsberg et al., 1999) y han servido para el estudio de la función de la matriz en la secreción. Los experimentos realizados en estos ratones mutantes mediante medidas de la capacidad eléctrica de la membrana y amperometría han sido complementados con simulaciones de Monte Carlo para determinar las condiciones en las que se produce la exocitosis.

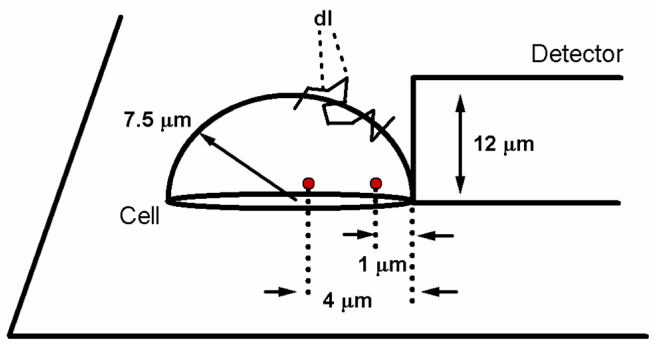

Figura III-16: Esquema explicativo de los parámetros geométricos utilizados en una simulación de Monte Carlo para el estudio de los parámetros de las espigas amperométricas. Los parámetros fundamentales son forma y tamaño de la célula, distancia de ésta al detector, tamaño del detector, distancia del evento exocitótico al detector y distancia mínima recorrida por las moléculas secretadas.

3.9. Sistema de registro

El sistema de registro está constituido por los siguientes componentes principales (figs. III-17 y III-18):

- Jaula de Faraday conectada a tierra para evitar interferencias electromagnéticas.
- Mesa antivibratoria (TMC; Massachussets, EE.UU) con dos torretas verticales de aluminio (Newport, EE.UU) que sirven de apoyo a los micromanipuladores y a la pletina que sujeta a la cámara de registro.
- Microscopio invertido (Axiovert 35, Zeiss, Alemania).
- Micromanipulador con avance manual en los ejes 'x' e 'y' y control remoto en el eje z (MDC-3 remote, Klinger Scientific), que desplaza la micropipeta de registro. El preamplificador (*head-stage*) del amplificador EPC-8 está adaptado al micromanipulador.
- Micromanipulador (Narishige, Japón) de avance manual en sus tres ejes, destinado a desplazar el electrodo de fibra de carbono para el registro de amperometría.
- Amplificador de amperometría (VA-10, npi electronic GmbH, Alemania).
- Amplificador de "*patch-clamp"* (EPC-8, HEKA electronics, Alemania).
- Amplificador Lock-in (SR830 DSP, Stanford Research System, EE.UU).
- Interfase analógico-digital (National Instruments, NI PCI-6040E), con 16 canales de entrada y 2 de salida para conversión A/D y D/A respectivamente con resolución de 12 bits y 250 muestras por segundo en modo multicanal y 8 canales digitales de entrada/salida.
- Osciloscopio digital (PM3050, Philips).
- Ordenador personal compatible (AMD K7 2.0 GHz, 256 Mbytes de RAM).

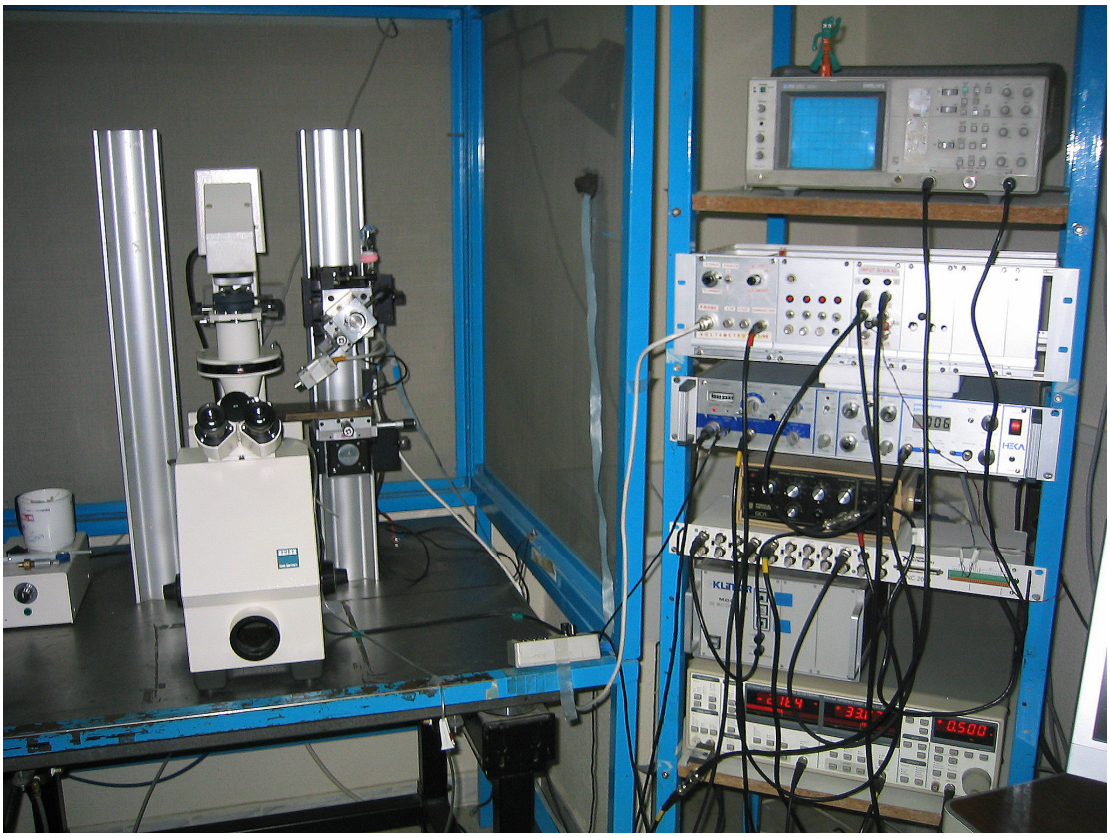

Figura III-17: Fotografía del dispositivo experimental utilizado para el registro de la capacidad eléctrica de los mastocitos y de la detección electroquímica de la serotonina liberada por exocitosis.

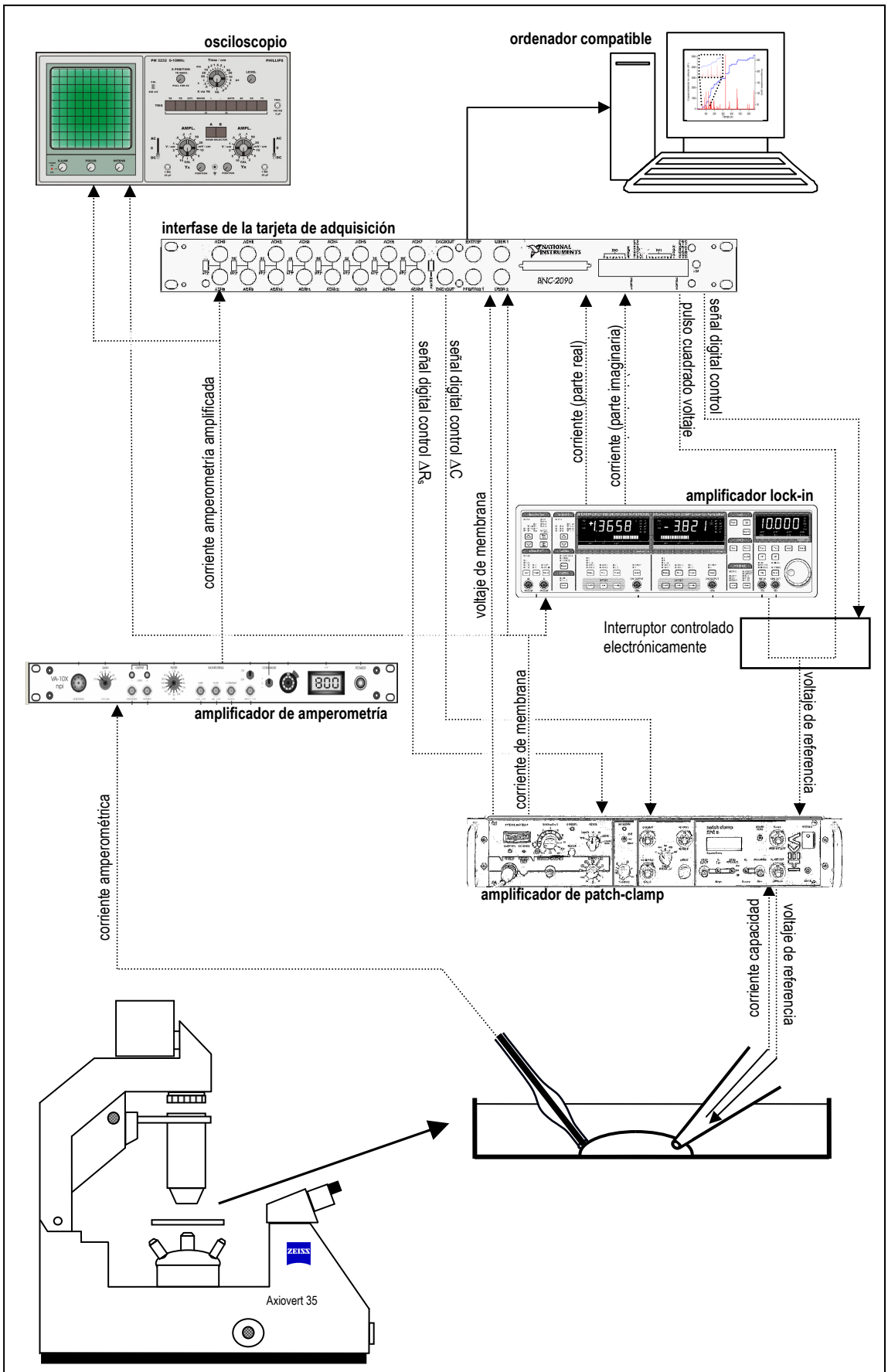

Figura III-18: Esquema del sistema de registro detallándose las conexiones entre los distintos componentes.

Microelectrodos de "patch-clamp" para la medida de la capacidad eléctrica de la membrana

Los microelectrodos de patch-clamp están realizados con vidrio borosilicato, a partir de capilares de 85 milímetros de largo, 2 milímetros de diámetro externo y 0,3 milímetros de diámetro interno (Hilgenberg GmbH, Alemania, Art. 1808501). Estos capilares fueron estirados en un estirador horizontal programable (P-97, Sutter Instruments, EE.UU.). Se requirieron 3 pasos de estirado para obtener el tamaño y forma adecuados para los experimentos de "*patch-clamp"*. Los valores introducidos en el estirador fueron los siguientes:

FASE	CALOR	TRACCIÓN	VELOCIDAD	TIEMPO
1	480	20	20	20
2	450	-	20	45
3	460	10	15	50

Con estos parámetros la resistencia eléctrica de la micropipeta sumergida en la solución de registro es de 3 a 4 MΩ y tiene la forma óptima para minimizar la obstrucción de la punta por el contenido celular al dializar el citoplasma. A continuación el extremo de la pipeta se recubre con un elastómero de silicona (Sylgard 184, Dow Corning Corp. EE.UU.) con el objetivo de engrosar su pared. El elastómero es semifluido a temperatura ambiente y se aplica formando una capa sobre el extremo de la pipeta sin tocar en ningún caso la punta. Mediante el calor procedente de un flujo de aire caliente el elastómero se solidifica en pocos segundos. El engrosamiento de la pared de la pipeta provoca una disminución de la capacidad eléctrica de la pipeta.

Microelectrodos de amperometría

Los electrodos de amperometría se construyeron con fibras de carbono de 8 μm de diámetro. El electrodo permite que un extremo de la fibra se ponga en contacto con la célula y que el otro extremo se conecte al amplificador de amperometría.

Los materiales utilizados para la construcción de los electrodos fueron los siguientes:

- Fibras de carbono (AMOCO, EE.UU.).
- Tubo de polietileno de 0.4 mm de diámetro interno y 0.8 mm de diámetro externo (Portex, Inglaterra).
- Capilares de vidrio de 0.8 mm de diámetro interno, 1.1 mm de diámetro externo y 100 mm de longitud (KIMAX, EE.UU.).

- Pinzas engüantandas del número 5.
- Lupa de disección.
- Acetona (Panreac, cód. 211007).
- Hojas de bisturí tipo 10 (Corysan, Barcelona).

Para la preparación del electrodo, el tubo de polietileno es llenado por capilaridad con acetona. La acetona elimina la atracción electrostática entre el polietilieno y la fibra de carbono. La fibra de carbono presenta una gran fragilidad transversal, lo que hace necesario para su manipulación el uso de unas pinzas engüantadas con dos pequeños fragmentos de polietileno. Con estas pinzas se introduce la fibra en el interior del tubo de polietileno por uno de sus extremos. Una vez introducido se elimina la mayor parte de la acetona tocando uno de los extremos del tubo de polietileno con un papel absorbente. A continuación se deja secar unos minutos para que se elimine el resto de acetona por evaporación.

La forma de aislar eléctricamente la fibra de carbono es recubrirla con polietileno fundido sobre ella. Para ello, se utilizó un dispositivo montado sobre una lupa de disección con una resistencia de tungsteno acoplada a una fuente de voltaje constante y regulable. Mediante la aplicación de voltaje a la resistencia se consigue una temperatura controlada que funde el polietileno sobre la fibra. La aplicación de calor sobre el tubo de polietileno provoca un cambio en la consistencia y en la opacidad que permite el estiramiento del tubo hasta que queda un fino recubrimiento de varias decenas de micras de diámetro sobre la fibra de carbono. La retracción genera también a cada lado de la zona estirada dos engrosamientos en el polietileno. La región central se puede cortar con un bisturí generando dos electrodos con la región de polietileno fundido de una longitud de 5 mm aproximadamente. A continuación, la punta de los electrodos se aproxima a la resistencia para retraer la cubierta de polietileno hasta que queda con un espesor de unas pocas micras de diámetro (fig. III-19). El electrodo por su zona no estirada se introduce parcialmente en un extremo de un capilar de vidrio y se pega a éste con un pegamento de secado rápido (SuperGlue3, Loctite), de forma que permita su conexión con el amplificador.

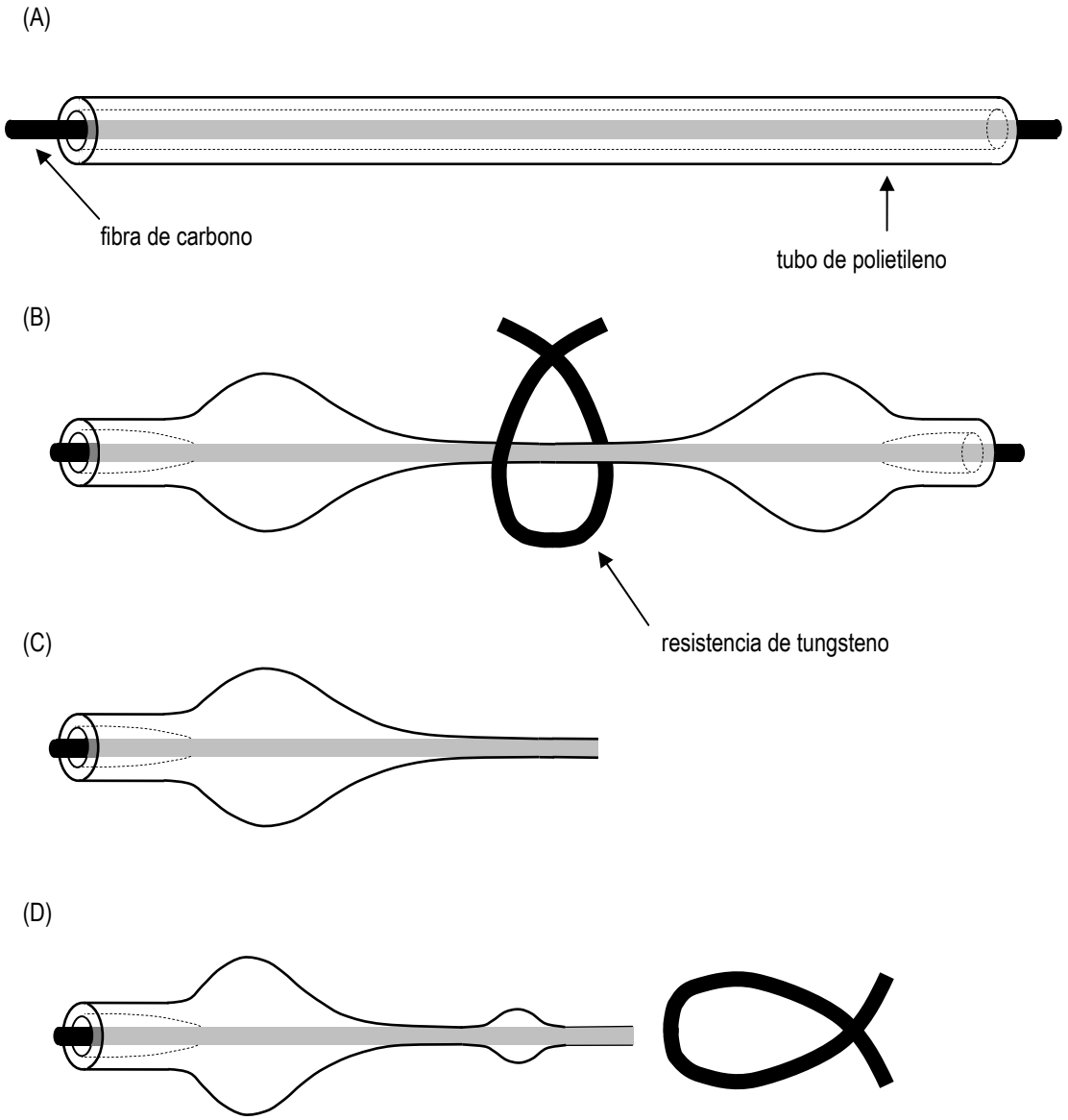

Figura III-19: Método de fabricación de los electrodos de amperometría de fibra de carbono. (A) Fibra de carbono en el interior del tubo de polietileno. (B) Aplicación de calor para el estiramiento del tubo y aislamiento de la fibra de carbono. (C) Electrodo obtenido tras el corte con bisturí. (D) Retracción del recubrimiento de polietileno mediante calor.

Conexión de los electrodos a los amplificadores

La forma de unión del electrodo a los amplificadores se realiza a través de una pieza denominada portaelectrodos o "holder" (fig. III-20). El portalectrodos consiste en una pieza con un conector tipo BNC y un sistema de rosca que permite el ajuste de la micropipeta. El canal central del BNC está soldado a un hilo de plata de 0.25 mm de diámetro cubierto con teflón (World Precision Instruments, EE.UU). Al otro extremo del hilo de plata se le quita un fragmento

de 1 cm aproximadamente del recubrimiento de teflón para clorurarlo con una solución de ácido clorhídrico 1 M al aplicarle una diferencia de potencial de 1 V con una fuente de voltaje.

En el caso del microelectrodo de "*patch-clamp*", el contacto eléctrico entre el hilo de plata y el interior de la pipeta es debido a la solución interna de registro. En los electrodos de amperometría la continuidad eléctrica entre el hilo de plata y la fibra de carbono está soportada por una solución de KCl 3 M.

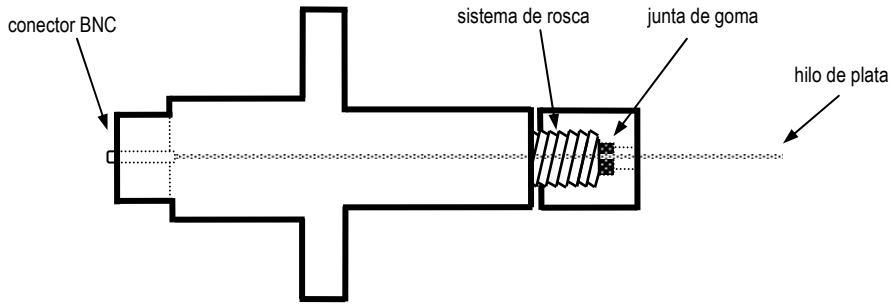

Figura III-20: Esquema del portapipetas o "holder".

3.10. Procedimientos experimentales

Los mastocitos sembrados en las camaritas de cultivo son sacadas del incubador tras una hora de cultivo para asegurar que las células se encuentran pegadas a la cámara. Esta adhesión en imprescindible para poder acercar tanto el electrodo de amperometría como la pipeta de registro sin que las células se desplacen. Una vez sacadas del incubador, las células son lavadas con la solución de registro (Tabla II) y colocadas en el microscopio. A continuación se ajusta la óptica Koehler del microscopio para optimizar la visualización del cultivo.

El cultivo intraperitoneal presenta varios tipos celulares además de los mastocitos. Estos tipos celulares son neutrófilos y linfocitos. Los mastocitos se distinguen del resto de tipos celulares por su morfología, ya que presentan una membrana más opaca y una mayor refringencia en la región del citoplasma.

Una vez colocado el electrodo de amperometría en el portapipetas o "holder" se conecta al pre-amplificador del amplificador de amperometría a través del conector BNC. Mediante el manipulador manual se introduce el electrodo en la camarita de registro. La polarización de la fibra genera una corriente que es monitorizada en el osciloscopio. Las características de la

corriente (τ=500 ms y resistencia de 20-60 GΩ) permiten comprobar tanto la conexión entre el electrodo y el amplificador, como la idoneidad del electrodo para realizar el registro.

Una vez sumergido el electrodo de amperometría se coloca la pipeta de vidrio en el portapipetas y este se conecta al pre-amplificador del amplificador de "*patch-clamp"*. Cuando se introduce en el baño la pipeta se cierra el circuito y la aplicación de un pulso cuadrado de voltaje permite observar la corriente resultante en el osciloscopio. La amplitud de la corriente es función de la resistencia de la pipeta, lo que permite comprobar si su tamaño es adecuado para la realización del experimento.

A

B

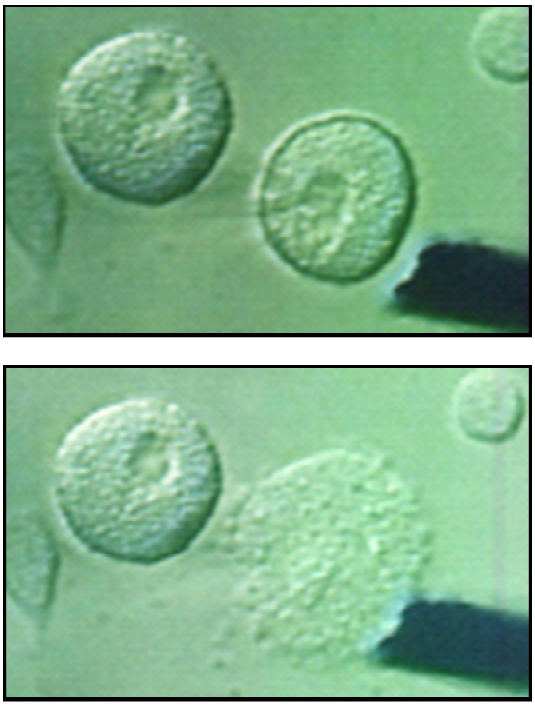

Figura III-21: Fotografía de dos mastocitos peritoneales de rata en la cámara de registro antes (A) y después (B) de que uno de ellos sufriera la desgranulación causada por el GTPγS introducido en la pipeta de patch-clamp. También se puede observar el electrodo de amperometría con el que se detectan electroquimicamente las moléculas de serotonina.

Tras localizar el electrodo de amperometría y la pipeta en el campo de visión del microscopio, ambos se acercan al mastocito que consideremos adecuado para el registro. Primero se coloca el electrodo de amperometría en contacto con la superficie celular. A continuación se aproxima la pipeta y se toca la superficie celular, observándose un aumento en la resistencia (fig. III-21A). Aplicando presión negativa se favorece la creación del sello que va aumentando de resistencia hasta llegar al orden de gigaohmios (gigasello) momento en el cual se considera que hay aislamiento eléctrico y químico entre el interior y el exterior de la pipeta. En esta situación nos encontramos en la configuración de cell-attached y procedemos a realizar la compensación del componente rápido de la capacidad del circuito mediante el potenciómetro del amplificador de "*patch-clamp"* dedicado a tal fin ('C-FAST'). La aplicación nuevamente de presión

negativa de mayor intensidad produce la rotura del parche de membrana y el paso a la configuración de "*whole-cell*". La modificación del circuito en la configuración de "*whole-cell"* provoca la aparición de transientes en la corriente que pueden observarse en el osciloscopio. Estos transientes son reflejo de la corriente que atraviesa el circuito formado por la membrana de la célula y la punta de la pipeta cuando se aplica un pulso cuadrado de voltaje. Mediante el circuito de compensación del amplificador de "*patch-clamp"* se cancela manualmente esta corriente (potenciómetros 'C-SLOW' y 'G-SERIES'). Una vez compensada la corriente, se puede comenzar el registro. Para ello se utiliza una aplicación desarrollada específicamente que permite controlar de forma automática los parámetros del amplificador lock-in . Esta aplicación genera señales TTL a través de la tarjeta de adquisición al inicio del registro que permiten el control de los interruptores que introducen en el circuito cambios conocidos de capacidad y resistencia que permiten el ajuste de fase y la calibración del registro (fig. III-18). Una vez comenzada la adquisición se introduce en el circuito una resistencia en serie (ΔG_S) de 10 nS lo cual produce un cambio en la corriente. Este cambio presenta proyección en ambos componentes de la admitancia. El módulo de estas proyecciones se utiliza para el cálculo del ángulo de fase. Esté cálculo se realiza mediante el programa de adquisición y lo configura en el amplificador lock-in a través de la conexión RS-232. Un vez cambiada la fase en el amplificador lock-in, se introduce en el circuito un incremento de capacidad de 100 fF (ΔC_m). El cambio en la corriente presenta en estas condiciones proyección únicamente en la parte imaginaria y su amplitud permite la calibración del registro de capacidad.

3.11. Métodos de cálculo

Cálculo de superficies y volúmenes de células a partir de la capacidad eléctrica

A partir de la capacidad específica de la membrana, 1 μF por cm^2, se obtienen las superficies tanto de las células como de las vesículas secretoras. Las células se han considerado que poseen una forma semiesférica para el cálculo de su radio. La superficie de una semiesfera de radio *r* es $3\pi r^2$. Por lo tanto, el radio de una semiesfera de superficie A es igual a

$$r = \sqrt{\frac{A}{3 \cdot \pi}} \qquad [29]$$

El volumen de una semiesfera de radio *r* se calcula como

$$V = \frac{2}{3}\pi \cdot r^3 \qquad [30]$$

Cálculo de superficies y volúmenes de vesículas secretoras a partir de la capacidad eléctrica

La forma de las vesículas secretoras se ha considerado esférica, calculándose el radio de una esfera de superficie A con la fórmula

$$r = \sqrt{\frac{\mathrm{A}}{4 \cdot \pi}} \qquad [31]$$

A partir del radio, el volumen de una esfera de radio *r* se calcula con la siguiente fórmula

$$V = \frac{4}{3}\pi \cdot r^3 \qquad [32]$$

3.12. Estadística

Las abreviaturas de los parámetros estadísticos utilizados en este trabajo para la representación de datos se muestran en la tabla III-4.

Tabla III-4: Abreviaturas utilizadas para los datos estadísticos	
Media aritmética	media
Media de una distribución normal	$\bar{x}$
Media de una distribución exponencial	τ
Desviación estándar	d.e.
Error estándar	e.e.

Número de células registradas

Los registros simultáneos de capacidad y amperometría presentados en la parte de este trabajo correspondiente al estudio de la secreción en mastocitos carentes de matriz intravesicular se han obtenido del registro de 12 células de ratones NDST-2 y 5 células de ratones control.
Se han realizado, además, el registro de 32 mastocitos procedentes de ratones SCAMP1-beige y 16 células de ratones *beige* control.

Tests estadísticos

En el caso de que los datos se ajusten a una distribución normal, la significancia de las diferencias entre las distribuciones se mide empleado en test paramétrico *t-test*.

Los datos que no se ajustan a una distribución normal son analizados mediante el test de *Mann-Whitney*. El empleo del *Log-Rank Test* permite estudiar la significancia de los datos que se ajustan a las distribuciones exponenciales.

Todos los test han sido realizados utilizando el programa SigmaStat v3.1 (Systat Software, Inc.).

4. SOFTWARE

Para la realización de los experimentos en los que se basa esta tesis se han desarrollado aplicaciones que cubren dos aspectos fundamentales del registro de datos electrofisiológicos:

- adquisición y registro de las señales
- análisis de los datos registrados

Ambas aplicaciones se han desarrollado bajo el entorno de Microsoft Windows XP con el software comercial 'Igor Pro' (Wavemetrics, EE.UU.). Este software permite el control de las tarjetas de adquisición de National Instruments a través de sus extensiones "Igor NIDAQ Tools MX".

Los códigos del software que a continuación se comenta en esta sección se incluyen en formato digital como anexo de esta tesis.

4.1. Software de adquisición de las señales

Como ya se ha comentado, para la adquisición y registro de las señales obtenidas se ha utilizado una tarjeta de adquisición de National Instruments modelo PCI-6030E (National Instruments, EE.UU.) controlada por una aplicación desarrollada con Igor Pro. El código de esta aplicación se encuentra en el anexo I. La aplicación contiene varios controles que permiten al usuario configurar los amplificadores y establecer las conexiones necesarias para el registro de las señales (fig. III-18). La aplicación de registro tiene dos partes diferenciadas: la ventana principal de registro y la función de osciloscopio.

La ventana principal de la aplicación (fig. III-22) permite la visualización en tiempo real de las señales y su registro. En ella se determina la configuración de "*patch-clamp"* que se va a utilizar, permitiendo elegir entre '*whole-cell'* y '*cell-attached'*. Las señales que se muestran en esta ventana son la partes imaginaria de la admitancia y la amperometría. La visualización de estas señales se puede modificar tanto en el eje vertical como la escala temporal. El ajuste de la ganancia de los amplificadores de "*patch-clamp"* y amperometría se ha de configurar en esta ventana para la correcta calibración de las señales adquiridas. Los controles que dan la orden para el comienzo y final de registro se encuentran en esta ventana. También se proporciona información sobre el nombre del archivo en el que se están guardando los datos. El nombre del archivo lo proporciona la aplicación de forma automática. Desde esta ventana se accede a la otra parte de la aplicación que proporciona la información y configuración necesaria para la formación del sello que consiste en un osciloscopio digital (fig. III-23).

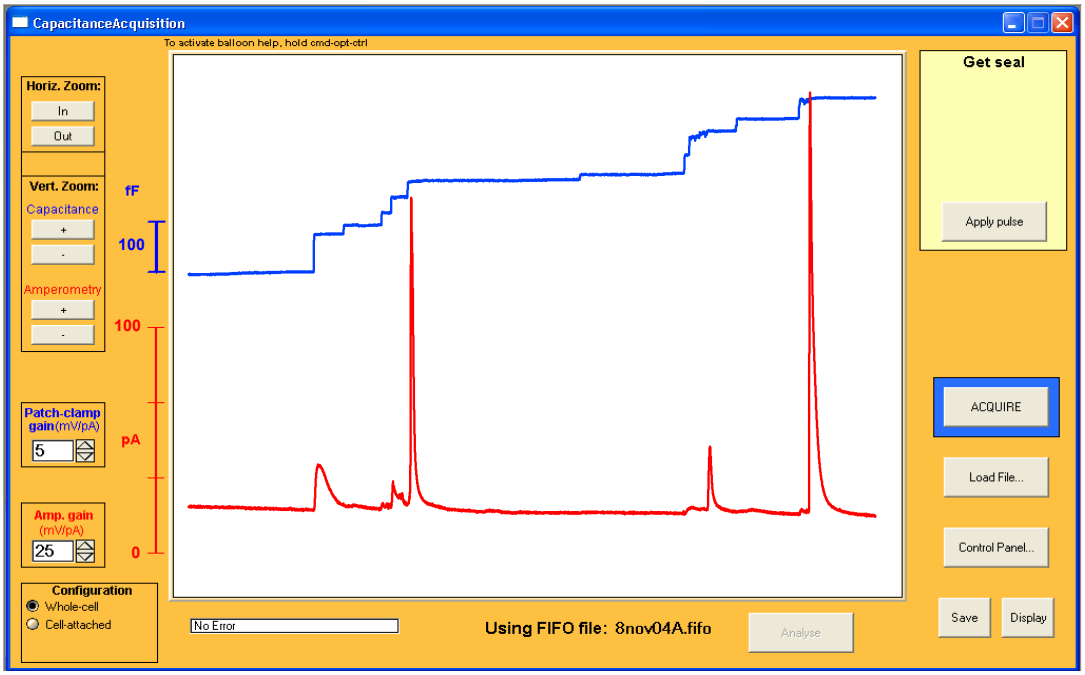

Figura III-22: Ventana principal de la aplicación de adquisición de datos. Esta ventana permite monitorizar en tiempo real las variaciones de la capacidad eléctrica de la célula y de la amperometría.

A

B

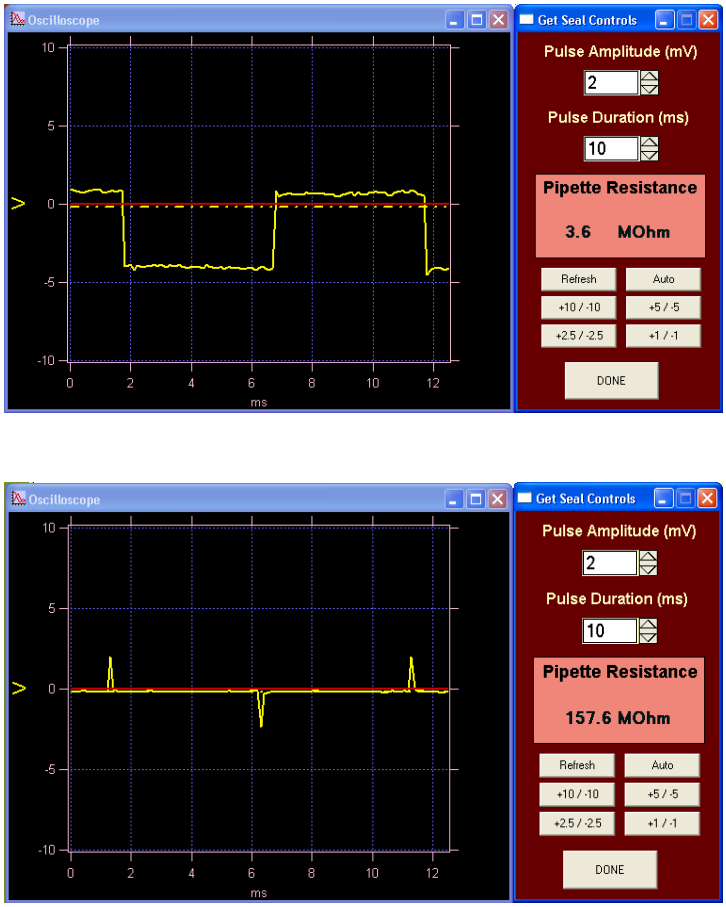

Figura III-23: Ventana de la función de osciloscopio con los controles de configuración del pulso cuadrado, cálculo de la resistencia eléctrica de la pipeta y opciones de visualización. (A) Corriente resultante con la pipeta introducida en el baño de registro. (B) Corriente resultante en la configuración de cell-attached. Se pueden apreciar los transientes de corriente que hay que cancelar con el circuito del amplificador de patch-clamp.

La función osciloscopio permite la visualización de la corriente procedente de la pipeta de "*patch-clamp"* al aplicar un pulso cuadrado de voltaje. La amplitud y la duración del pulso puede controlarse en la ventana que ofrece la aplicación y el cálculo de la resistencia de la pipeta se calcula y muestra de forma automática (fig. III-23).

4.2. Software de análisis de registros simultáneos de capacidad y amperometría

Al igual que la aplicación de registro, la aplicación para el análisis de los registros ha sido desarrollada mediante el software comercial 'Igor Pro' (Wavemetrics). La aplicación ofrece una ventana que permite cargar el archivo de datos deseado. Una vez cargado, se muestra en la ventana principal una visión global del registro, con los trazos de capacidad y amperometría calibrados para poder realizar el análisis correctamente (fig. III-24). En la ventana se puede elegir los trazos a visualizar: capacidad, conductancia, derivada de la capacidad y amperometría. Esta ventana además contiene los siguiente controles:

- desplazamiento definido por el usuario a lo largo del registro
- avance y retroceso entre los eventos de capacidad detectados
- umbral de detección de los saltos de capacidad
- región de visualización del registro de capacidad
- ajuste de fase

Al pulsar en los botones de desplazamiento, en la ventana se muestran los trazos seleccionados en una escala temporal mayor. Los cursores señalan los saltos de capacidad detectados según la configuración seleccionada (fig. III-25).

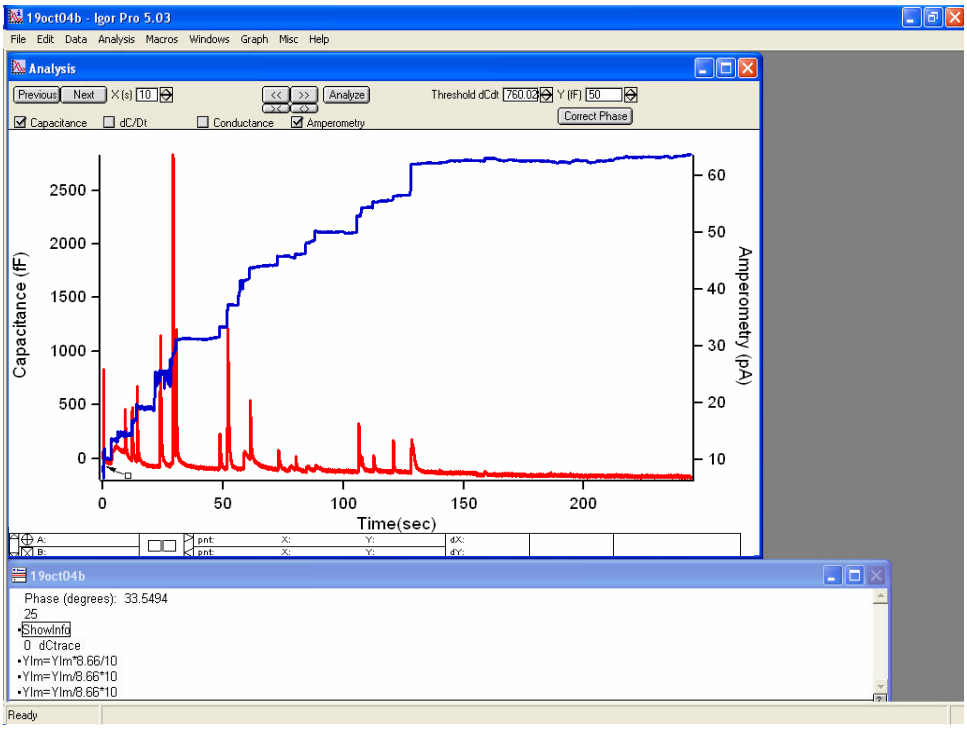

Figura III-24: Pantalla inicial del programa de análisis. Inicialmente se muestran los trazos de la parte imaginaria de la admitancia (capacidad de la célula) y de la amperometría. Esta ventana permite obtener una visión global del registro.

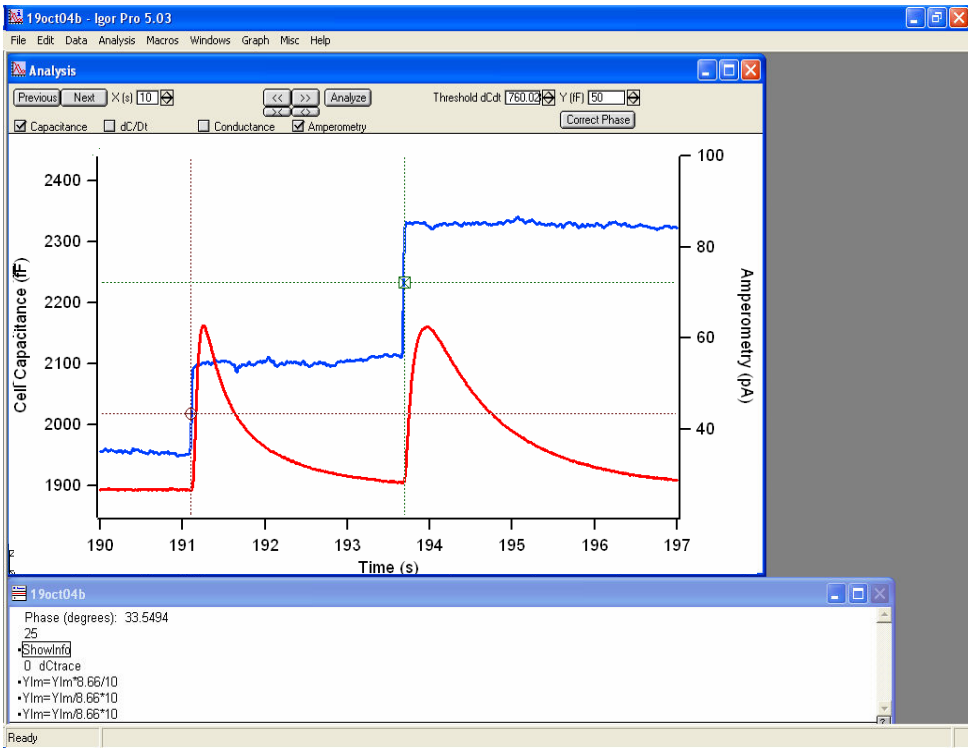

Figura III-25: Detección de saltos de capacidad según los parámetros de detección configurados en la ventana principal de la aplicación de análisis.

Una vez seleccionado el salto de capacidad el botón “analyze” crea una nueva ventana en la que se analizan diversos parámetros de los registros de capacidad, conductancia y amperometría. Inicialmente se proporcionan los valores del salto de capacidad y de la espiga amperométrica (fig. III-26).

Este análisis es el análisis básico que realiza la aplicación. Una vez detectado el salto y su espiga amperométrica correspondiente el programa ofrece una serie de opciones de visualización y de análisis adicionales. Si la detección del salto de capacidad no se considera adecuado, la modificación de la posición de los cursores permite un reanálisis del evento al pulsar el control ‘step’. De forma similar, se puede realizar el reanálisis de la espiga amperométrica al cambiar los cursores de posición y pulsar el control ‘spike’. El pie de la espiga amperométrica puede ser analizado mediante el control ‘foot’ mostrando los valores de amplitud, duración, carga y porcentaje de carga respecto a la espiga. Otra posibilidad que la aplicación ofrece es el análisis del poro de fusión a través del control ‘fusion pore’. Al pulsar dicho control aparece en la ventana de análisis el trazo de conductancia (parte real de la admitancia) y se calcula la conductancia del poro de fusión en el fragmento de registro en el que existe proyección en la parte real de la admitancia (fig. III-27).

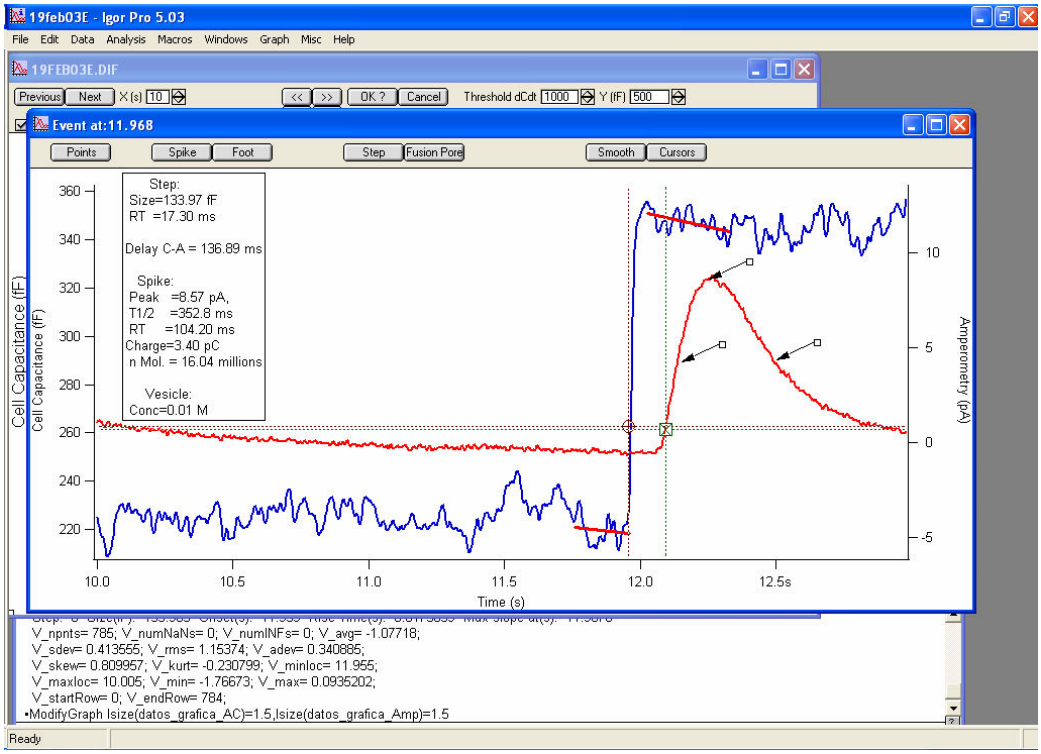

Figura III-26: Ventana de análisis en el que se muestran los parámetros del salto de capacidad seleccionado y la espiga correspondiente: tamaño de salto, tiempo de salto (RT), retraso entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica, altura de la espiga, tiempo a media altura($T_{1/2}$), tiempo en pasar del 10 % al 90 % de la altura (RT), carga, número de moléculas y concentración de secretagogo del grano secretor.

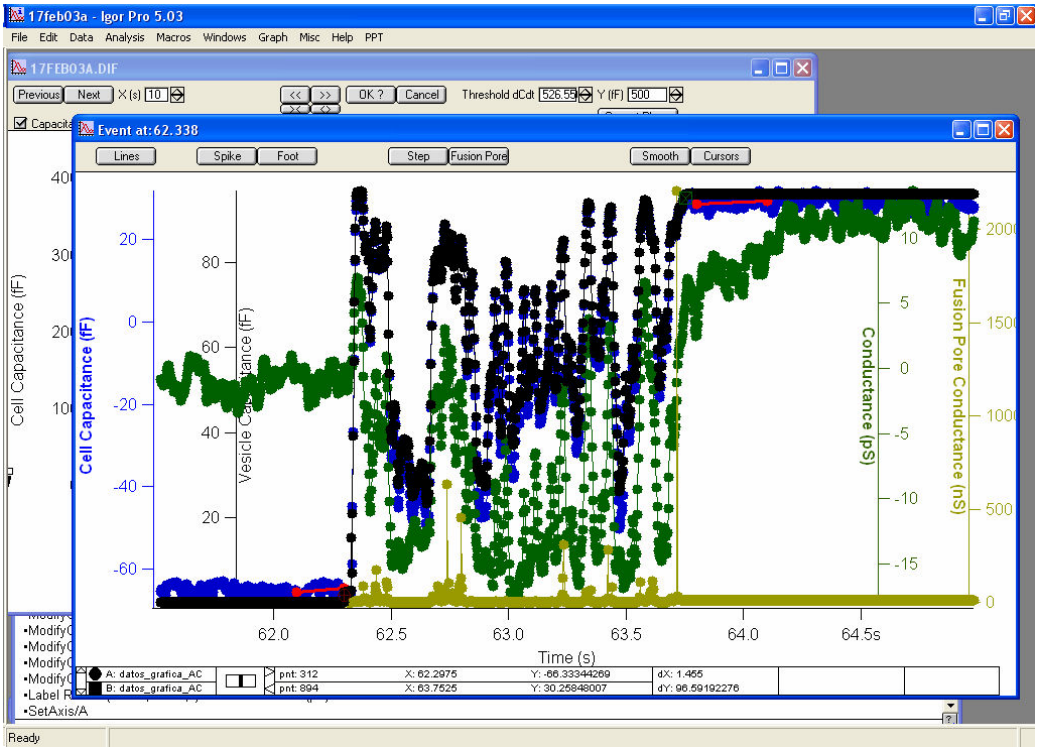

Figura III-27: Pantalla de análisis del poro de fusión. En esta ventana se muestran los trazos de los componentes real e imaginario de la admitancia, de la capacidad de la vesícula y de la conductancia del poro de fusión.

IV. RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA EXOCITOSIS EN MASTOCITOS DE RATONES SIN MATRIZ INTRAVESICULAR

Dilucidar la estructura y función del poro de fusión es un problema científico de primera magnitud, y que sin lugar a duda contribuirá al mejor conocimiento del proceso de la fusión de membranas, no sólo relacionadas con la exocitosis, sino con respecto a todos los procesos de tráfico intracelular. Un primer abordaje que hemos adoptado para el estudio molecular del poro de fusión es el estudio de sus propiedades cinéticas, donde intentaremos establecer patrones o fases que categoricen su estudio. Un punto primordial, asimismo, es la regulación del propio poro de fusión y su regulación por proteínas cuya función hemos estudiado en los distintos protocolos experimentales.

Actualmente se desconoce cómo ocurre el proceso de expansión del poro de fusión. Estudios con micrografías electrónicas muestran la ausencia de estructuras proteicas asociadas a membrana en las ultimas fases de expansión, lo que hace pensar que la energía necesaria para el aumento del tamaño del poro es proporcionada por el hinchamiento de la matriz intravesicular durante el proceso de fusión. Evidencias de que la matriz proporciona energía se basan en los modelos clásicos (Uvnas et al., 1986), donde es la fuerza osmótica generada entre el interior vesicular y el espacio extracelular, la que determina la fuerza necesaria para el proceso de fusión. Posteriormente, las propiedades de intercambio iónico basado en un modelo de Gibbs-Donan explicaban de manera más formal el origen de la energía que da lugar a la expulsión del contenido vesicular durante la exocitosis (Nanavati et al., 1992; Marszalek et al., 1997). Estos modelos condujeron a la hipótesis del "*Jack in the Box*" (el monigote de la caja de sorpresas) que hace saltar al monigote por el resorte determinado por la energía acumulada en el interior de la caja por un resorte. Estos autores proporcionaban las bases, por las que a través de un equilibrio Gibbs-Donnan, se producía la hinchazón de la matriz intravesicular.

El abordaje experimental para nuestro estudio del papel de la matriz intravesicular ha consistido en la medida de la capacidad eléctrica de la membrana y la detección electroquímica de serotonina en mastocitos peritoneales de ratón nulo (*"knock-out"*) del enzima responsable de la síntesis de heparina, la N-deacetil/N-sulfotransferasa 2 (NDST-2) (Forsberg et al., 1999). Estos animales viven con absoluta normalidad, no presentando un fenotipo definido, a excepción de que carecen de gránulos de secreción electron-densos a la microscopía electrónica (Forsberg et al., 1999). Sin la expresión de esta proteína funcional no se sintetiza la heparina, polisacárido sulfatado constituyente principal de la matriz de las vesículas secretoras de los mastocitos

(Tantravahi et al., 1986). La consecuencia de esta mutación es la síntesis de las vesículas secretoras sin matriz intravesicular (Forsberg et al., 1999).

2. EFECTO DE LA AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR DE HEPARINA EN LA DESGRANULACIÓN DE LOS MASTOCITOS

La desgranulación de un mastocito provocada por la diálisis intracelular a través de una pipeta de "*patch-clamp"* con una solución conteniendo GTPγS provoca la exocitosis de los vesículas de secreción, con la consecuente incorporación de la membrana vesicular a la membrana plasmática. La incorporación de la membrana provoca un aumento en la capacidad eléctrica de la célula que puede ser registrada mediante la técnica de "*patch-clamp"* en la configuración de "*whole-cell"*. En la figura IV-1 se muestra un registro de la desgranulación de dos mastocitos, una control y otra procedente de un ratón de la línea NDST-2 carente de matriz intravesicular. La capacidad eléctrica de la célula durante la desgranulación muestra una forma sigmoidal, y como tal, la zona de máximo incremento es la zona intermedia cuyo crecimiento es constante. De los registros de capacidad se obtiene información cuantitativa que nos permite caracterizar la exocitosis. Los parámetros estudiados han sido la capacidad inicial (C_i), indicativa de la superficie de membrana de la célula en reposo, la capacidad final (C_f), obtenida al final del proceso de desgranulación e indicativa de la cantidad de membrana incorporada a la membrana plasmática después de la desgranulación y la primera derivada del registro de capacidad, dC/dt, indicativa de la tasa de secreción a distintos tiempos del proceso de desgranulación. Asimismo hemos cuantificado el tiempo que transcurre desde que se dializa la célula para su desgranulación y el comienzo de la misma (retraso), así como el tiempo que dura el proceso de desgranulación.

Los parámetros medidos en los registros de capacidad procedentes de la desgranulación provocada por GTP-γS en mastocitos de ratones control y de la línea de ratones mutantes NDST-2 se detallan en la figura IV-1.

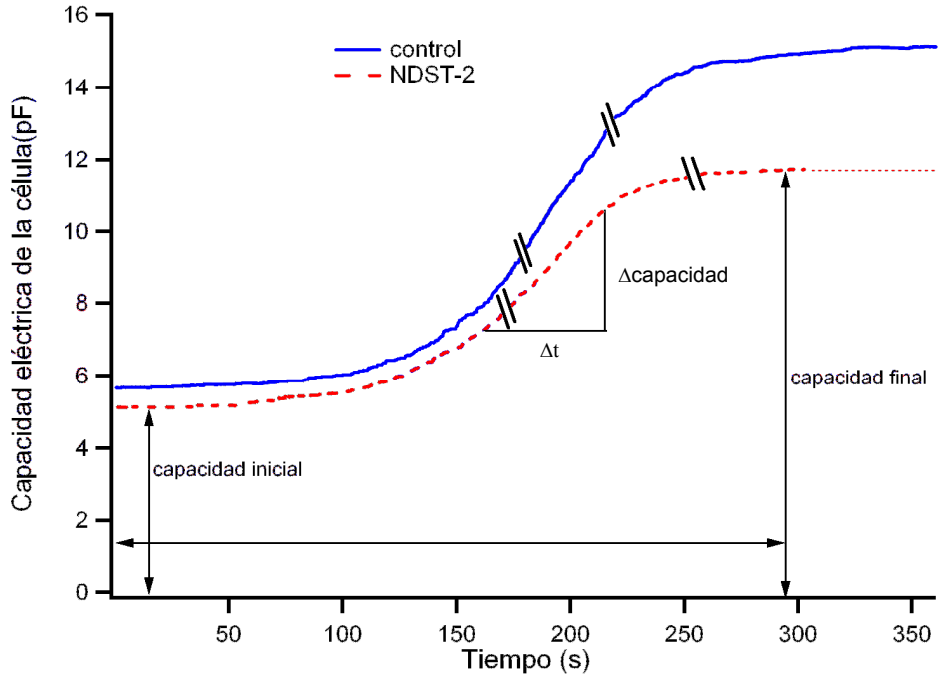

Figura IV-1: Ejemplo de desgranulación de dos mastocitos, uno de un ratón control y otro de un ratón de la línea NDST-2. Se detallan los parámetros utilizados para cuantificar la desgranulación: capacidad inicial de la célula, capacidad final de la célula, tiempo de desgranulación y tasa de desgranulación de la zona de incremento constante de la desgranulación (Δcapacidad/Δt).

2.1. Incremento de la capacidad tras la desgranulación

Como se puede apreciar en la figura IV-2, la capacidad inicial en ambas líneas de ratones es similar (5.85 ± 1.53 pF en los controles y 4.88 ± 0.98 pF los NDST-2, media ± d.e.). Estos datos no reflejan diferencias significativas, indicando que la ausencia de heparina no afecta al tamaño de los mastocitos antes de la desgranulación. Este hecho es muy significativo, pues otros tipos celulares presentes en los lavados peritoneales (linfocitos o neutrófilos) suelen tener valores de capacidades iniciales inferiores (Hartmann and Lindau, 1995; Lollike and Lindau, 1999). La capacidad final medida tras la desgranulación si presenta diferencias entre ambas líneas de ratones (12.80 ± 2.84 pF en los controles y 8.28 ± 2.05 pF en los mutantes, media ± d.e). El tamaño alcanzado por los mastocitos control es superior al de las células carentes de matriz. En los controles el incremento de capacidad es de 218 % mientras que en los mutantes es de 169 %.

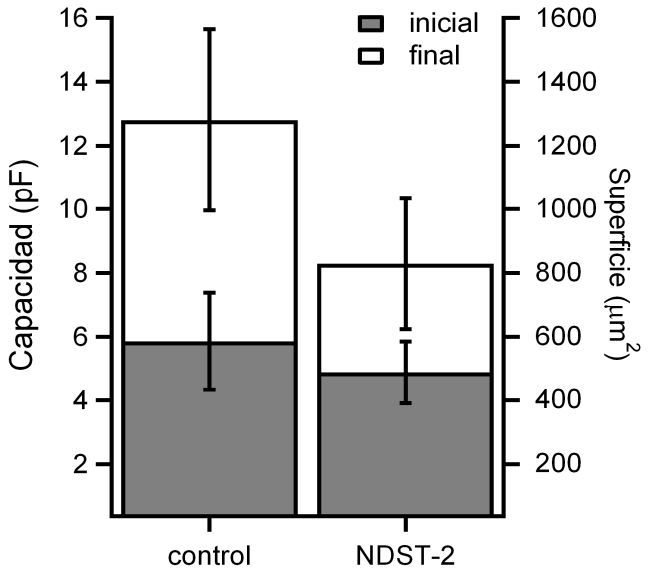

Figura IV-2: Valores de capacidad antes y después de la desgranulación provocada por GTP-γS en mastocitos de ratones control y ratones NDST-2. (control n= 5, NDST-2 n=12).

Para conocer si el incremento de capacidad por la desgranulación está alterado en el caso de la inexistencia de matriz intravesicular se calculan los incrementos de capacidad causados por la desgranulación de los mastocitos de las líneas de ratones estudiadas. Los datos obtenidos se presentan en la figura IV-3. El incremento medio de capacidad tras la desgranulación provocada por GTPγS aplicado en el interior de la pipeta de registro es de 6.95 ± 2.06 pF en el caso de los mastocitos control y de 3.51 ± 1.96 pF en las mutantes (media ± d.e). La diferencia entre los dos tipos de mastocitos es estadísticamente significativa, lo que demuestra que la cantidad de membrana incorporada por la exocitosis es menor en ausencia de matriz intravesicular.

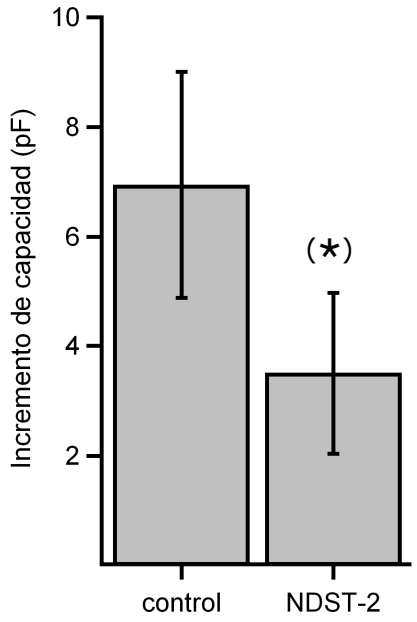

Figura IV-3: Incrementos de capacidad causados por la desgranulación en mastocitos control y de ratón NDST-2. Existe diferencia significativa entre ambas líneas de ratones. (control n = 5, NDST-2 n=12).

La técnica de la medida de la capacidad eléctrica de la membrana resuelve la fusión de vesículas individuales, lo que permite profundizar en las causas de las diferencias observadas en cuanto al aumento del tamaño de los mastocitos tras la desgranulación. Por ejemplo, ¿se debe el menor aumento a la presencia de menor número de vesículas en el ratón mutante de heparina, o las vesículas secretoras de los mastocitos del ratón NDST son de menor tamaño? Este punto se mostrará más adelante al realizar el análisis de eventos únicos de secreción. Asimismo, hemos medido la tasa de desgranulación y los tiempos empleados durante dicho proceso.

2.2. Tasa de desgranulación

El registro de la capacidad durante la desgranulación de mastocitos NDST-2 permite el estudio de las propiedades de la exocitosis en ausencia de matriz intravesicular. Si representamos la desgranulación completa de los mastocitos se puede observar que la cinética de la misma presenta diferencias entre los mastocitos control y las procedentes del ratón NDST-2 (fig. IV-1).

En el ejemplo mostrado en la figura IV-1 se aprecian tanto las diferencias en la tasa de desgranulación como en la duración de la desgranulación. En la figura IV-4 se representa la tasa de desgranulación media de mastocitos control y de ratones NDST-2. La tasa del incremento de capacidad es menor en el mutante (44.78 ± 15.58 fF/s, media ± d.e.) que en el control (76.83 ± 14.82 fF/s, media ± d.e.). Estos datos confirman que la tasa de exocitosis en ausencia de matriz intravesicular es menor que en los mastocitos de ratones control.

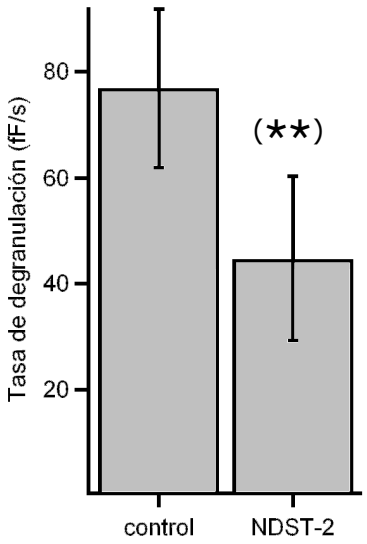

Fig. IV-4: Tasa de desgranulación en mastocitos de ratones control y de ratones NDST-2. Se puede apreciar que la tasa de desgranulación es mayor en las células cebadas control que en las células cebadas carentes de heparina (control n= 5, NDST-2 n=12).

Sin embargo cuando se realiza un estudio comparativo al normalizar los registros en los dos tipos celulares, no aparecen diferencias significativas en la tasa de desgranulación (fig. IV-5). Este dato sugiere que el menor incremento de la tasa de desgranulación en mastocitos carentes de heparina, se debe a la menor cantidad de membrana que poseen estos mastocitos en el interior celular y no a una cinética diferente del proceso de desgranulación. Este dato es muy importante pues sugiere que la maquinaria secretora en el mastocito carente heparina está intacta, siendo la liberación de serotonina, como era de esperar, la que se encuentra afectada.

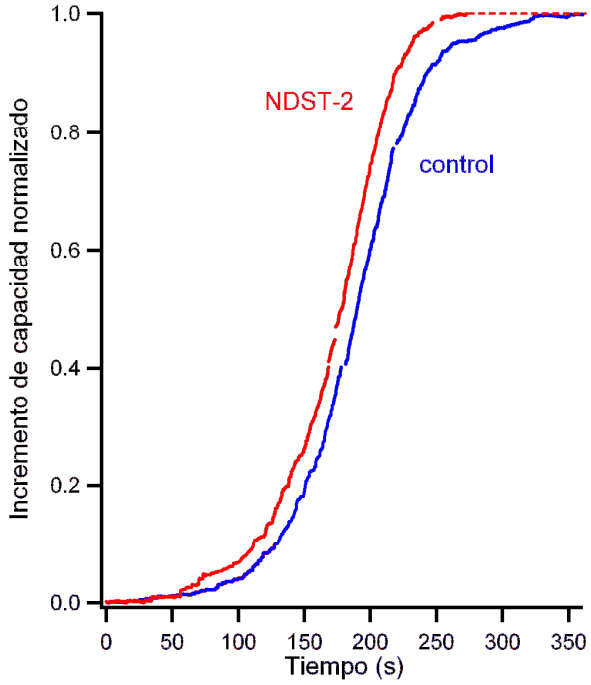

Figura IV-5: Ejemplo de registros normalizados de la capacidad de membrana durante la desgranulación completa de mastocitos control y de mastocitos de la línea de ratones NDST-2. Puede comprobarse que la tasa de desgranulación tras la normalización es similar en ambos tipos de células.

2.3. Tiempo de desgranulación

La cuantificación del tiempo empleado en la desgranulación completa de mastocitos provocada por GTPγS se muestra en la figura IV-6. Este tiempo en los mastocitos de ratones control es de 305 ± 30 segundos y de 258 ± 103 segundos en los mutantes NDST-2 (media ± d.e.). La diferencia observada en las dos líneas de ratones no es estadísticamente significativa. Adicionalmente a la duración de la desgranulación, los tiempos de activación del proceso de exocitosis una vez realizada la diálisis del citosol a través de la pipeta de "*patch-clamp*", no están afectados. Estos datos muestran que la diferencia observada en la amplitud de la desgranulación se debe a una menor tasa de desgranulación y no a un tiempo de desgranulación menor. La

ausencia de matriz provoca, por lo tanto, que la velocidad de incorporación de membrana por exocitosis sea menor, pero debido a que se parte con una cantidad de membrana disminuida y no a que la cinética del proceso en sí sea distinta.

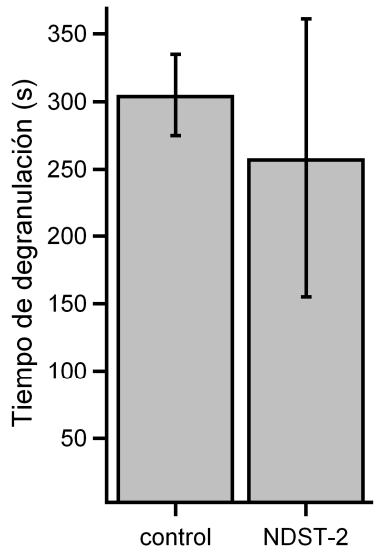

Fig. IV-6: Tiempo de desgranulación provocada por GTPγS de mastocitos peritoneales de ratones control y ratones de la línea NDST-2. No existen diferencias apreciables entre ambos tiempos. (control n= 5, NDST-2 n=12).

Estos hallazgos, en su conjunto, apuntan a que la maquinaria secretora del ratón carente de heparina no está alterada, por lo que el proceso de fusión de membranas que se activa durante la exocitosis ni la cinética con la que ésta se produce después de su activación están afectadas.

2.4. Tamaño de las vesículas secretoras

La diferencia hallada en la tasa de desgranulación entre los mastocitos control y NDST-2 puede estar causada por la disponibilidad de un menor número de vesículas secretoras, por tener estos un tamaño menor o por ambas causas. La resolución de la técnica de la medida de la capacidad permite resolver eventos individuales de fusión, de donde se puede obtener el tamaño de las vesículas secretoras (fig. IV-7).

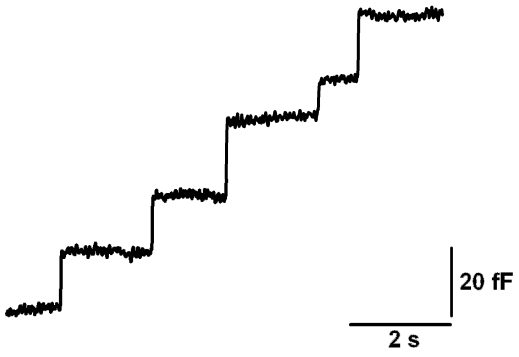

Figura IV-7: Detalle de un fragmento de registro de capacidad durante la desgranulación de un mastocito carente de matriz intravesicular obtenido de un ratón de la línea NDST-2. En el registro se pueden distinguir perfectamente las fusiones individuales de vesículas secretoras.

El tamaño de las vesículas secretoras se ajusta a una distribución normal, a partir de la cual se puede estimar la media de la distribución de tamaños de los saltos de capacidad (fig. IV-8). En los ratones control este es de 16.57 ± 8.43 fF y de 8.96 ± 3.95 fF en los mastocitos de ratones de la línea NDST-2 (media ± d.e). Sus equivalentes en superficie son 1.6 ± 0.8 μm^2 y 0.9 ± 0.4 μm^2 respectivamente (media ± d.e).

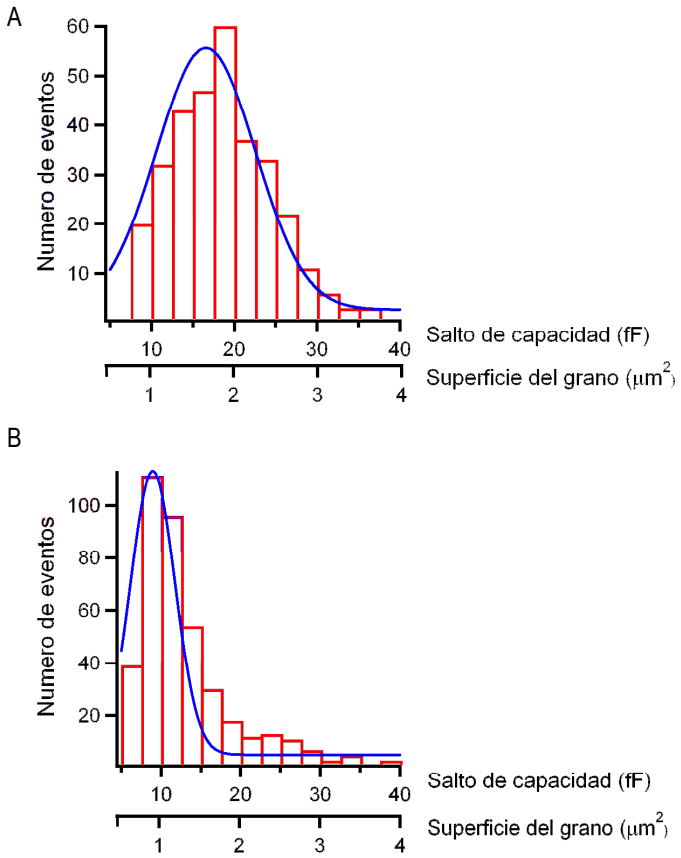

Figura IV-8 : Histogramas de frecuencias del tamaño del salto y superficie de la vesícula en mastocitos control (A) y de mastocitos procedentes de la línea de ratones NDST-2 (B). Las distribuciones son estadísticamente diferentes con $p < 0.001$. (control n = 320 , NDST-2 n = 413).

El volumen de las vesículas secretoras de mastocitos calculados a partir de los datos del registro de capacidad muestra una distribución normal (fig. IV-9). En esta distribución, la media del volumen de las vesículas secretoras de los mastocitos control es 198.96 $\pm$ 7.34 attolitros ($\bar{x}$ $\pm$ d.e.). En el ratón mutante la media es de 82.25 $\pm$ 2.57 attolitros ($\bar{x}$ $\pm$ d.e.).

Según estos datos, la disminución del tamaño de las vesículas secretoras de los mutantes NDST-2 en comparación con las de los ratones control puede ser la causa de la variación del incremento de superficie tras la activación de la exocitosis entre los mastocitos control y los NDST-2. Para confirmarlo, a partir del incremento de capacidad medio y del tamaño de vesícula secretora media se puede estimar el número medio de vesículas fusionadas en cada evento de desgranulación. En el control hay una media de 419 vesículas secretoras habiendo en el mutante NDST-2 391 vesículas. Por lo tanto, no existe un mayor número de vesículas secretoras que compense el menor tamaño de éstas en el mutante NDST-2.

Estos datos justifican la diferencia en el incremento de capacidad entre los ratones carentes de heparina y los controles, sugiriendo fuertemente que la matriz de heparina contribuye al normal crecimiento de membranas vesiculares durante la síntesis de las vesículas secretoras.

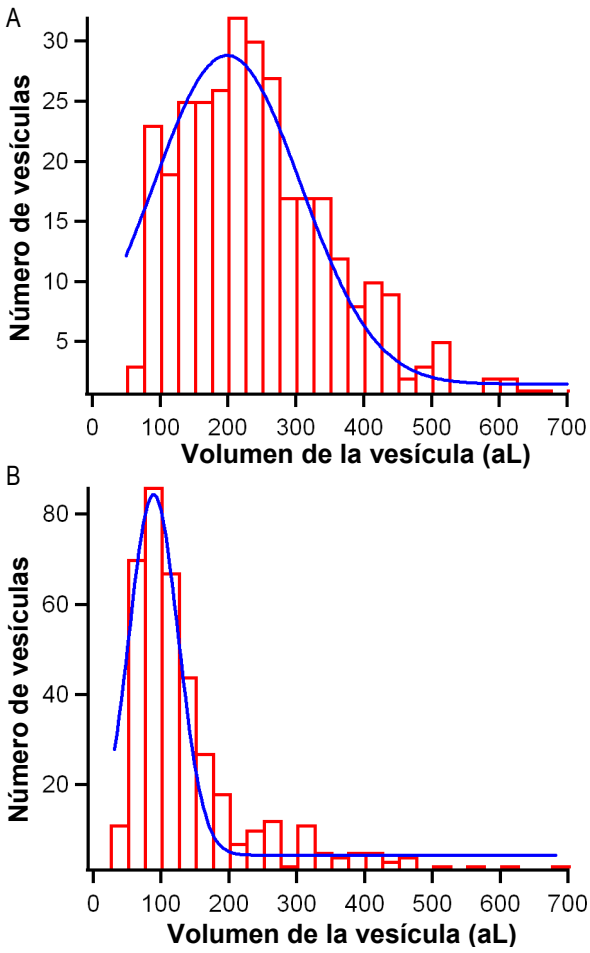

Figura IV-9: Histogramas del volumen de las vesículas secretoras de mastocitos procedentes de ratones control (A) y mutantes NDST-2 (B). El ajuste a una distribución normal muestra el menor tamaño de los granos en los mutantes y una dispersión menor que en el control. La diferencia entre las medias es estadisticamente significativa ($p < 0.001$). (control n = 320, NDST-2 n = 413).

3. EFECTO DE AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR DE HEPARINA EN LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN DE LOS MASTOCITOS

Para estudiar con mayor detalle las características de la fusión de vesículas secretoras y la liberación de serotonina al espacio extracelular, hemos realizado registros simultáneos de capacidad y amperometría en mastocitos de ratones control y de ratones mutantes para el gen NDST-2. Este abordaje experimental permite una discriminación muy fina del proceso secretor y permite cuantificar numerosos parámetros de la fusión de vesículas únicas.

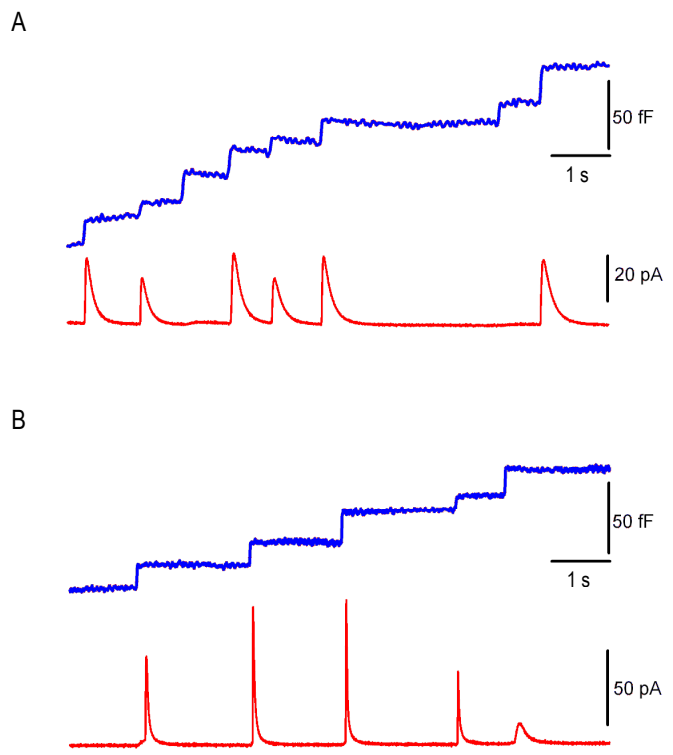

Figura IV-10: Detalle de registros simultáneos de capacidad y amperometría mostrando las diferencias entre las espigas amperométricas de un ratón control (A) y un raton mutante NDST-2 (B). La altura y la anchura a media altura son claramente diferentes, indicando una liberación más rápida de serotonina en el caso del ratón mutante.

En la figura IV-10 se muestran dos registros combinados de capacidad y amperometría en un ratón control y otro mutante de heparina. Se observa que en ambas condiciones experimentales, al igual que se ha mostrado anteriormente en el registro macroscópico del incremento de capacidad, se produce la fusión de vesículas únicas. La fusión de una vesícula única se observa como un incremento discreto en la señal de capacidad (salto de capacidad), la cual se acompaña en todos los casos de una espiga de corriente amperométrica, indicando la liberación de serotonina al espacio extracelular. El análisis de los eventos de amperometría da una idea de la cinética de liberación de la serotonina. Por ejemplo, a simple vista, se observa que las espigas amperométricas de mastocitos control, poseen una mayor duración que las espigas amperométricas de mastocitos procedentes del ratón carente de heparina.

A continuación se detalla el análisis de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas en mastocitos control y los carentes de matriz intravesicular procedentes de la línea de ratones mutantes NDST-2.

3.1. Amplitud de las espigas amperométricas

La figura IV-11 muestra un histograma de frecuencias de la amplitud de la espigas amperométricas. La distribución muestra un sesgo a la izquierda, con una media en la distribución de amplitudes de 26.05 pA en los mastocitos control. El rango de las amplitudes fue de 177.02 a 1.64 pA. Los mastocitos del ratón nulo de NDST-2 tuvieron una amplitud media de 51.63 pA con valores que van desde los 350.71 a 2.43 pA.

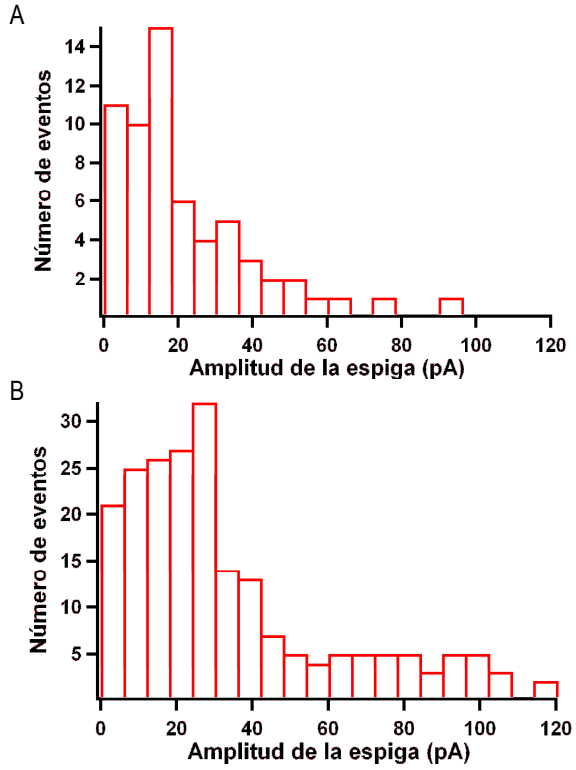

Figura IV-11: Histograma de frecuencias de la amplitud de la espiga en ratones control (A) y ratones de la línea NDST-2 (B). La distribución presenta una media mayor en el caso del ratón carente de matriz intravesicular ($p < 0.001$) (control n = 58 espigas, NDST-2 n = 245 espigas).

Estos datos sugieren que el valor de pico de las espigas amperométricas está aumentado en los ratones carentes de heparina con relación a los control, sugiriendo que la serotonina llega al espacio extracelular de una forma más rápida que en los ratones control. Hay que tener en cuenta que las vesículas de las que se obtienen espigas amperométricas proceden de toda la superficie celular, y que por tanto, existe un componente difusional de las moléculas de serotonina en función de la distancia que tienen que desplazarse por difusión desde que son depositadas en el medio hasta alcanzar el detector amperométrico. Así pues, espigas con un amplitud pequeña pueden corresponder en gran medida a eventos de exocitosis que han

ocurrido en el polo opuesto del mastocito respecto del detector electroquímico. Por tanto, no es de extrañar que existan tanto en la distribución de ratones control como en los ratones mutantes un elevado porcentaje de eventos con pequeñas amplitudes de las espigas. Si es más manifiesto que el pico de la distribución, además de lo reflejado por la media indicada con anterioridad, esté desplazado en los mastocitos carentes de heparina. Asimismo, se podemos ver cómo los eventos de máxima amplitud de espiga se detectan en los mastocitos carentes de heparina.

Estos datos, comienzan a revelar características distintivas de la secreción en mastocitos carentes de heparina. A continuación, se muestra la comparación de parámetros cinéticos adicionales como son la anchura media y el tiempo al pico de las espigas amperométricas.

3.2. Anchura a media altura de las espigas amperométricas

La anchura media de las espigas amperométricas es menor en los mastocitos mutantes, cuando las vesículas secretoras carecen de matriz intravesicular. La media en el caso del ratón control es de 91 ± 8 ms (media ± e.e.). En el ratón NDST-2 la anchura a media altura es aproximadamente la mitad e igual a 53 ± 3 ms (media ± e.e.). En la figura IV-12 se muestra la distribución de la anchura a media altura de ambos tipos de mastocitos.

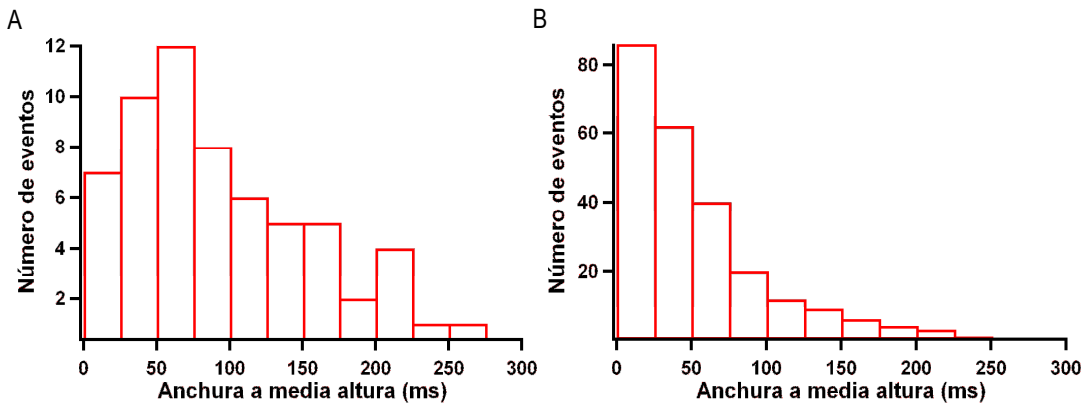

Figura IV-12: Histogramas de frecuencias de la anchura a media altura de las espigas amperométricas obtenidas por la detección de serotonina en células cebadas de ratones control (A) y de la línea NDST-2 (B). ($p < 0.001$) (control n = 58 espigas, NDST-2 n = 245 espigas).

Este parámetro cinético, junto al descrito en el apartado anterior, indica que la serotonina alcanza el espacio extracelular en mastocitos carentes de heparina de manera más instantánea, o pulsátil, que en los mastocitos controles. Como puede observarse, la distribución de anchuras

medias posee un rango similar: de 4.8 a 261.8 ms en el control y de 3.9 a 230.8 ms en los mutantes.

La amplitud de este rango es debido a la difusión, siendo los eventos de exocitosis más próximos al detector los que se ven más afectados en el ratón mutante. Las diferencias se enmascaran en anchuras por encima de 150 ms, debido a que es el proceso de difusión el paso limitante principal en la detección electroquímica. Profundizar en los mecanismos que subyacen a esta respuesta diferencial es un objetivo fundamental en este trabajo.

3.3. Tiempo al pico de espigas amperométricas

Un factor importante que determina las etapas iniciales de la apertura del poro de fusión, es la determinación del tiempo al pico de las espigas. En ratones controles es de 18 $\pm$ 2 ms , frente a los 15 $\pm$ 1 ms (media $\pm$ e.e) de los mastocitos procedentes de los ratones NDST-2 (fig. IV-13). Como más adelante comentaremos, el tiempo al pico se ve afectado, al igual que la anchura media, por la distancia entre el detector electroquímico y el lugar donde se produce la exocitosis sobre la superficie celular. Así pues, eventos que se producen en el polo opuesto a donde reside el detector, poseen tiempos al pico largos, y determinados fundamentalmente por el proceso de difusión de las moléculas de serotonina. Sin embargo, las espigas que poseen tiempos al pico más cortos, corresponden a eventos de exocitosis más próximos al detector. Es por ello que, aunque en el histograma existe una dispersión amplia y existen eventos en todo el rango, son aquéllos eventos con menor tiempo al pico los más significativos al no estar influenciados por la difusión y donde se observan las diferencias más notables entre ambos tipos de mastocitos.

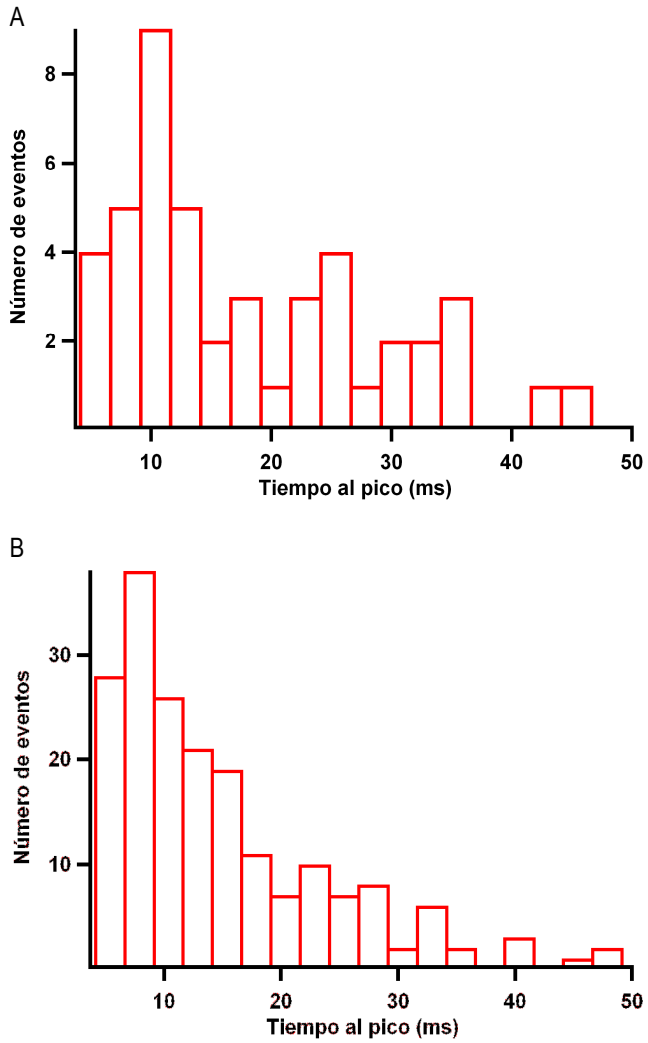

Figura IV-13: Histogramas de frecuencias del tiempo al pico de las espigas amperométricas obtenidas por la detección de serotonina en células cebadas de ratones control (A) y de la línea NDST-2 (B). Las distribuciones son significativamente distintas con $p < 0.001$. (control n = 58 espigas, NDST-2 n = 245 espigas).

3.4. Carga de las espigas amperométricas

La carga de las espigas amperométricas viene determinada por el número de moléculas de serotonina secretadas. La media de la distribución de carga de las espigas de ratones control y ratones NDST-2 es de 1.51 ± 0.08 pC en los primeros y de 0.70 ± 0.30 pC en los últimos (fig. IV-14). Al igual que ocurría con los parámetros de amplitud y anchura de las espigas amperométricas, la distancia entre el lugar donde ocurre el evento secretor y el detector es determinante para la estimación de la carga. Los eventos más alejados presentarán una carga menor debido a moléculas que no llegarán a ser detectadas. Nuevamente, los eventos más cercanos y por lo tanto, con más carga, son los que mejor muestran las diferencias entre los dos tipos de mastocitos estudiados.

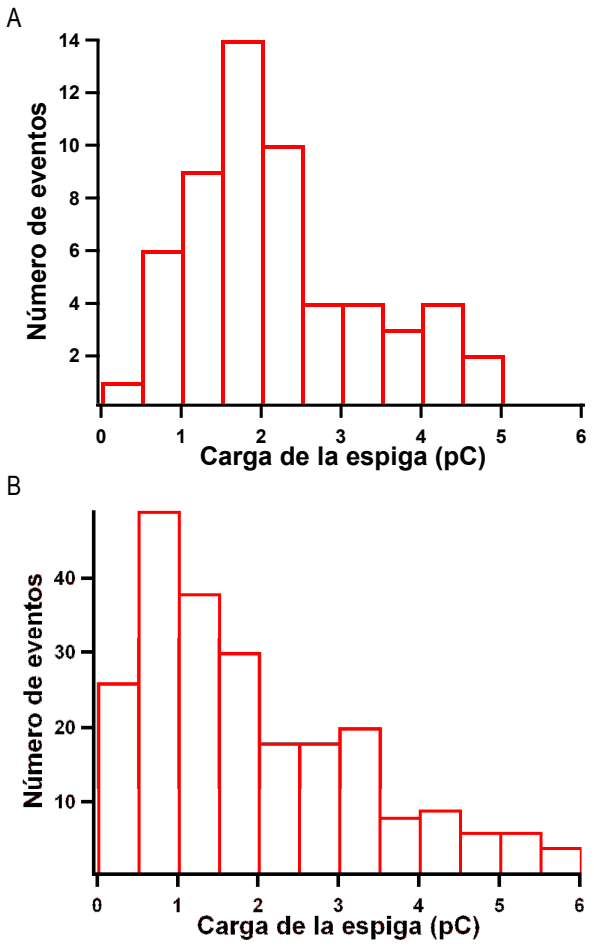

Figura IV-14: Histogramas de frecuencias de la carga de las espigas registradas en ratones control (A) y ratones de la línea NDST-2 (B). El análisis estadístico permite diferenciar las dos distribuciones con $p < 0.05$. (control n = 58 espigas, NDST-2 n = 245 espigas).

En la tabla IV-1 se muestra un resumen de los valores medios de los parámetros estudiados de las espigas amperométricas generadas por la liberación de serotonina en mastocitos con y sin matriz intravesicular. Las variaciones en la altura y en la anchura a media altura muestran una tasa de liberación de serotonina mayor en ausencia de matriz intravesicular. El tiempo al pico también es ligeramente inferior en el caso del mutante NDST-2, lo que confirma una liberación más rápida en el caso del mutante NDST-2 que en el control.

Por otro lado, la carga de las espigas amperométricas es el doble en los mastocitos de ratones control que en el mutante NDST-2. En este caso es necesaria la información que proporciona el registro de capacidad para buscar una explicación a esta variación.

Tabla IV-1: comparación de parámetros de espigas amperométricas entre ratones control y ratones NDST-2 (media ± e.e.). (control n = 58 espigas, NDST-2 n = 245 espigas).

	Altura (pA)	**Anchura a media altura (ms)**	**Tiempo al pico (ms)**	**Carga (pC)**
Control	26.05 ± 3.26	91 ± 8	18 ± 2	1.51 ± 0.08
NDST-2	51.63 ± 6.50 (★★★)	53 ± 3 (★★★)	15 ± 1 (★★★)	0.70 ± 0.30 (★)

4. CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA EN EL INTERIOR DE LAS VESÍCULAS SECRETORAS

La información que proporcionan los registros simultáneos de capacidad y amperometría permiten estimar la concentración de serotonina en el interior de los gránulos. A partir de la corriente amperométrica se calcula el número de moléculas de serotonina que han sido liberadas y detectadas. El registro de capacidad permite conocer el volumen de la las vesícula secretora. En la figura IV-15 se muestra la distribución de la concentración de las vesículas secretoras en los mastocitos registrados.

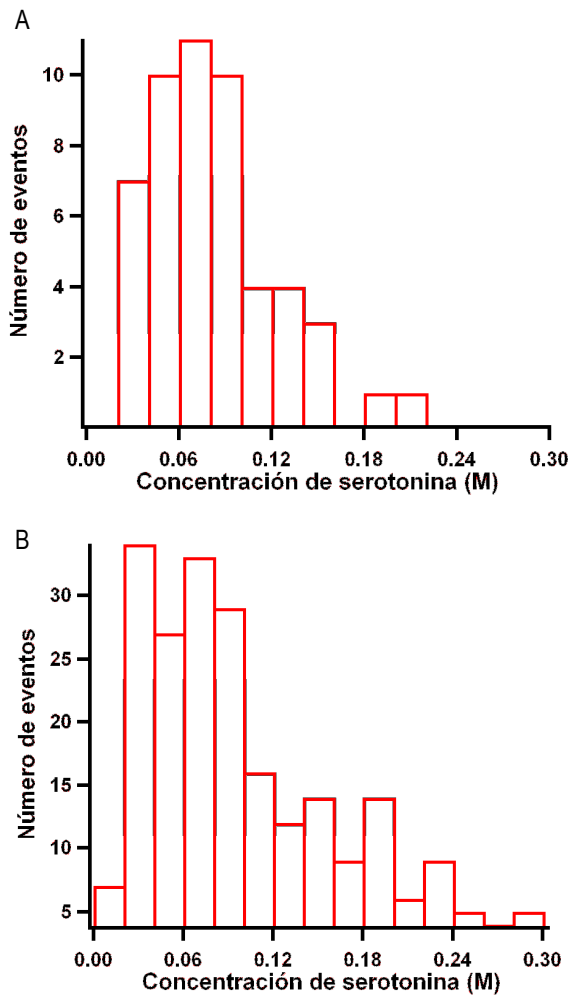

Figura IV-15: Histogramas de frecuencias de la concentración de serotonina de las vesículas secretoras de mastocitos en ratones control (A) y carentes de matriz intravesicular (B). La diferencia entre las dos distribuciones es estadisticamente significativa con $p < 0.05$. (control n = 51 eventos, NDST-2 n = 237 eventos).

La concentración de serotonina en las vesículas secretoras de los mastocitos con matriz intravesicular es de 0.12 ± 0.09 M y de 0.08 ± 0.04 M en las vesículas carentes de matriz de heparina ($\bar{x}$ ± d.e.). La diferencia en la capacidad de almacenaje de serotonina entre los mastocitos control y las carentes de matriz intravesicular es coherente con la disminución de la concentración de proteasas específicas presente en las vesículas secretoras en estas últimas

(Humphries et al., 1999). Los datos obtenidos confirman una de las funciones que le habían sido atribuidas a la matriz intravesicular. Según estos datos, la ausencia de matriz intravesicular en las vesículas secretoras de los mastocitos provoca que la capacidad de almacenaje de serotonina esté disminuida respecto a los mastocitos capaces de sintetizar heparina.

5. ESTUDIO DEL PORO DE FUSIÓN EXOCITÓTICO EN MASTOCITOS CARENTES DE MATRIZ INTRAVESICULAR

La forma más directa de estudiar la cinética del poro de fusión consiste en la medida de su conductancia a partir del análisis de la admitancia de los registros de capacidad eléctrica de la membrana con la técnica de "*patch-clamp*". La máxima conductancia medible mediante esta técnica depende del tamaño de la vesícula secretora según la ecuación:

$$\frac{\mathrm{Im}}{\mathrm{Re}} = \frac{G_P}{\omega C_g} \Rightarrow G_P = \frac{\mathrm{Im}}{\mathrm{Re}} \cdot \omega \cdot C_g$$

Es por ello que para el estudio de la cinética del poro de fusión se recurre a tipos celulares que posean una vesícula secretora del mayor tamaño posible, lo que permite una mayor resolución en los valores de poros de fusión medidos con la técnica utilizada. Otra forma de incrementar la resolución del sistema de cálculo del poro de fusión es mediante el incremento en la frecuencia de la sinusoide de voltaje aplicado. Sin embargo, el incremento de la frecuencia hace que disminuya la relación señal-ruido en los registros de capacidad.

Como se ha visto en apartados anteriores, el tamaño medio de las vesículas secretoras en un ratón control es de 16.57 fF, lo que no permitiría valores de conductancia superiores a varias decenas de nanosiemens (nS). Como alternativa, los registros combinados de capacidad y amperometría permiten el estudio de la cinética del poro de fusión de forma indirecta. A continuación se comentan los parámetros que se utilizan con este fin y los resultados así obtenidos.

5.1. Retraso entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica

Los registros simultáneos de capacidad y amperometría permiten el estudio de otros factores implicados en el proceso secretor. La medida del tiempo de retraso entre el salto de capacidad y el comienzo de la espiga amperométrica es un parámetro que estima la duración de la fase de expansión del poro de fusión en los casos que no es posible la medida directa de su conductancia. La comparación de los datos obtenidos del retraso entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica en las líneas de ratones control y carentes de matriz intravesicular se muestra en la figura IV-16.

El retraso entre el salto de capacidad y la espiga amperométrica en los ratones control es de 37 ± 3 ms y de 38 ± 3 ms en la línea NDST-2 (media ± e.e.). La similitud del parámetro entre ambas líneas de ratones demuestra que la cinética del poro de fusión no está afectada por la ausencia de la matriz intravesicular. Este resultado apoya la independencia de la fase de expansión del poro de fusión de la matriz intravesicular en las etapas iniciales de su expansión.

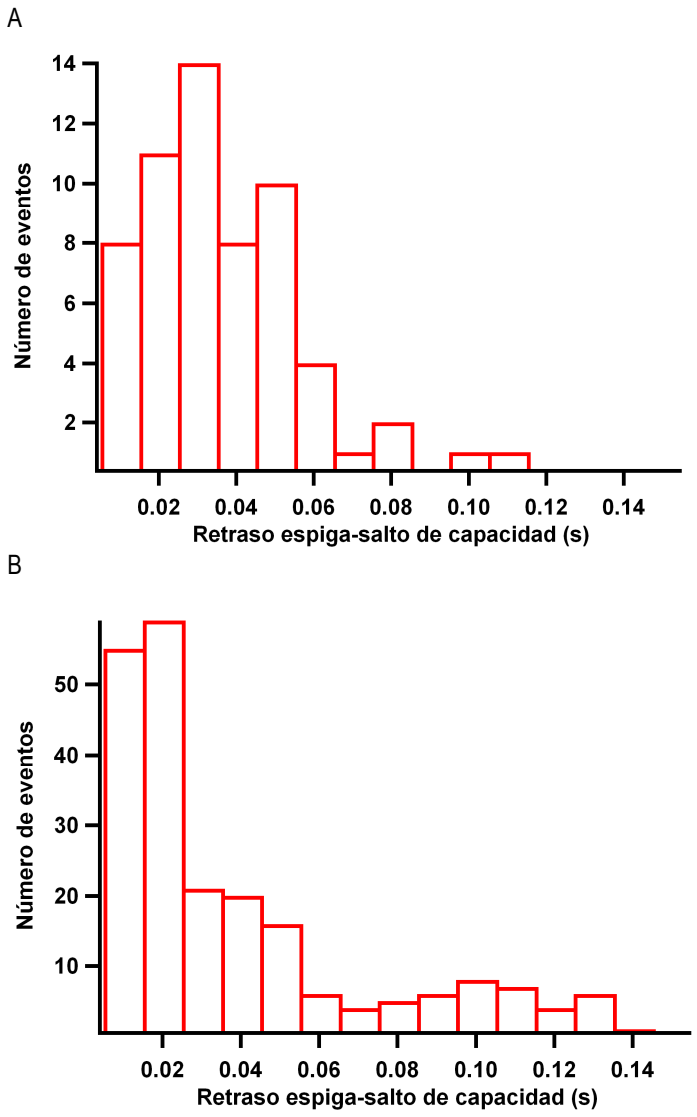

Figura IV-16: Histogramas de frecuencias del retraso entre la espiga y el salto de capacidad de los registros simultáneos de capacidad y amperometría. No existen diferencias significativas entre los mastocitos de ratones control (A) y de ratones de la línea NDST-2 (B).(control n = 60 eventos, NDST-2 n = 218 eventos)

5.2. Estudio de los pies amperométricos

Los pies amperométricos se deben a la liberación lenta e incompleta de las moléculas de serotonina desde el interior de la vesícula secretora. Es aceptado que la mayor parte de la serotonina se encuentra unida a la matriz intravesicular de heparina, pero durante la fusión de membranas las moléculas que se encuentran libres en el interior de la vesícula secretora son las

que primero se liberan y dan lugar al pie amperométrico. A continuación, al ponerse en contacto el medio extracelular con el interior de la vesícula se produce un intercambio iónico entre la matriz y la solución extracelular. Este proceso provoca el hinchamiento ("*swelling*") de la matriz y la disociación de las moléculas de serotonina que son intercambiadas por cationes monovalentes de la solución extracelular (Marszalek et al., 1997).

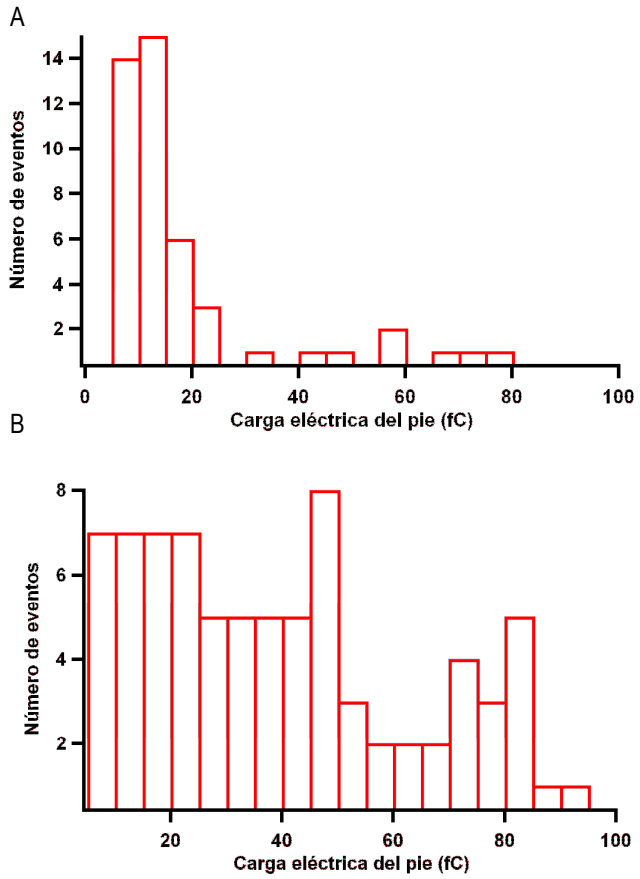

Figura IV-17: Histogramas de frecuencias de la carga de los pies amperométricos de células cebadas de ratones control (A) y ratones de la línea NDST-2 (B). Las diferencias son significativas con $p < 0.001$. ($n = 47$, NDST-2 $n = 106$)

Las moléculas que forman el pie amperométrico tienen que atravesar el poro de fusión en sus primeras fases de formación. Como se ha comprobado en mastocitos (Alvarez de Toledo et al., 1993) y en células cromafines (Tabares et al., 2003), existe una correlación entre la conductancia del poro de fusión y el pie amperométrico. El estudio de las características de los pies amperométricos nos permite estimar las propiedades del poro de fusión de forma indirecta. Los parámetros estudiados se han descrito anteriormente en la figura III-15. A continuación se detallan los resultados de este análisis comparativo entre los pies amperométricos de los mastocitos control y los carentes de heparina.

La carga del pie amperométrico de los mastocitos de los ratones controles y ratones carentes de matriz intravesicular se muestra en la figura IV-17. Las células control poseen unos valores de carga de 20 ± 3 fC y en el mutante carente de heparina de 89 ± 9 fC (media ± e.e.).

El estudio de la cinética de los pies amperométricos está basado en los parámetros de duración y amplitud como se explica en el apartado de materiales y métodos (fig. III-15). Los valores obtenidos de estos parámetros se muestran en las figuras IV-18 y IV-19.

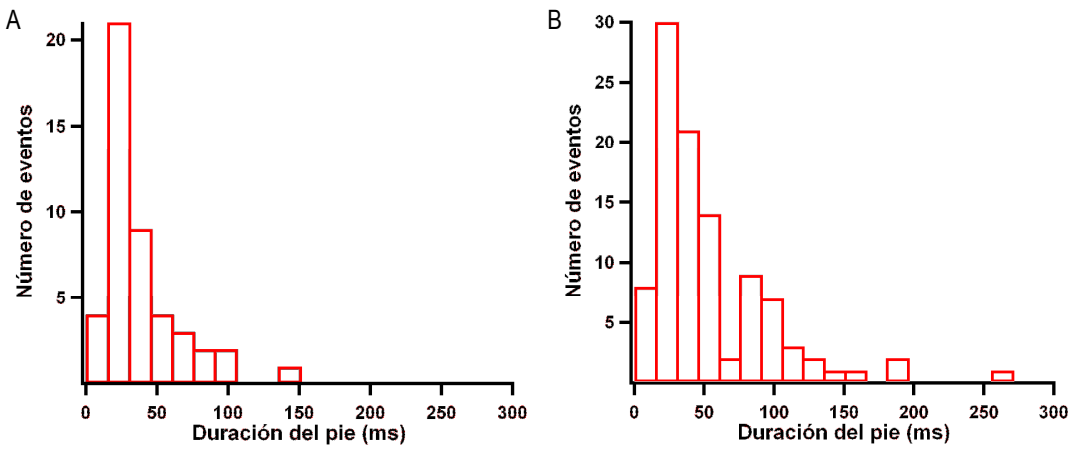

Figura IV-18: Histogramas de frecuencias de la duración de los pies amperométricos de los ratones control (A) y mutantes NDST-2 (B). No existen diferencias estadísticas significativas entre los dos conjuntos de datos. (control n = 47, NDST-2 n = 106)

La duración de los pies amperométricos en los ratones control es de 44 ± 6 ms frente a los 65 ± 6 ms de los ratones NDST-2 (media ± e.e.). Es importante destacar que la diferencia en la duración de los pies amperométricos registrados entre los dos tipos de mastocitos no es estadísticamente significativa.

Las diferencias en la amplitud máxima alcanzada de los pies entre ambas líneas de ratones se muestra en la figura IV-19. La media obtenida de la amplitud máxima de los pies amperométricos es 1.50 ± 0.12 pA en el ratón control y 2.47 ± 0.18 pA en el ratón NDST-2 (media ± e.e.).

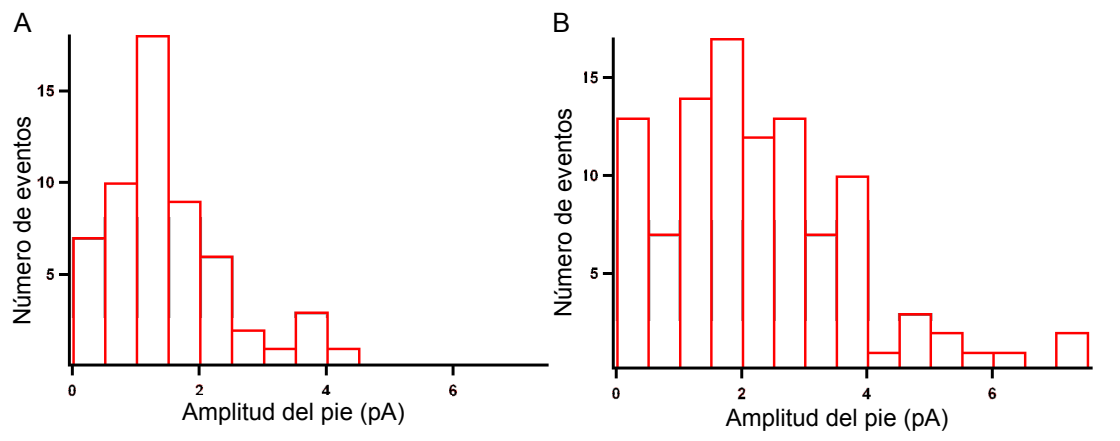

Figura IV-19: Histogramas de frecuencias de la amplitud de los pies amperométricos en ratones control (A) y ratones de la linea NDST-2 carentes de matriz intravesicular (B).

En la tabla IV-2 se muestra un resumen de los valores obtenidos de cada uno de los parámetros del pie amperométrico que se han estudiado.

Tabla IV-2: comparación de parámetros de los pies amperométricos entre ratones control y ratones NDST-2 (media ± e.e.) (control n = 47 , NDST-2 n = 106)

	Amplitud (pA)	Duración (ms)	Carga (fC)
Control	1.50 ± 0.12	44 ± 6	20 ± 3
NDST-2	2.47 ± 0.18 (★★★)	65 ± 6	89 ± 9 (★★★)

El aumento en la amplitud de los pies amperométricos analizados de los ratones NDST-2 respecto a los controles explica el aumento de carga observado en el caso de ausencia de matriz intravesicular. Una mayor carga implica un mayor número de moléculas de serotonina liberadas durante el pie, lo que apunta a una mayor disponibilidad de moléculas de serotonina libres en disolución durante la primera parte de la fusión de membranas. El aumento del número de moléculas de serotonina libres en disolución en el interior del grano secretor sería causa de la inexistencia de matriz intravesicular.

La mayor amplitud de los pies amperométricos en los mastocitos NDST-2 puede explicarse como un mayor tamaño del poro de fusión que presenta un impedimento menor al paso de moléculas de serotonina. Otra posible explicación es que el mayor número de moléculas libres en el interior vesicular genere un mayor gradiente electroquímico que provoca que el flujo

de serotonina sea mayor. En el supuesto de que el poro de fusión sea mayor en el mutante carente de heparina, se apoyaría la hipótesis de que la matriz intravesicular no interviene en el proceso de expansión del poro de fusión.

La duración similar de los pies amperométricos en los mastocitos control y las mutantes NDST-2 indica que la fase de expansión del poro presenta el mismo curso temporal tanto en presencia y como en ausencia de matriz intravesicular. Adicionalmente a la información aportada por la medida del retraso entre la capacidad y la amperometría, la ausencia de diferencias en la duración de los pies amperométricos permite confirmar que la matriz intravesicular de heparina no es la fuerza motriz fundamental ni, por lo tanto, responsable directa de las etapas iniciales de la fase de expansión del poro de fusión en mastocitos.

6. PAPEL DE LAS PROTEÍNAS EN LA FASE DE EXPANSIÓN DEL PORO DE FUSIÓN

En el apartado anterior se ha mostrado mediante el uso de mastocitos carentes de matriz intravesicular que la ausencia de heparina no afecta a las primeras etapas de la fase de expansión del poro de fusión. Esto hallazgo refuerza la hipótesis de que para la expansión del poro de fusión se necesita la intervención de proteínas puesto que es un proceso energéticamente desfavorable (Cohen and Melikyan, 2004). El tamaño de los poros medidos hace poco probable que la forma de expansión sea a través de la incorporación o polimerización de unidades proteicas que aumenten el radio del poro dando lugar a un poro de fusión completamente proteico. La teoría más aceptada actualmente es que la naturaleza del poro de fusión en su última fase de expansión es de naturaleza mixta, con un componente lipídico mayoritario y proteínas reguladoras adicionales. El papel de estas proteínas podría ser la modificación de los valores de curvatura y tensión que permitirían superar la barrera energética que implica la expansión del poro de fusión (Cohen and Melikyan, 2004). Esta modificación de las propiedades físicas de la membrana pueden ser realizadas mediante diferentes tipos de interacción proteína-lípido que se discutirán más adelante (Chernomordik et al., 2006).

En esta parte del trabajo presentado en esta tesis se estudia la implicación de la proteína SCAMP1 en la exocitosis y más concretamente en la fase de expansión del poro de fusión. Para ello se ha utilizado la monitorización de la exocitosis mediante la medida de la capacidad eléctrica de la membrana junto a la detección de la serotonina liberada mediante amperometría. Mediante la técnica de "*patch-clamp*", además de registrar la superficie celular, se puede medir la conductancia del poro de fusión. El límite de conductancia máxima que se puede medir depende del tamaño de las vesículas secretoras según la ecuación II–27. El uso de la línea de ratones *beige* permite medir valores de conductancia superiores a la centena de nS gracias a que presentan vesículas secretoras de tamaño anormalmente grande (Chi and Lagunoff, 1975).

7. EFECTO DE LA AUSENCIA DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN LA DESGRANULACIÓN DE LOS MASTOCITOS DE RATÓN *BEIGE*

Las mastocitos del ratón *beige* presentan un tamaño de vesicula secretora anormalmente grande sin que estén afectadas su composición lipídica o su estructura (Chi and Lagunoff, 1975; Chi et al., 1978). El tamaño de las vesículas secretoras permite en estas células la medida de la conductancia del poro de fusión mediante la técnica de "*patch-clamp*" en la configuración de *whole-cell*. Adicionalmente, la técnica permite comparar además las características cinéticas de la desgranulación en ausencia de la proteína SCAMP1. La obtención de los mastocitos de ratones *beige* carentes de la proteína SCAMP1 funcional se obtienen mediante cruces consanguíneos de la línea SCAMP1 con la línea *beige*. La línea de ratones *beige* será, por lo tanto, utilizada como control y los ratones *beige* carentes de SCAMP1 (SCAMP1-beige) serán los empleados para el estudio de la implicación de la proteína SCAMP1 en la exocitosis.

Para comprobar que en la línea SCAMP1-beige no hay expresión de la proteína SCAMP1 se ha realizado la técnica de inmunofluorescencia. Los resultados de esta técnica se muestran en la figura IV-20.

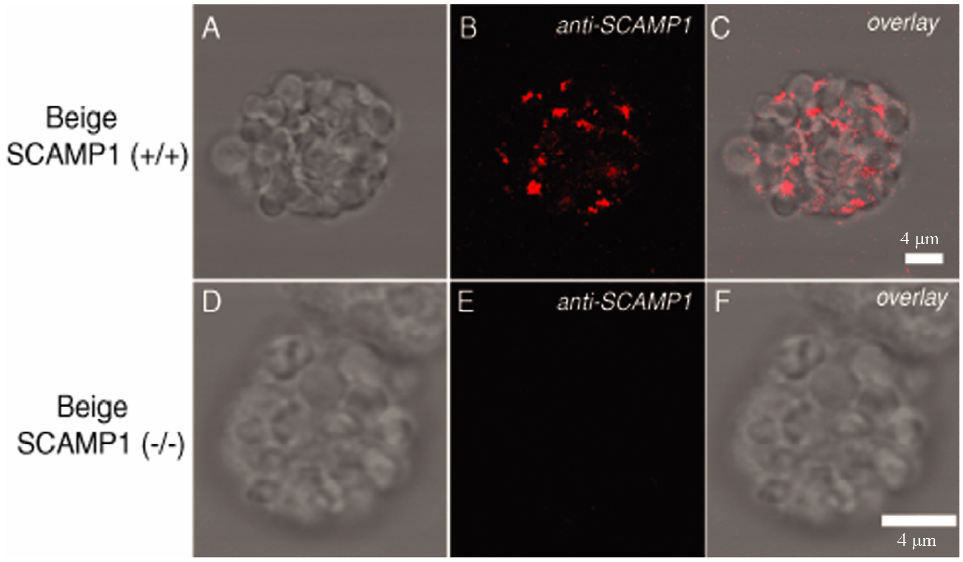

Figura IV-20: Técnica de inmunofluorescencia realizada en mastocitos de ratones *beige* (A-C) y de ratones SCAMP1-beige (D-F) en cultivo. Se puede observar que no hay expresión de SCAMP1 en las células cebadas peritoneales de esta línea de ratones *(cortesía de M. Castellano)*.

7.1. Incremento de tamaño del mastocito causado por la desgranulación

Los registros simultáneos de capacidad y amperometría en mastocitos de ratón *beige* presentan las características que se muestran en la figura IV-19. Aparentemente a este nivel no existen diferencias apreciables entre los ratones *beige* y los ratones de la línea SCAMP1-beige.

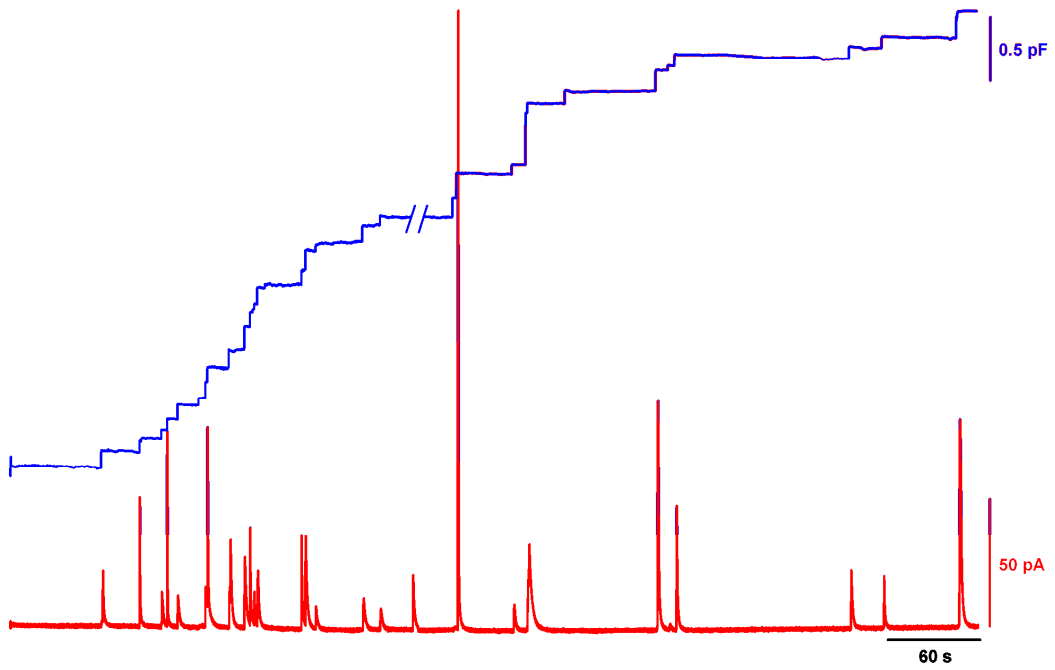

Figura IV-21: Ejemplo de registro simultáneo de capacidad y amperometría durante la desgranulacion de un mastocito de ratón *beige*. Las discontinuidades en el registro de capacidad se deben a la compensación de la corriente durante el registro.

Los tamaños inicial y final de las líneas *beige* y SCAMP-beige no presentan diferencias significativas. En la línea *beige*, las capacidades inicial y final son, respectivamente 7.37 ± 1.50 y 11.61 ± 2.16 pF (media ± d.e.). En la línea SCAMP1-beige estos valores son 7.06 ± 1.64 y 10.77 ± 3.51 (media ± d.e.) (fig. IV-22).

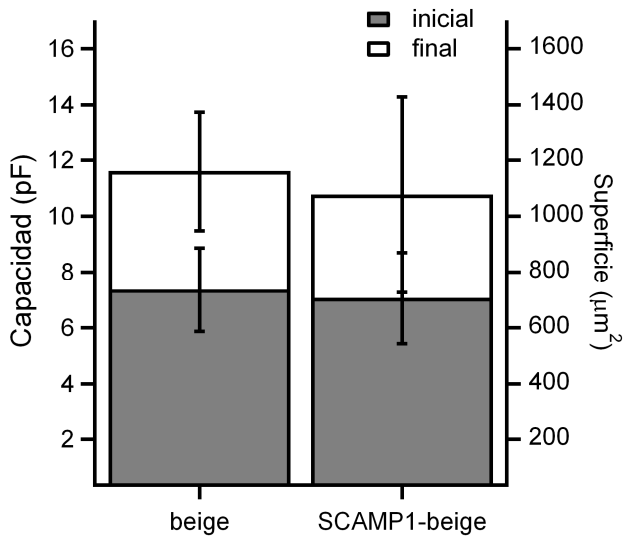

Figura IV-22: Valores de capacidad antes y después de la desgranulación provocada por GTP-γS en mastocitos de ratones de la líneas *beige* y SCAMP1-beige**.** (*beige* n = 17, SCAMP1-beige n=32).

La figura IV-23 muestra el incremento de capacidad de los mastocitos *beige* utilizados como control y los mastocitos de la línea SCAMP1-beige. Como puede apreciarse, las diferencias en la incorporación de membrana promovida por el GTP-γS no son significativas entre ambas líneas de ratones. Los valores del incremento de capacidad son 4.44 ± 1.82 fF en el caso de la línea *beige* y de 4.75 ± 1.60 en la línea SCAMP1-beige.

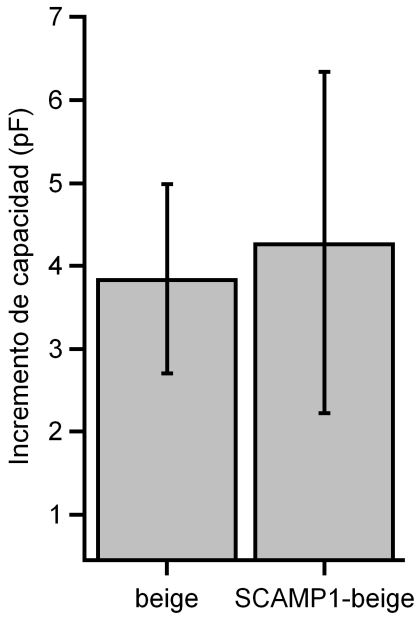

Figura IV-23: Incrementos de capacidad causados por la desgranulación en mastocitos de ratón *beige* y de ratón SCAMP1-beige. Existe una ligera diferencia no significativa entre ambas líneas de ratones. (*beige* n = 17, SCAMP1-beige n=32).

7.2. Tamaño de las vesículas secretoras

El análisis a nivel de vesícula única muestra que la amplitud de los saltos de capacidad ofrece la distribución que se muestra en la figura IV-24. Las medias de tamaño de vesícula secretora son de 145.64 ± 84.05 fF en los ratones *beige* y de 110.39 ± 55.54 fF en los ratones SCAMP1-beige (media ± d.e.). Estos datos se corresponden con 14.5 y 11 μm^2 de superficie respectivamente. En la figura IV-25 se muestra la distribución de los voluménes de las vesículas secretoras en las dos líneas de ratones utilizadas para el estudio de la implicación de la proteína SCAMP1 en las propiedades del poro de fusión. El volumen medio de la vesicula secretora de los ratones control es de 1.22 ± 0.12 femtolitros y de 1.25 ± 0.10 femtolitros en el caso de los mastocitos de ratones *beige* que no expresan la proteína SCAMP1 ($\bar{x}$ ± d.e.).

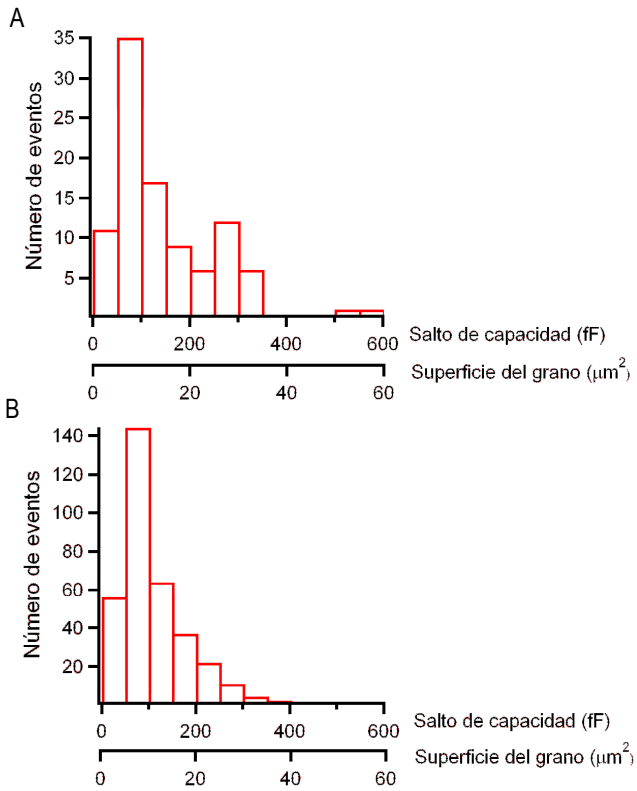

Figura IV-24: Histogramas de frecuencias de la distribución de los tamaños de vesículas secretoras mostrados como amplitud del salto de capacidad y como superficie de la vesícula. (A) mastocitos de ratones *beige*. (B) mastocitos de ratones de la línea SCAMP1-beige. (*beige* n= 98, SCAMP1-beige n = 342)

El anterior análisis muestra que no existe diferencia significativa en el volumen de las vesículas secretoras de los ratones *beige* utilizados como control y los de la línea SCAMP1-Bg. Se puede deducir que la ausencia de la proteína SCAMP1 no afecta a la biogénesis de las vesículas secretoras, como ya se había descrito anteriormente en mastocitos de ratón normal (Fernandez-Chacon et al., 1999).

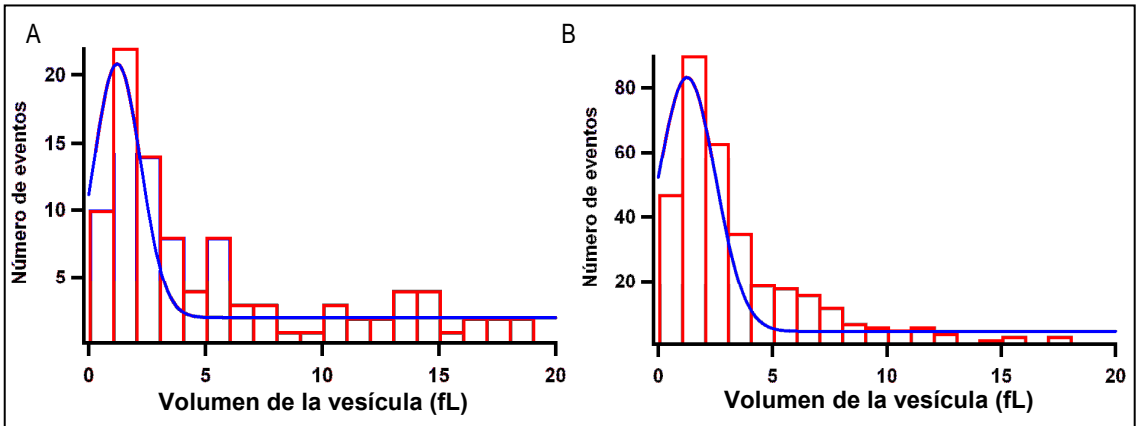

Figura IV-25: Histograma de frecuencias del volumen de los granos secretores de las células cebadas de ratón de la línea *beige* utilizados como control y de la línea SCAMP1-beige. El histograma se ajusta a una distribución normal para determinar el valor medio de tamaño de grano (*beige* n= 98, SCAMP1-beige n= 342).

8. EFECTO DE LA AUSENCIA DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN DE LOS MASTOCITOS DE RATÓN *BEIGE*

Para el estudio de la posible implicación de la proteína SCAMP1 en la cinética de liberación se utilizan los registros de amperometría. El estudio de la cinética de liberación de serotonina está basado en el análisis de los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas (fig. III-15).

8.1. Amplitud de las espigas amperométricas

En ausencia de la proteína SCAMP1, la amplitud de las espigas presenta una media de 48.07 ± 6.79 pA siendo en los ratones *beige* de 31.25 ± 7.23 pA (media ± e.e.). El histograma de frecuencias de la amplitud de las espigas se muestra en la figura IV-26.

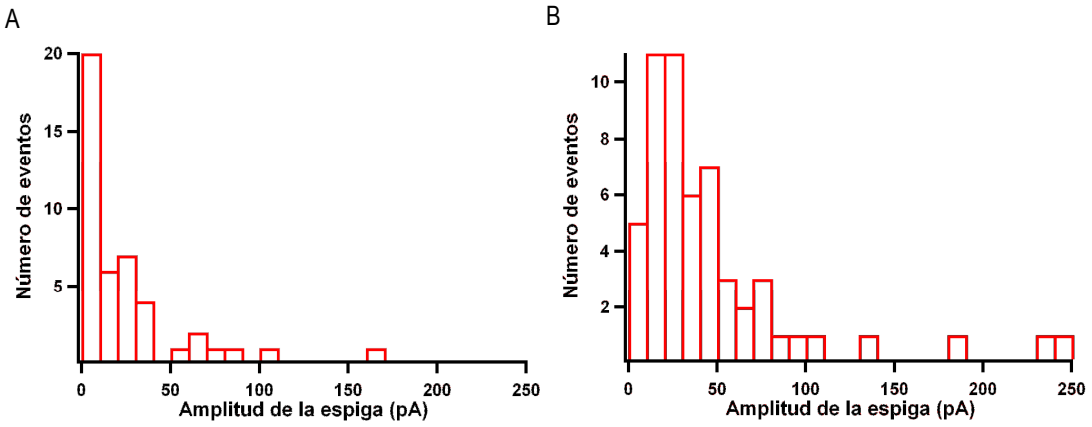

Figura IV-26: Histograma de frecuencias de la amplitud de las espigas amperométricas generadas por la secreción de serotonina en mastocitos de ratones *beige* (A) y de ratones doble mutantes SCAMP1-beige (B). La diferencia entre las dos líneas de ratones es significativa con $p < 0.001$ (*beige* n= 45, SCAMP1-beige n= 55).

8.2. Anchura a media altura de las espigas amperométricas

La comparación de la anchura a media altura de las espigas amperométricas entre los ratones *beige* y los mutantes para la proteína SCAMP1 se muestra en la figura IV-27. La media en los ratones *beige* es de 0.44 ± 0.06 s y de 0.33 ± 0.03 s en la línea de ratones que no expresan la proteína SCAMP1 funcional (media ± e.e.).

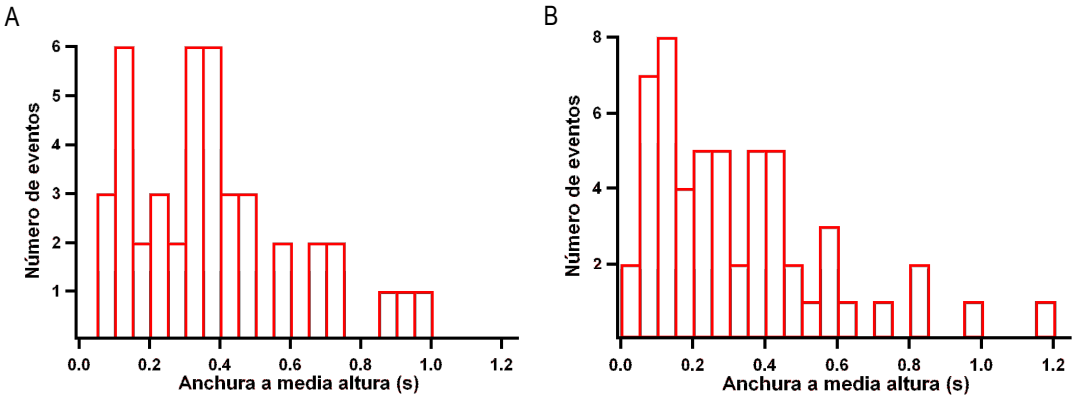

Figura IV-27: Histograma de frecuencias de anchura a media altura de las espigas amperométricas generadas por la secreción de serotonina en matocitos de ratones beige (A) y de ratones doble mutantes SCAMP1-beige (B). (*beige* n= 45, SCAMP1-beige n= 55)

8.3. Tiempo al pico de las espigas amperométricas

La liberación de serotonina de los mastocitos en el caso de la expresión de la proteína SCAMP1 funcional en la línea de ratones *beige* presenta unas espigas amperométricas con un tiempo al pico de 0.096 ± 0.009 s. Si la proteína SCAMP1 no se expresa, las espigas amperométricas tienen un tiempo al pico de 0.087 ± 0.009 s (media ± e.e.). En la figura IV-28 se muestran los histogramas de frecuencias del tiempo al pico de ambas líneas de ratones.

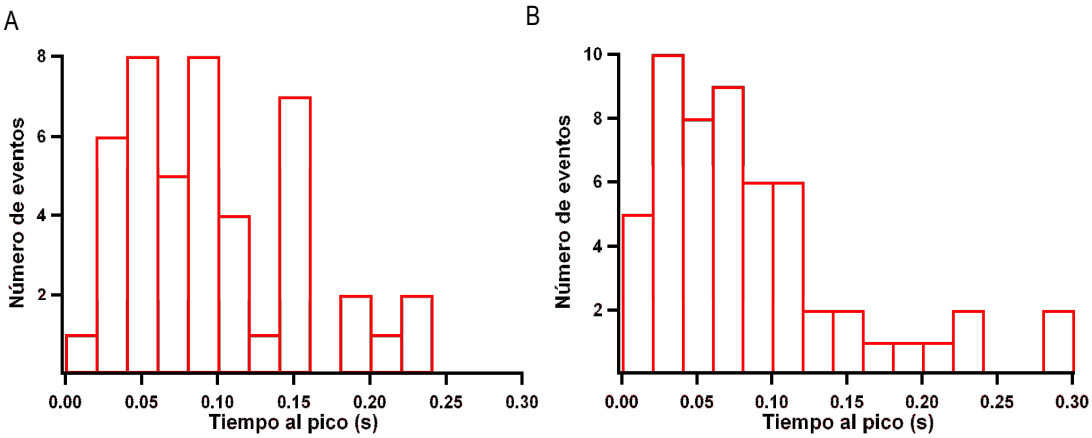

Figura IV-28: Histograma de frecuencias del tiempo al pico de las espigas amperométricas generadas por la secreción de serotonina en mastocitos de ratones *beige* (A) y de ratones doble mutantes SCAMP1-beige (B). (*beige* n= 45, SCAMP1-beige n= 55)

8.4. Carga de las espigas amperométricas

La carga de las espigas amperométricas es una medida de la cantidad de serotonina liberada en cada evento de secreción. Las espigas de los mastocitos procedentes de ratones *beige* tienen una carga de 15.59 ± 3.18 pC frente a los 18.10 ± 3.07 pC de los mastocitos de ratones la línea SCAMP1 (media ± error estándar). En la figura IV-29 se muestran los histogramas de frecuencias de la carga de ambas líneas de ratones.

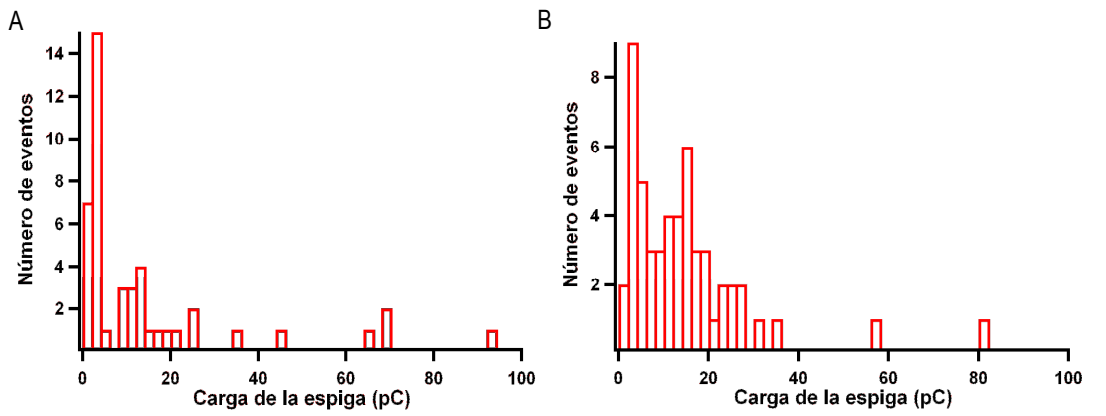

Figura IV-29: Histograma de frecuencias de la carga de las espigas amperométricas generadas por la secreción de serotonina en mastocitos de ratones *beige* (A) y de ratones doble mutantes SCAMP1-beige (B). El análisis estadístico de las dos distribuciones confirma que no hay diferencias en la carga de las espigas entre las dos líneas de ratones (*beige* n= 45 espigas, SCAMP1-beige n= 55 espigas).

En la tabla IV-3 se muestra un resumen del análisis de los parámetros de la cinética de las espigas amperométricas de las líneas *beige* y SCAMP1-beige.

Tabla IV-3: comparación de parámetros de espigas amperométricas entre ratones *beige* y ratones SCAMP1-beige (media ± error estándar)

	Altura (pA)	Anchura a media altura (ms)	Tiempo al pico (ms)	Carga (pC)
beige **(n = 45)**	48.07 ± 6.79	440 ± 60	96 ± 9	15.59 ± 3.18
SCAMP1-beige (n = 55)	31.25 ± 7.23 (***)	330 ± 30	87 ± 9	18.10 ± 3.07

La única diferencia encontrada en la cinética de liberación entre ambas líneas es la altura de las espigas amperométricas. La igualdad en parámetros como la anchura a media altura y el tiempo al pico indica que no existe una modificación en la tasa de liberación en ausencia de la proteína

SCAMP1. La variación en la altura entre ambas líneas de ratones puede deberse a factores geométricos inherentes a la técnica utilizada.

9. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN EL PORO DE FUSIÓN

El límite de resolución para la medida del poro de fusión mediante la técnica de "*patch-clamp*" está en función del tamaño de la vesícula secretora. Como se ha explicado anteriormente, el tamaño de vesícula secretora de los mastocitos de ratón *beige* permite medidas de la conductancia del poro de fusión desde varios nanosiemens (nS) de hasta cientos de nS de conductancia (figura III-11, ecuación [27]). La figura IV-29 muestra un fragmento de un registro de capacidad durante la desgranulación de un ratón *beige* en el que se representan los componentes real e imaginario de la admitancia. De estos dos componentes se puede calcular la conductancia del poro de fusión según la ecuación

$$\frac{\mathrm{Im}}{\mathrm{Re}} = \frac{G_P}{\omega C_g} \Rightarrow G_P = \frac{\mathrm{Im}}{\mathrm{Re}} \cdot \omega \cdot C_g$$

la cual ha sido explicada en el apartado de materiales y métodos.

Los parámetros que se han analizado de los poros de fusión son la duración y el tamaño del poro de fusión. Ambos parámetros proporcionan información de la dinámica de la fase de expansión y permiten estudiar un posible papel de SCAMP1 en el poro de fusión.

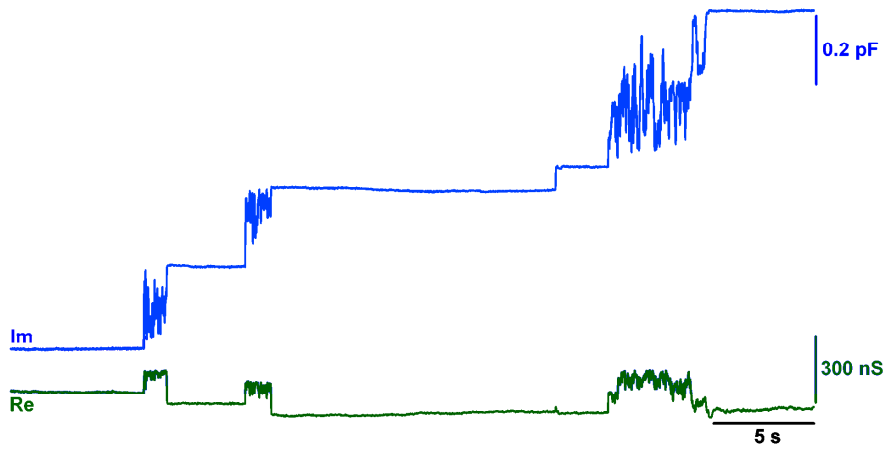

Figura IV-30: Detalle de un registro de capacidad obtenido durante la desgranulación de un mastocito de ratón beige. Se puede observar el componente real (Re) que, junto al componente imaginario (Im), permite el cálculo de la conductancia del poro de fusión que preceden a las fusiones de las vesículas secretoras.

En la figura IV-31 y IV-32 se muestran varios ejemplos de la conductancia de varios poros de fusión obtenidos mediante la configuración de célula completa de la técnica de "*patch-clamp*"

calculada mediante la ecuación [III-26]. En esta última, se puede apreciar una gran variabilidad en cuanto a valores de conductancia y duración de los poros de fusión.

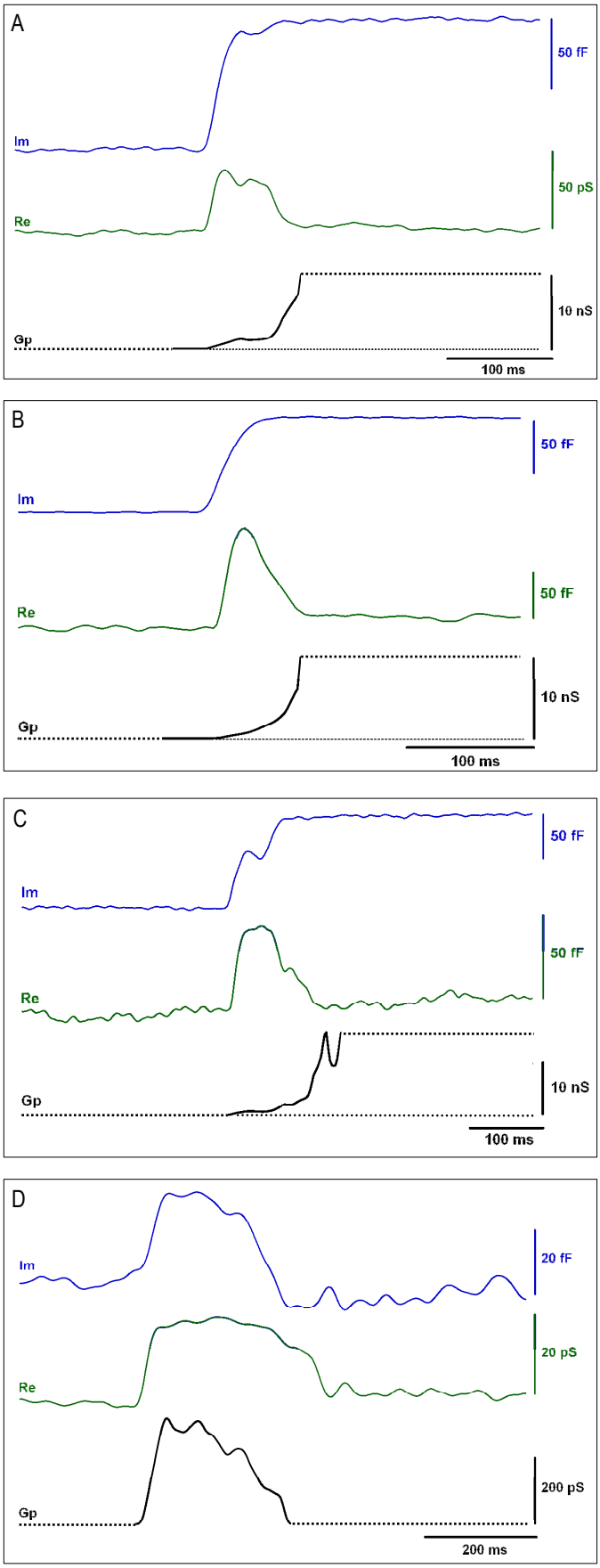

Figura IV-31: Ejemplos de valores de conductancia del poro de fusión en mastocitos de ratones *beige*. Los valores de conductancia se obtienen a partir de los valores del componente real (Re) e imaginario (Im) de la admitancia según la ecuación II-26

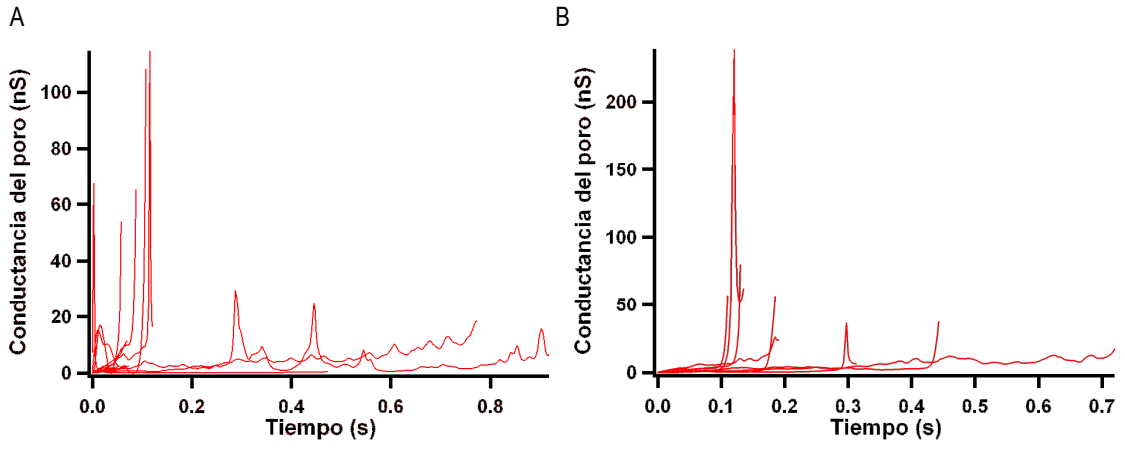

Figura IV-32: Ejemplos de cursos temporales de las conductancias de poros de fusión de la línea *beige* (A) y SCAMP1-beige (B). Incluso dentro de una misma línea de ratones los poros de fusión muestran cursos temporales, conductancias máximas y duraciones distintas.

9.1. Duración del poro de fusión

Para determinar si la proteína SCAMP1 está implicada en la estabilidad del poro de fusión, se ha estudiado la duración de los poros de fusión de las líneas *beige* y SCAMP1-beige. La figura IV-33 muestra los histogramas de frecuencias de la duración de los poros de fusión. Existe una ligera diferencia entre las medias de la duración obtenidas mediante el ajuste del histograma a una función exponencial. La media de la línea de ratones *beige* es de 392 ± 64 ms y de 312 ± 22 ms en la línea SCAMP1-beige (media ± d.e.). La pequeña diferencia existente entre las medias de la duración de la fase de expansión no es estadisticamente significativa, lo que demuestra que el curso temporal de la fase de expansión del poro de fusión no está alterado cuando no hay expresión de la proteína SCAMP1.

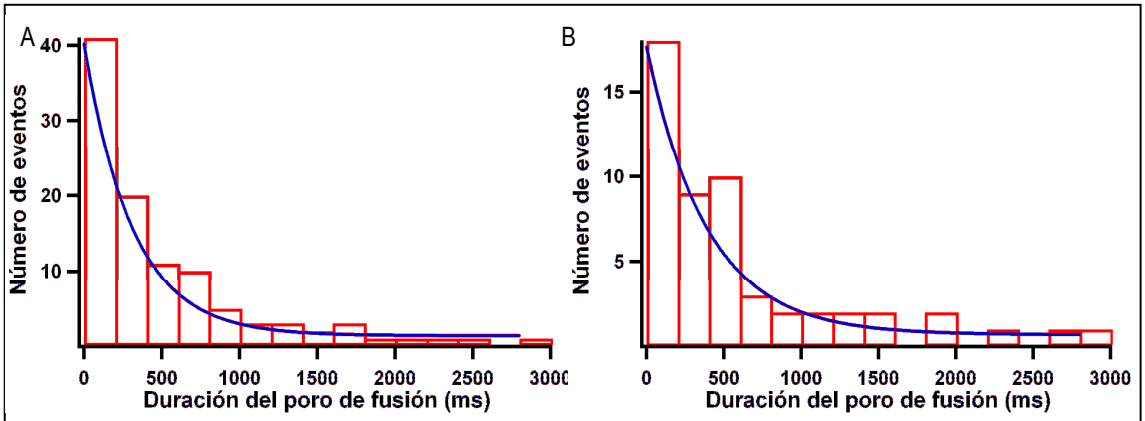

Figura IV-33: Histograma de frecuencias de la duración de los poros de fusión en la línea *beige* (A) y en la línea SCAMP1-beige (B). (*beige* n = 58 poros, SCAMP1-beige n = 113 poros).

9.2. Conductancia del poro de fusión

En la figura IV-34 se muestran los histogramas de frecuencias de los valores de conductancia de los poros de fusión medidos en los ratones *beige* utilizados como control y en la línea SCAMP1-beige carentes de la proteína SCAMP1. Para calcular la media de conductancia que presentan ambas líneas de ratones se ha realizado un ajuste a una distribución exponencial. La media obtenida en el caso de la línea *beige* es de 1.002 ± 0.007 nS y de 2.648 ± 0.516 nS en la línea SCAMP1-beige (media ± d.e.).

La conductancia media por lo tanto es muy superior en el caso del mutante que no expresa la proteína SCAMP1. Aunque el poro de fusión puede ser un limitante al paso de moléculas de serotonina a su través, el gran tamaño que poseen las vesículas secretoras de los mastocitos de ratones *beige* puede hacer que una conductancia mayor no se refleje en una tasa de liberación mayor. Esto explicaría la ausencia de diferencias en los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas comentados anteriormente.

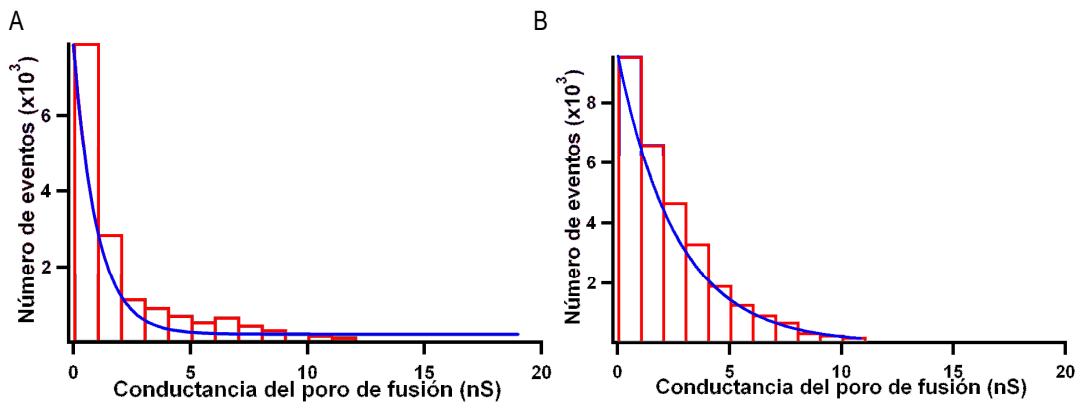

Figura IV-34: Histogramas de frecuencias de los valores de conductancia del poro de fusión, (A) *beige* y (B) SCAMP1-beige. Se representa también el ajuste a las funciones exponenciales que permiten calcular el valor medio de conductancia de las dos líneas de ratones objeto del estudio. Las diferencias son significativas ($p < 0.001$). (*beige* n = 16909 valores de conductancia, SCAMP1-beige n = 32078 valores de conductancia).

Una vez comprobado que los valores de conductancia de los poros de fusión del mutante SCAMP1 son más elevados, es interesante saber en qué momento de la fase de expansión se dan estas diferencias de conductancias. Para poder comparar poros de distinta duración, los valores de conductancia de la fase de expansión se ha normalizado respecto al tiempo, permitiendo así comparar la dinámica del poro de fusión entre la línea *beige* y la SCAMP1-beige (fig. IV-35). En la gráfica se aprecia que la conductancia media desde el inicio de la fase de

expansión del poro hasta el límite superior que permite nuestra técnica es superior en la línea SCAMP1-beige si la comparamos con la línea *beige*.

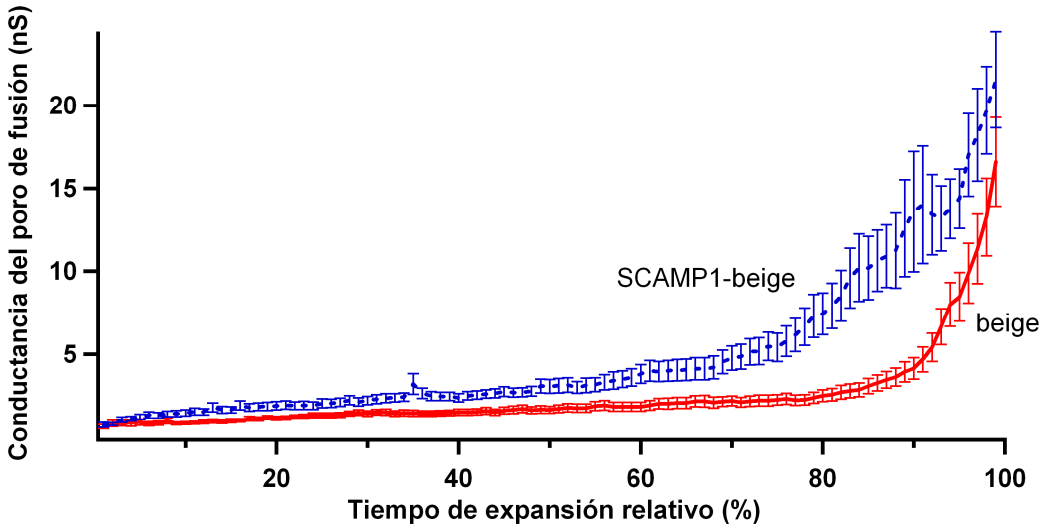

Figura IV-35: Curso temporal normalizado de la media de la conductancia de los poros de fusión de las líneas *beige* y SCAMP1-beige (media ± e.e.). (*beige* n = 58, SCAMP1-beige n = 113)

Con el objetivo de poner de manifiesto en qué fase de la expansión las diferencias de conductancia están más marcadas, en la figura IV-36 se representa la diferencia de conductancias entre los poros de fusión de ambas líneas. En esta figura se puede apreciar que la conductancia en ausencia de la proteína SCAMP1 es mayor desde el inicio de la fase de expansión del poro. La diferencia de conductancia entre ambas líneas de ratones aumenta de forma lineal hasta la mitad de la fase de expansión aproximadamente. Tras esta dependencia lineal y hasta el 90 % de la fase de expansión, se puede observar una dependencia potencial, alcanzando la máxima diferencia en el 90 % del tiempo total de expansión. En el último 10 % de la fase de expansión, la diferencia disminuye, aumentando al mismo tiempo la variabilidad. La diferencia de conductancia en esta fase final puede estar alterada por los valores máximos medibles de cada poro de fusión que dependen del tamaño de cada vesícula secretora. Debido a esto, en la última fase de la expansión el parámetro no es adecuado para comparar las conductancias entre ambas líneas de ratones. Es probable por lo tanto que la diferencia de conductancias continúe siendo potencial durante el resto del proceso de expansión.

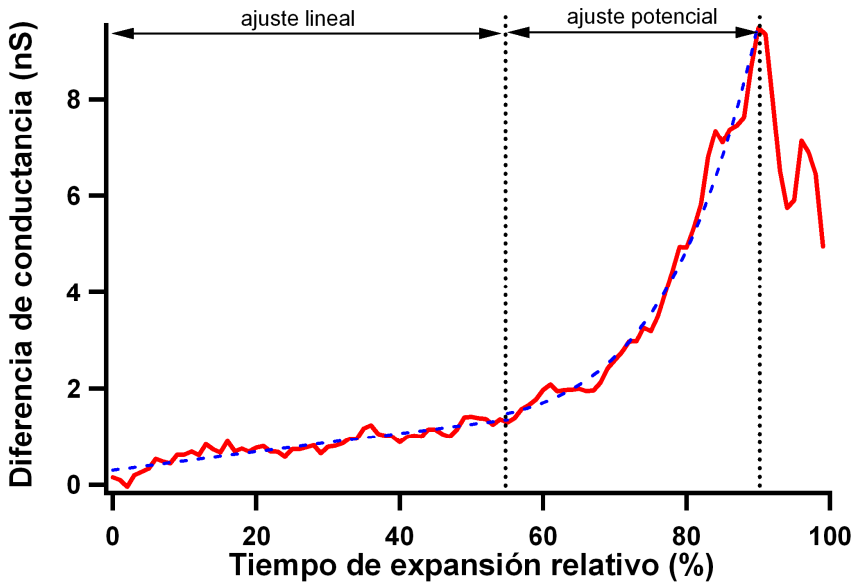

Figura IV-36: Diferencia de conductancias entre las líneas de ratones *beige* y SCAMP1-beige. Se distinguen distintas fases en la diferencia de conductancias, una primera lineal con una tasa de 0.019 nS por 0.01 unidades de expansión, y una fase potencial que se ajusta a la ecuación $y = x^{6.87}$. (*beige* n = 58, SCAMP1-beige n = 113).

10. MODELADO DE LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN DE LAS CÉLULAS MASTOCITOS MEDIANTE EL MÉTODO DE MONTE CARLO

Los métodos computacionales permiten el estudio de la cinética de la secreción celular mediante el uso de simulaciones. Las simulaciones consisten en la obtención de espigas amperométricas bajo condiciones geométricas y fisico-químicas definidas. La comparación de espigas amperométricas reales y simuladas permiten inferir las condiciones en las que se producen los eventos secretores reales. El método utilizado en nuestro trabajo para la generación de espigas simuladas es denominado método de Monte Carlo y está basado en la generación de números aleatorios (fig. III-16).

La matriz intravesicular de heparina presente en las vesículas secretoras de los mastocitos interacciona con las cargas positivas de las moléculas de serotonina, histamina y con proteasas específicas en el interior de los vesículas secretoras (Forsberg et al., 1999; Humphries et al., 1999). Durante el proceso de fusión de membranas, se produce la continuidad química y eléctrica entre el interior vesicular y el espacio extracelular a través del poro de fusión (figs. III-9 y III-10). En estas condiciones se produce un intercambio iónico entre la solución extracelular y la matriz intravesicular de heparina (Marszalek et al., 1997). El intercambio iónico produce una sustitución de iones monovalentes por las moléculas de serotonina, lo que genera el hinchamiento o "*swelling"* de la matriz de heparina y la liberación de las moléculas de serotonina que pasan a estar en disolución (fig. I-7). Una vez en disolución, el gradiente de concentración causa un flujo de moléculas de serotonina hacia el exterior del gránulo atravesando el poro de fusión. El poro de fusión puede comportarse como un impedimento estérico a ser atravesado por flujo de serotonina en función de su tamaño.

Dado que el movimiento de las moléculas de serotonina una vez liberadas de la matriz intravesicular hasta el detector está basado en un proceso difusional, toda espiga amperométrica está afectada por la difusión. Para el estudio de los factores que afectan a la tasa de liberación se ha de tener en cuenta el factor difusional inherente al proceso secretor. En función de la distancia del evento secretor al detector, la cinética obtenida puede ser reflejo de un proceso predominantemente difusional. La influencia de la difusión será mayor al aumentar dicha distancia. Como es obvio, durante la desgranulación de un mastocito los eventos ocurren a distintas distancias del detector, lo que genera una variabilidad en los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas. A pesar de esta dificultad para observar cambios en la tasa de secreción, la técnica de la amperometría ha permitido mostrar diferencias en la tasa de secreción

en ausencia de matriz intravesicular. El uso de simulaciones mediante el método de Monte Carlo permite eliminar el factor difusional del proceso secretor y definir con mayor precisión la modificación de la tasa de liberación en ausencia de matriz intravesicular.

Las simulaciones que se han realizado para el estudio de la implicación de la matriz de heparina en la cinética de la liberación han consistido en la liberación instantánea de un número de moléculas definido, con el detector a distancias variables desde el punto de la superficie celular en el que ocurre la liberación. Bajo estas condiciones, la espiga amperométrica simulada obtenida responde a la ley difusional dado que el único factor que afecta a los parámetros cinéticos de la espiga es el tiempo que tardan las moléculas en llegar al detector.

Para la comparación de espigas se recurre al método del escalado. El escalado consiste en la normalización de los parámetros de las espigas amperométricas que dependen de la distancia del evento de fusión al detector. La dependencia de la altura y del ancho a media altura de esta distancia se demuestra mediante simulaciones en las que sólo se modifica la distancia del evento secretor hasta el detector. Las espigas simuladas así obtenidas presentan diferentes valores de altura y anchura a media altura (fig. IV-37). Distintas distancias implican distintos parámetros de las espigas según un proceso difusional. El escalado de las espigas amperométricas elimina el factor diferenciador de la distancia. En la figura IV-37C se comprueba la coincidencia de los parámetros de las espigas simuladas tras el escalado.

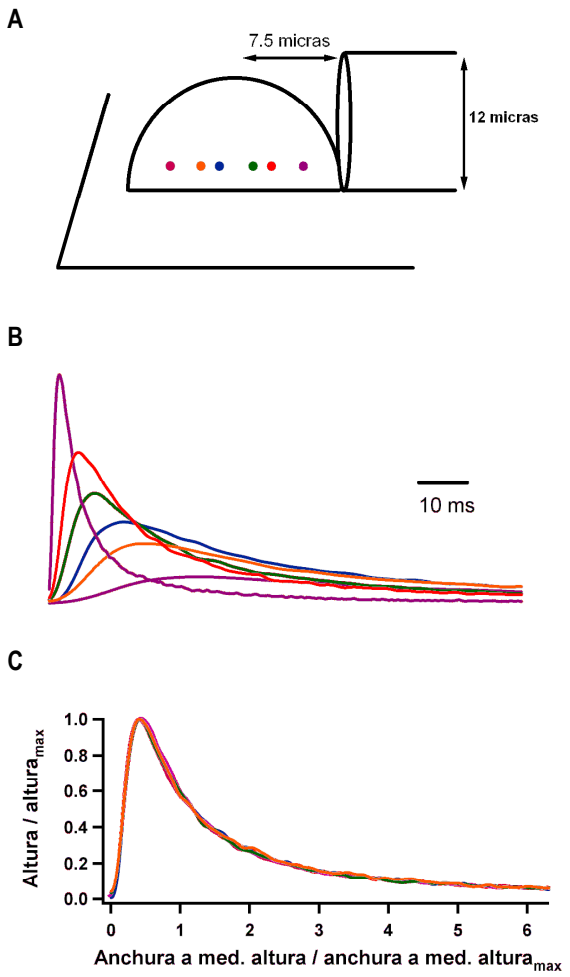

Figura IV-37: Obtención de espigas simuladas con diferentes distancias entre el evento de fusión y el detector. (A) Esquema de la localización de los eventos de fusión. (B) Espigas simuladas obtenidas en los puntos señalados en A. (C) Espigas simuladas escaladas superpuestas. La superposición muestra la coincidencia de los parámetros cinéticos entre las espigas. La diferencia entre ellas se debe unicamente a la distancia entre el evento secretor y el detector de acuerdo con un proceso difusional puro.

Es importante destacar que, al contrario de lo que ocurre con las espigas simuladas, las espigas registradas de mastocitos normales no se ajustan entre sí tras escalarlas por su altura y ancho a media altura. Sin embargo, las espigas registradas de mastocitos carentes de heparina son idénticas tras ser sometidas al escalado (fig. IV-38).

La superposición tras el escalado de las espigas reales demuestra que las espigas obtenidas de ratones control no obedecen a un proceso difusivo simple. De este hecho se deduce que la tasa de liberación de las moléculas de serotonina que definen la espiga real no responde únicamente a la difusión desde el interior de la vesícula secretora hasta el detector. Existe por lo tanto un factor que modifica la tasa de liberación y que es anterior al paso de las moléculas de serotonina al espacio extracelular.

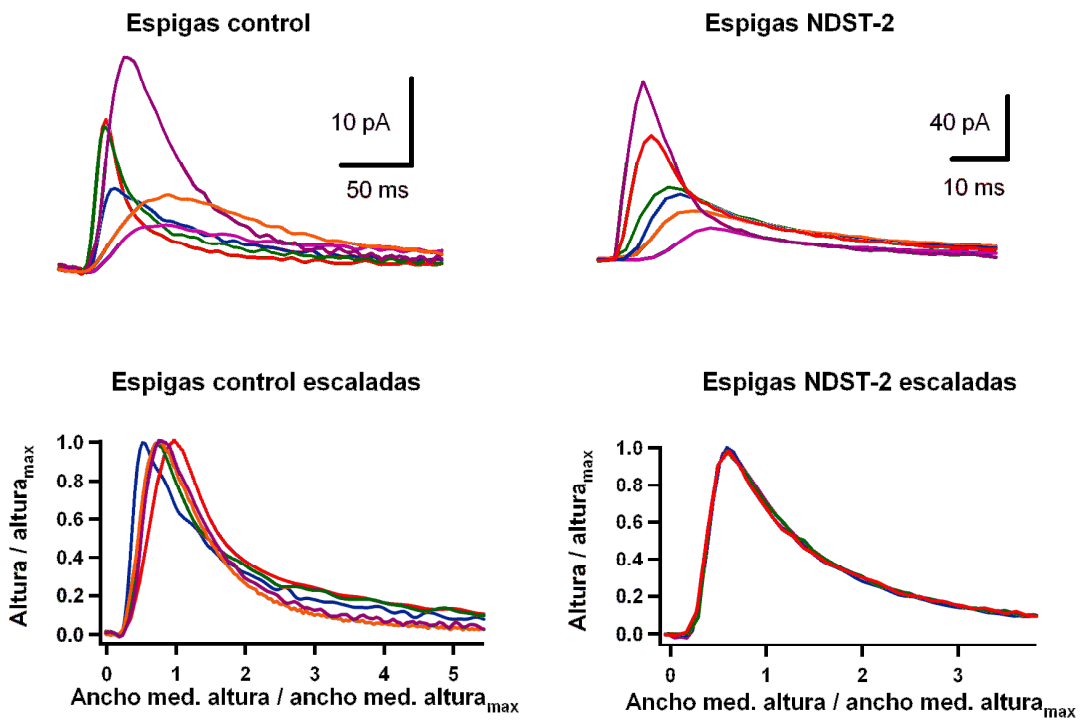

Figura IV-38: Comparación de espigas amperométricas registradas obtenidas mediante la detección de serotonina liberada por la desgranulación de mastocitos normales (paneles izquierdos) y procedentes de línea NDST-2 (paneles derechos). Los escalados de las espigas en altura y ancho a media altura muestran que las espigas del ratón normal no se ajustan a un modelo difusional mientras que si lo hacen las espigas de células cebadas mutantes carentes de matriz intravesicular.

A diferencia de las espigas control, en los mastocitos de la línea de ratones NDST-2 y debido a su carencia de matriz intravesicular, las espigas registradas son semejantes tras el escalado. La comparación de las espigas simuladas con las espigas de mastocitos carentes de heparina demuestran que en ausencia de matriz, las espigas responden a un modelo puramente difusional (fig. IV-39A). Por lo tanto, las diferencias encontradas entre las espigas de vesículas secretoras sin matriz se deben únicamente a distintas distancias desde el evento hasta el detector.

La superposición de espigas registradas de ratón normal con espigas simuladas confirma que cuando hay matriz intravesicular las espigas no se rigen por un modelo difusional (fig. IV-39B). En este caso, la tasa de liberación es la consecuencia de la cinética de la disociación de las moléculas de serotonina de la matriz intravesicular junto a la posterior difusión de las moléculas hasta que llegan al detector.

Todos estos datos demuestran que la matriz intravesicular afecta a la tasa de liberación provocando que la cinética de liberación sea más lenta y generando una cinética de liberación de serotonina que no se puede explica mediante difusión.

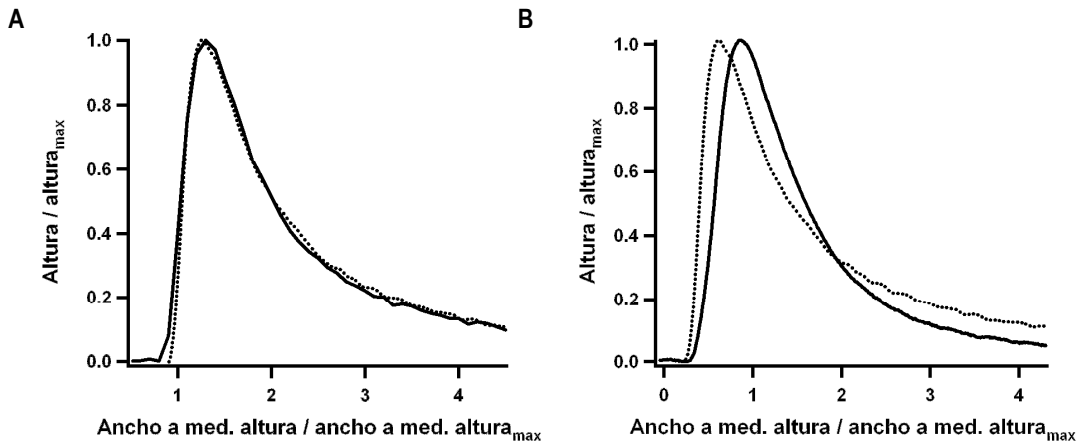

Figura IV-39: Comparación entre espigas registradas con espigas simuladas. (B) La espiga registrada de un mastocito de ratón control (trazo continuo) no se ajusta a la simulada (trazo discontinuo) tras el escalado. (A) Tras el escalado, el ajuste entre la espiga registrada de un mastocito de ratón NDST-2 (trazo continuo) y una espiga simulada (trazo discontinuo) es óptimo.

V. DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo de investigación se han obtenido del estudio de la función de dos componentes de distinta naturaleza implicados en la última fase del proceso secretor. Este estudio ha permitido por primera vez describir la liberación de serotonina de mastocitos carentes de matriz intravesicular. Utilizando la misma combinación de técnicas, el estudio se ha centrado también en la implicación de la proteína SCAMP1 en el proceso secretor y, más concretamente, en la cinética de la liberación de serotonina y en las propiedades dinámicas del poro de fusión.

1. EFECTO DE LA AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR EN LOS MASTOCITOS

1.1. Efecto de la ausencia de matriz intravesicular en la morfología de los mastocitos

La morfología de las vesículas secretoras se encuentra afectada en los mastocitos de los ratones de la línea NDST-2 como muestran estudios realizados mediante electromicrografía y microscopía óptica (Forsberg et al., 1999). En este estudio el número de vesículas electron-densas típicos de los mastocitos desaparecen casi en su totalidad, apareciendo estructuras vesiculares de gran tamaño transparentes a los electrones. Los experimentos de medida de la capacidad eléctrica han mostrado una alteración morfológica adicional de las vesículas secretoras. La monitorización de la capacidad eléctrica durante la desgranulación muestra que las vesículas secretoras de los mastocitos de la línea NDST-2 son de menor tamaño que las de ratones control. El papel de la matriz de heparina en la biogénesis de las vesículas secretoras se desconoce. Una posible inestabilidad estructural en el caso de ausencia de heparina durante la síntesis de las vesículas podría ser la causa de estas diferencias de tamaño.

A nivel funcional, se ha comprobado mediante pruebas citobioquímicas que la línea de ratones NDST-2 presenta una cantidad de histamina un 31 % menor respecto a los mastocitos control (Humphries et al., 1999). Experimentos que cuantifican la actividad enzimática de las proteasas específicas de mastocitos (mMCPs) estiman que la línea de ratones NDST-2 presenta una reducción del 50 % de la actividad de la línea control (Humphries et al., 1999).

La técnica de la amperometría en las condiciones detalladas en los métodos de este trabajo permite detectar exclusivamente la secreción de serotonina de los mastocitos (Pihel et al., 1995). La obtención de espigas amperométricas demuestra que los mastocitos mutantes son capaces de almacenar serotonina en las vesículas secretoras. La monitorización simultánea de la superficie celular y de la liberación de serotonina permite estimar la concentración de serotonina a la que es almacenada.

1.2. Concentración de serotonina en ausencia de matriz intravesicular

En este trabajo se ha demostrado que la concentración de serotonina de las vesículas secretoras de mastocitos de los ratones de la línea NDST-2 es un 33 % menor que en mastocitos de ratón control (0.08 M en los mutantes frente a 0.12 M en el control).

Las causas de las diferencias en la concentración a la que la serotonina es almacenada en las vesículas secretoras de los mastocitos entre ambas líneas de ratones pueden residir en el mecanismo transportador de aminas al interior de las vesículas. Existe un transportador común para la histamina y la serotonina que realiza un transporte activo de ambas moléculas. Este transporte común es dependiente de pH y de la concentración de histamina y serotonina (Ludowyke and Lagunoff, 1986). A diferencia de las células cromafines y plaquetas, la incorporación de aminas al interior de las vesículas secretoras de mastocitos es independiente de ATP. En cromafines y plaquetas, una bomba de protones dependiente de ATP aumenta la concentración de protones en el interior de las vesículas. En cambio, el transporte de aminas en mastocitos es dependiente del gradiente de potencial eléctrico y del pH generado. La diferencia entre los mastocitos y el mecanismo en cromafines y plaquetas es que no es necesaria la presencia de ATP para mantener dicho gradiente de protones entre el citoplasma y el interior vesicular (Lagunoff and Rickard, 1983). Es muy posible que el mantenimiento del pH ácido en el interior de las vesículas secretoras de mastocitos se deba a la gran densidad de carga negativa de la heparina y del efecto del anillo imidazol de la histamina, ambas características complementadas con la baja conductancia al K^+ de la membrana vesicular. De esta forma, este gradiente sería suficiente para el funcionamiento del transportador de aminas no específico (Ludowyke and Lagunoff, 1986). Por otro lado se han realizado experimentos de captación de serotonina tritiada que demuestran que además del transportador común, existen uno o más transportadores específicos de serotonina (Ludowyke and Lagunoff, 1986).

Según estos datos, la inexistencia de matriz intravesicular de heparina puede alterar el pH del lumen vesicular y afectar al transporte de aminas hacia el interior de las vesículas secretoras. De este modo, la menor concentración de serotonina en el interior de las vesículas secretoras de los mastocitos carentes de matriz intravesicular puede ser explicadas por la alteración del pH del lumen de las vesículas secretoras en el caso de la ausencia de matriz intravesicular.

Inicialmente esto puede hacer pensar que la cantidad de serotonina liberada en una desgranulación es menor en los mastocitos carentes de matriz intravesicular. Para confirmar si esto es correcto, hemos utilizado los registros de capacidad para estimar el número de vesículas secretoras que se fusionan con la membrana tras la desgranulación provocada por la aplicación de GTPγS en el interior de la pipeta de "*patch-clamp*". Los mastocitos control poseen una media de 419 vesículas frente a 391 de los mutantes NDST-2. La diferencia no es acusada, pero demuestra que en los mastocitos mutantes existe una menor cantidad de membrana vesicular

disponible para ser exocitada. Adicionalmente a que la concentración de serotonina de las vesículas secretoras en el mutante NDST-2 se encuentra disminuida en un 33 %, el menor número de vesículas secretoras que contiene (6 % menor) provoca que la cantidad de serotonina liberada en los mutantes sea un 39 % menor que en los mastocitos control.

Se ha comprobado que la serotonina compite con la histamina por el transportador común de aminas presente en la membrana de las vesículas secretoras de los mastocitos (Ludowyke and Lagunoff, 1986). La competencia por el transportador de las dos aminas permite que la incubación de los mastocitos en cultivo con serotonina provoque que la secreción de histamina disminuya respecto a la de serotonina (Pihel et al., 1998). En este trabajo también se muestra que existe una concentración de serotonina a partir de la cual genera una menor secreción de histamina pero no aumenta la de serotonina.

Para la realización de nuestros experimentos los mastocitos son incubados en presencia de serotonina, lo que genera un desplazamiento de la histamina en favor de la serotonina durante el proceso de transporte de ambas aminas hacia el interior de la vesícula secretora. Debido a que la histamina es el principal secretagogo de los mastocitos en condiciones normales, la incubación con serotonina puede producir que la capacidad de almacenaje de la vesícula secretora sea empleada principalmente en la incorporación de serotonina. Esto puede ser la causa de que las diferencias en la concentración de serotonina de las vesículas secretoras carentes de matriz sea solamente un 33 % respecto a los controles a pesar de las alteraciones de gradiente de pH que puedan sufrir estas vesículas. Es muy posible por lo tanto que en condiciones fisiológicas la cantidad de serotonina en los mutantes NDST-2 sea menor a este 39 % que medimos en nuestros experimentos, siendo el efecto de la ausencia de matriz intravesicular más acusado que el aquí mostrado.

2. DINÁMICA DEL PORO DE FUSIÓN EN AUSENCIA DE MATRIZ INTRAVESICULAR

Durante un evento de fusión de membranas, el poro de fusión exocitótico que establece una conexión acuosa entre el lumen del grano secretor y el espacio extracelular se expande rápidamente. La exposición del interior vesicular con la solución extracelular salina causa la descondensación de la matriz intravesicular, resultando en la liberación de su contenido al espacio extracelular.

Las medidas eléctricas de la conductancia del poro de fusión muestran que se abren de forma abrupta con una conductancia de varios cientos de picosiemens (Spruce et al., 1990). La conductancia puede fluctuar antes de llegar a cero indicando el cierre del poro de fusión o incrementarse hasta valores no medibles indicando la expansión irreversible del poro de fusión (Breckenridge and Almers, 1987a; Alvarez de Toledo and Fernandez, 1988). Estos poros de fusión detectables eléctricamente corresponden a los primeros estadíos de la fase de expansión. Las electromicrografías muestran tamaños de poro mucho mayores que los medidos por la técnica de "*patch-clamp*". Estos poros de fusión tardíos están compuestos por lípidos en forma de bicapa como se aprecia mediante microscopía electrónica en criofracturas (Monck and Fernandez, 1992). Debido a su pequeño tamaño, los primeros estadíos de la fase de expansión no pueden observarse mediante criofracturas. Esta limitación impide el conocimiento de su estructura molecular.

Durante la formación del poro de fusión, las membranas implicadas adquieren distintas conformaciones que poseen distinta energía elástica tensional (fig. V-1). Trabajos basados en modelos biofísicos han llegado a la conclusión de que es necesario el aporte de energía en todas las etapas del proceso de fusión (Nanavati et al., 1992; Chizmadzhev et al., 2000; Cohen and Melikyan, 2004).

La hipótesis SNARE acepta que la fusión inicial de membranas es un proceso catalizado por proteínas, aunque el aumento de tamaño necesario para la expansión del poro de fusión esté causado por la incorporación de lípidos a una estructura inicialmente proteica. Es en esta fase cuando parámetros físicos como la tensión o curvatura de la membrana pueden regular la dinámica de la expansión del poro. Se ha demostrado que el aumento de la tensión de la membrana plasmática de mastocitos impide la exocitosis (Solsona et al., 1998). La distensión de la membrana puede impedir físicamente la expansión del poro por cambios en las características

estructurales de la membrana, aunque también existe la posibilidad de que provoque el desacoplamiento de la maquinaria proteica responsable de la fusión.

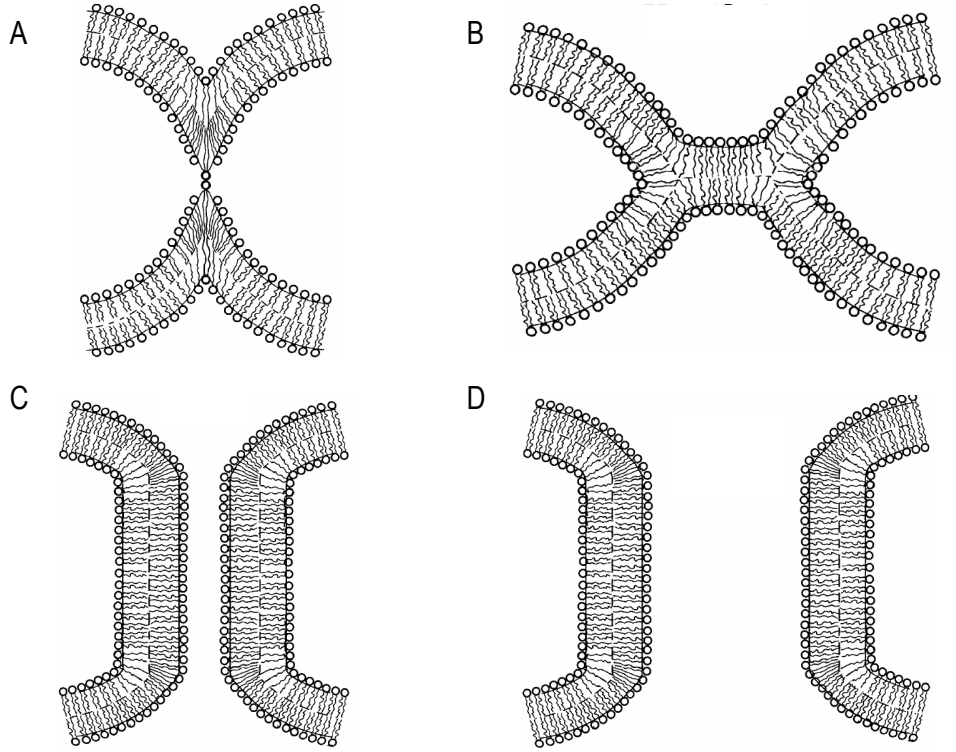

Figura V-1: Conformaciones de las distintas fases de la fusión de membranas. (A) Acercamiento de membranas. (B) "*stalk*". (C) Formación del poro de fusión. (D) Expansión del poro de fusión. Modificado de (Cohen and Melikyan, 2004).

El desconocimiento de la estructura molecular del poro de fusión generó un modelo en el que el hinchamiento de la matriz que produce el intercambio iónico una vez formado el poro de fusión podría ejercer de fuerza motriz para su expansión y fusión completa (Monck et al., 1991). Según este modelo, las proteínas solo catalizarían el proceso inicial de fusión de membranas. Una vez formado el canal acuoso entre el medio extracelular y el interior vesicular, el proceso de expansión no necesita proteínas con actividad enzimática. Durante el proceso de expansión del poro, la incorporación de moléculas de lípidos al anillo estaría provocada por la expansión que provoca el hinchamiento de la matriz.

Los experimentos mostrados en esta tesis en mastocitos carentes de matriz de heparina han concluido que no hay implicación evidente de la matriz intravesicular en la fase de expansión del poro. Esto se ha comprobado mediante la medida de dos parámetros obtenidos independientemente mediante dos técnicas distintas. Con la medida de la capacidad se ha

comprobado que el tiempo de apertura del poro de fusión no varía en ausencia de matriz intravesicular. Las primeras etapas de la fase de expansión pueden detectarse eléctricamente y, para estimar la duración de esta primera etapa, se recurre al tiempo que tarda el salto de capacidad en llegar a su máximo nivel. El otro parámetro utilizado es el retraso entre el salto de capacidad y el comienzo de la espiga amperométrica, el cual también depende del tiempo de expansión del poro de fusión. Un mayor retraso implica una apertura del poro más lenta. Los experimentos realizados en los mastocitos carentes de matriz intravesicular demuestran que ninguno de estos parámetros están afectados, concluyendo que la matriz de heparina no influye en la fase de expansión del poro de fusión.

Con el objetivo de indagar en los mecanismos moleculares de la regulación del poro de fusión, en este trabajo se ha barajado la posibilidad de que la regulación de la fase de expansión del poro de fusión recaiga en un componente proteico de la célula. Esta posibilidad adquiere mayor fuerza tras la demostración de que la matriz intravesicular no es el desencadenante de la expansión del poro de fusión. Como se comprobó mediante la combinación de la técnica de la medida de la capacidad eléctrica de membrana y la amperometría, la ausencia de la proteína SCAMP1 altera las propiedades dinámicas del poro de fusión exocitótico. En el siguiente apartado se discute el papel que pudiera tener dicha proteína durante la última fase de la fusión de membranas del proceso secretor.

3. PAPEL DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN EL PROCESO SECRETOR

La familia de proteínas SCAMP está formada por proteínas integrales de membrana conservadas en todos los eucariotas estudiados. Las proteínas SCAMP se localizan en el sistema de membranas intracelular de la célula (Brand et al., 1991). Posteriores trabajos permitieron atribuirles la función de estar implicados en el proceso de reciclado de membrana en compartimentos tales como endosomas y vesículas de transporte (Brand and Castle, 1993; Laurie et al., 1993; Wu and Castle, 1997; Fernandez-Chacon et al., 2000). Como era de esperar, las proteínas SCAMP también han sido halladas en la membrana plasmática de los mastocitos (Castle et al., 2002).

La mayoría de las proteínas de la familia SCAMP presentan un tamaño de 25 a 28 kDa y de 230 a 344 residuos de aminoácidos (Hubbard et al., 2000). Las proteínas pertenecientes a esta familia contienen los extremos amino y carboxilo terminales en el citoplasma. Entre estos extremos se encuentran 4 segmentos transmembrana unidos entre si por lazos anfifílicos (fig. V-2). El lazo que une los segmentos transmembrana 2 y 3 es denominado péptido E y es la región mas conservada de toda la familia y sólo se ha encontrado en la familia SCAMP. Otra peculiaridad no presente en todos los miembros de la familia SCAMP es la existencia en el extremo amino terminal de las repeticiones NPF. Cada repetición consiste en los aminoácidos asparagina, prolina y fenilalanina (Hubbard et al., 2000). Las repeticiones NPF actúan como ligandos de los dominios EH implicados en el reciclado de membrana mediado por clatrina (Fernandez-Chacon et al., 2000).

En mastocitos se han identificado los miembros SCAMP1, SCAMP2 y SCAMP3 todos de 38 kDa siendo SCAMP1 y SCAMP2 más abundantes que SCAMP3. Ensayos para determinar la localización celular mediante inmunocitoquímica y fraccionamiento celular han mostrado que SCAMP1 y SCAMP2 están colocalizados en agregados tanto en la membrana plasmática como en la membrana de las vesículas secretoras. Técnicas de doble marcaje indican que existe una colocalización de estas dos SCAMP con la sintaxina 4 y SNAP-23, sugiriendo una relación funcional (Castle et al., 2002).

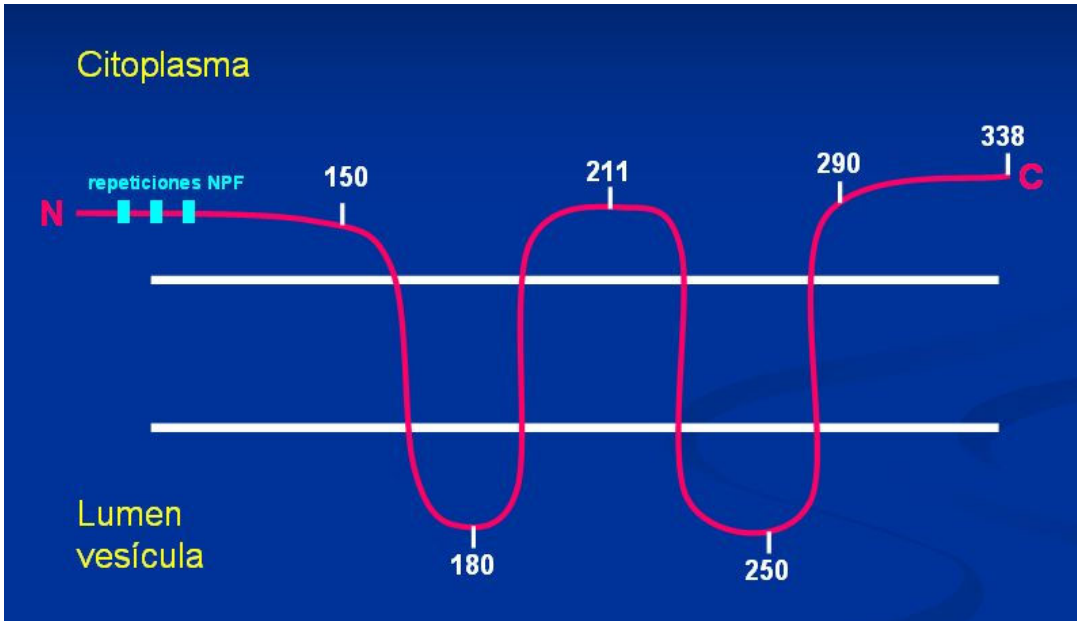

Figura V-2: Estructura y disposición de SCAMP1 en la membrana vesicular. Tanto los extremos amino y carboxilo terminal como las repeticiones NPF quedan en el lado citoplasmático.

Se ha demostrado la implicación de SCAMP1 y SCAMP2 en el proceso secretor en mastocitos y, más concretamente, en la última fase de la fusión de membranas. Los estudios con el péptido sintético E que posee la secuencia perteneciente a la región más conservada de SCAMP2 han demostrado que es un potente inhibidor de una etapa posterior a la fase de anclaje o *docking* de la fusión de membranas en mastocitos (Castle et al., 2002). Pequeñas modificaciones en la secuencia de este péptido sintético, principalmente en la región amino terminal, elimina la inhibición, y la sustitución del residuo de lisina por glicina, tal y como se encuentra en SCAMP1, reduce la inhibición en un orden de magnitud (Castle et al., 2002). La isoforma SCAMP2 se encuentra en cantidad significativa tanto en la membrana celular como en la membrana vesicular. Esto hace pensar que en ambos lugares adquiere una función determinada. Modificaciones en la secuencia de la región correspondiente al péptido E de SCAMP2 muestran en micrografías electrónicas un aumento en los contactos entre membranas, tanto vesícula-membrana como vesícula-vesícula. A partir de estos datos hace pensar en un modelo en el que SCAMP2 también está implicada en la fusión de membranas en la exocitosis compuesta (Castle et al., 2002).

3.1. Nivel de expresión de SCAMP1 en mastocitos

En un reciente trabajo comentado anteriormente en esta tesis se han descrito cuantitativamente todas las proteínas de la vesícula sináptica (Takamori et al., 2006). Los datos cuantitativos que muestra este trabajo son que existen 0.8 moléculas de SCAMP1 por vesícula sináptica. En este trabajo también se describe cuantitativamente la estructura de la vesícula sináptica, la cual presenta un diámetro externo de 41.6 nm. A partir del diámetro se puede calcular la superficie de una vesícula que es de 5.44 x 10^{-3} μm^2. Nuestros registros de la capacidad eléctrica de la membrana en mastocitos indican que la superficie media de una vesícula secretora es de 1.6 μm^2 y de 11 μm^2 en el caso de los mastocitos *beige*. Si asumimos que el número de moléculas por unidad de superficie de SCAMP1, la isoforma más abundante en neuronas, se mantiene en mastocitos, se obtiene que una vesícula secretora contiene 230 moléculas de SCAMP1. Si la vesícula secretora es de mastocito de ratón *beige*, este número es de 1610 moléculas. A pesar de que el número de moléculas de SCAMP1 en los mastocitos no es elevado, la hipótesis de un papel regulador en la última fase del proceso secretor está avalada por experimentos de inmunolocalización. Mediante este tipo de aproximación experimental, se ha demostrado que tanto SCAMP1 como SCAMP2 colocalizan en agregados puntuales con las SNARE propias de los mastocitos: SNAP-23 y sintaxina 4 (Castle et al., 2002).

3.2. Alteraciones morfológicas de los mastocitos en ausencia de SCAMP1

En lo que respecta a los mastocitos, morfológicamente no existe ninguna evidencia de alteración respecto a un mastocito procedente de un ratón *beige*. Nuestros experimentos han mostrado que el tamaño inicial de los mastocitos de ratones *beige* es independiente de la proteína SCAMP1, lo que confirma los datos anteriores aportados en mastocitos con tamaño de vesícula secretora normal (Fernandez-Chacon et al., 1999). Los datos de la capacidad final obtenidos en mastocitos *beige* muestran una gran dispersión especialmente en las que no expresan SCAMP1: 11.61 $\pm$ 2.16 pF en el control y 10.77 $\pm$ 3.51 en el mutante (media $\pm$ d.e.). Aunque las diferencias no son significativas, la gran dispersión puede deberse a la imposibilidad de registrar las desgranulaciones completas en los mastocitos *beige*. Este problema experimental se debe a que la fusión de las vesículas secretoras, por su gran tamaño, pueden ocasionar la inestabilidad del sello y la pérdida de la configuración necesaria para la monitorización de la capacidad eléctrica de la membrana. Es importante destacar esto porque experimentos realizados en mastocitos normales han mostrado ligeras diferencias en la

capacidad final entre los controles y los mutantes para SCAMP1 (Fernandez-Chacon et al., 1999). En nuestros experimentos es posible que este hecho esté enmascarado por el menor número de vesículas secretoras disponibles y por los problemas de estabilidad comentados anteriormente. La disminución de la capacidad final en ausencia de SCAMP1 puede deberse al aumento de eventos de fusión reversibles, siendo estos eventos muy poco frecuentes en las mastocitos *beige*. Es por ello complicado confirmar esta observación con el uso de mastocitos *beige*.

Los datos obtenidos de la monitorización individual del proceso de fusión de las vesículas secretoras muestran que no hay diferencias en el tamaño de las vesículas secretoras entre la dos líneas de ratones, descartando así la implicación de SCAMP1 en la biogénesis de las vesículas.

3.3. Cinética de la secreción de serotonina en ausencia de SCAMP1

La liberación detectable mediante amperometría de serotonina procedente de la desgranulación de los mastocitos *beige* en respuesta a la aplicación de GTPγS de forma intracelular fue descrita anteriormente (Alvarez de Toledo et al., 1993). La obtención de espigas en las condiciones experimentales detalladas en el apartado “materiales y métodos” demuestra que los mastocitos beige que no expresan SCAMP1 pueden secretar serotonina. Esto nos permitió monitorizar en nuestros experimentos la cinética de la liberación de este secretagogo.

Los parámetros de las espigas amperométricas que hemos medido ofrecen información sobre la tasa de liberación de serotonina. Como toda medida amperométrica, el factor de la difusión es de vital importancia a la hora de sacar conclusiones. La anchura a media altura, tiempo al pico y la carga no presentan diferencias entre las líneas de ratones *beige* y SCAMP1-beige. El único parámetro que distingue entre mastocitos control y las que no expresan SCAMP1 es la altura de las espigas. La altura de las espigas mutantes es de 48.07 pA frente a los 31.25 pA de las controles. Esta diferencia en un primer análisis puede explicarse mediante una tasa de liberación más rápida en el caso de la ausencia de SCAMP1. Sin embargo, en el resto de parámetros cinéticos existen diferencias pero éstas no son destacables. Una tasa de liberación más rápida se asocia con, además de con una mayor altura, con una menor anchura a media altura y un menor tiempo al pico. El menor número de eventos por desgranulación que tienen los mastocitos de la línea de ratones *beige* comparado con los mastocitos normales puede generar espigas amperométricas en las que el factor difusional enmascare la tasa de liberación. Como ya

se comentó anteriormente, el lugar donde se inicia la fusión de membranas y se produce la liberación condiciona los parámetros cinéticos de las espigas amperométricas a causa de la difusión. Si las eventos secretores que ocurren en una desgranulación se encuentran predominantemente alejados del detector amperométrico, las características de las espigas tendrán un importante componente difusional que impedirá inferir con seguridad las características cinéticas de la liberación de serotonina.

Debido a que nuestros experimentos de monitorización de la secreción de serotonina a nivel de vesícula única en mastocitos sin expresión de SCAMP1 son pioneros, los datos que hemos obtenido han de ser interpretados con precaución. La diferencia encontrada en la altura de las espigas puede interpretarse como producto de una mayor tasa de liberación en los mastocitos que no expresan SCAMP1. Pero la ausencia de diferencias en el resto de parámetros estudiados no nos permiten afirmar con seguridad que esto sea cierto.

En un evento de fusión, existen varias causas que pueden provocar un aumento en la tasa de liberación. Una mayor concentración de secretagogo en el interior de la vesícula secretora genera un aumento en el gradiente de concentración que conducirá a un incremento en la tasa de liberación. Otra posibilidad es que el tamaño del poro de fusión sea mayor de forma que el impedimento a ser atravesado por las moléculas de serotonina sea menor. Gracias al uso de los mastocitos de la línea de ratones SCAMP1-beige podemos analizar en detalle las diferencias en la dinámica del poro de fusión en ausencia de SCAMP1. Esto nos permite confirmar si las diferencias observadas en la cinética de la secreción de serotonina se deben a una diferencia en las propiedades dinámicas del poro de fusión.

4. PAPEL DE LA PROTEÍNA SCAMP1 EN EL PORO DE FUSIÓN

Todos los datos aportados en esta tesis respecto a la implicación de las proteínas SCAMP en el proceso secretor se complementan con los obtenidos en experimentos de medida de la capacidad eléctrica de la membrana en mastocitos que no expresan SCAMP1. Estos experimentos muestran que la ablación genética de SCAMP1 genera un defecto en la estabilidad de los poros de fusión (Fernandez-Chacon et al., 1999). En este último trabajo se utilizó la técnica de "*patch-clamp"* para monitorizar la exocitosis en mastocitos. La inestabilidad de los poros de fusión en este trabajo se reflejó principalmente en la modificación de dos parámetros relacionados entre sí: el incremento de la capacidad tras la desgranulación y el número de eventos de fusión reversibles. Los valores iniciales de capacidad son semejantes con o sin la expresión de SCAMP1. Sin embargo, la capacidad final alcanzada si es diferente cuando SCAMP1 no se expresa en los mastocitos. Los registros de la capacidad de la membrana de mastocitos procedentes de ratones que no expresan SCAMP1 presentan un incremento medio de 9.3 pF mientras que los mastocitos silvestres presentan un incremento medio de 15.7 pF. Siguiendo con este mismo trabajo, la otra observación consistió en el aumento del número de eventos reversibles. Este dato es el que muestra la implicación de SCAMP1 en la dinámica del poro de fusión. En este caso, la reversibilidad de la fase de expansión del poro de fusión puede estar potenciada por una carencia estructural que sería proporcionada por SCAMP1.

Dado el tamaño de las vesículas secretoras de los mastocitos, la resolución de la técnica de "*patch-clamp"* en la configuración de célula completa no permite resolver la conductancia de las etapas iniciales del poro de fusión. En nuestro trabajo se han empleado ratones que no expresan la proteína SCAMP1 pero en un fondo genético *beige* en el cual las vesículas secretoras de los mastocitos poseen un tamaño anormalmente grande. En esta situación, la técnica empleada permite resolver la conductancia de las fases iniciales del poro de fusión y comprobar si la ausencia de SCAMP1 afecta a sus características dinámicas.

4.1. Límites en la resolución de la medida de la conductancia del poro de fusión

Como se comentó en el apartado de "*materiales y métodos*" de esta tesis, la técnica de la medida de la capacidad eléctrica de la membrana celular a la hora de resolver la conductancia del poro de fusión posee una limitación teórica que depende del tamaño de la vesícula que se está fusionando. Adicionalmente a este valor máximo teórico, existe otra limitación en cuanto al

máximo valor medible de conductancia. Es posible que debido al ruido presente en todo registro, las proyecciones de la admitancia en los ejes real e imaginario proporcionen valores de conductancia superiores al límite teórico que puede medirse en función del circuito equivalente generado mientras ocurre la fusión de la vesícula secretora. En nuestro análisis de la conductancia del poro de fusión exocitótico el criterio es desechar los valores inferiores a 3 veces la desviación estándar del registro de la parte real de la admitancia De esta forma en cada evento de fusión se pueden desechar los valores de conductancia que, debido al ruido del registro, generan valores de conductancia superiores al límite teórico impuesto por el método del análisis de la admitancia.

4.2. Duración de los poros de fusión en ausencia de SCAMP1

En los mastocitos de la línea de ratones *beige*, la duración de los poros de fusión presentan una gran variabilidad. Este hecho se puede observar incluso en la desgranulación de un mismo mastocito. Dado el gran desconocimiento que existe sobre el mecanismo de la fusión de membranas, es difícil saber si la fase de expansión del poro de fusión es un proceso regulado. Existe la posibilidad de que, una vez catalizada la fusión de membranas por el complejo SNARE, no exista ningún tipo de implicación proteica en el proceso. Como se ha comentado anteriormente, estudios biofísicos han demostrado que tanto las fases iniciales de la fusión de membranas como el aumento del tamaño del poro de fusión son energéticamente desfavorables. Ello hace poco probable descartar la implicación de algún componente proteico en la expansión del poro de fusión.

La proteína SCAMP1 no es necesaria para la expansión del poro de fusión pero su implicación en el proceso está demostrada mediante el estudio de la exocitosis a nivel de vesícula única con la capacidad eléctrica de la membrana (Fernandez-Chacon et al., 1999). Nuestros datos sobre la duración de los poros de fusión muestran que no existe diferencia entre los mastocitos que expresan SCAMP1 y las que no lo hacen. Según este dato, la función de SCAMP1 en la fase de expansión del poro de fusión no es la de aumentar la velocidad del proceso lo que indicaría una función catalítica en el proceso. Este hallazgo hace pensar en un papel predominantemente estructural más que catalítico. La hipótesis de la función estructural de SCAMP1 en el proceso de fusión está apoyada por los dominios que posee en su secuencia.

Los dominios NPF presentes en SCAMP1 presentan interacciones proteína-proteína con los dominios EH (Eps15 homology domains,(de Beer et al., 1998; Salcini et al., 2001)). De este modo, SCAMP1 interacciona con proteínas como la intersectina 1 y la γ-sinergina a través de la interacción tipo NPF/EH (Fernandez-Chacon et al., 2000). La intersectina presenta una función de andamiaje conectando la endocitosis con procesos de reordenamiento de actina. (Simpson et al., 1999). Es por ello muy probable que SCAMP1 ejerza su función en la dinámica del poro de fusión a través de su interacción con componentes del citoesqueleto.

4.3. Valores de conductancia de los poros de fusión en ausencia de SCAMP1

Nuestros experimentos han demostrado que los valores de conductancia del poro de fusión en ausencia de la proteína SCAMP1 son mayores que en condiciones normales. Bajo la hipótesis de una función estructural de SCAMP1, esta proteína podría actuar como un impedimento a la expansión del poro de fusión, estableciendo interacciones entre las membranas implicadas y el citoesqueleto. Existe un modelo de funcionamiento de SCAMP2 que la relaciona con la maquinaria de fusión en células PC12 (Liu et al., 2005). Según este modelo SCAMP2 actúa como lugar de reclutamiento de varias proteínas implicadas en la fusión de membranas. En este mismo trabajo se ha demostrado mediante amperometría que la mutación puntual W202A en SCAMP2 provoca una alteración en la tasa de secreción que es atribuida a una alteración en la dilatación del poro de fusión. A esta conclusión se ha llegado mediante la interpretación de los datos que señalan una variación en la proporción entre eventos que generan espigas amperométricas y eventos de liberación parcial sin espiga amperométrica. La frecuencia de aparición de este último tipo de eventos está aumentada en las células PC12 transfectadas con la secuencia correspondiente a SCAMP2 con la mutación W202A. Según esta hipótesis, SCAMP2 aumenta la probabilidad de una fusión completa en contra de los eventos reversibles de fusión. Es importante destacar que la mutación W202A está situada en la región correspondiente al péptido E, donde reside la diferencia de secuencia entre SCAMP1 y SCAMP2. Este hecho indica que una pequeña variación en la secuencia de SCAMP2 puede afectar drásticamente a la dilatación del poro de fusión.

En el caso de nuestros datos con ratones mutantes para SCAMP1, SCAMP1 podría actuar como contención de la dilatación del poro que otras proteínas como SCAMP2 pueden favorecer. De esta forma el equilibrio entre ambas isoformas de SCAMP puede cambiar las propiedades de la fase de expansión del poro de fusión. Dado que SCAMP1 no es necesaria para la exocitosis su función ha de ser reguladora.

4.4. Curso temporal de la fase de expansión del poro de fusión en ausencia de SCAMP1

Mediante la técnica de la amperometría en parche (Albillos et al., 1997) en mastocitos se han resuelto las distintas fases que constituyen la fase de expansión del poro de fusión (Tabares et al., 2003). Con el uso de esta técnica, se pueden distinguir varias fases en función del incremento de conductancia que presentan. Las duraciones relativas de cada una de las fases varían en cada evento de fusión. En la figura V-3 se muestra un esquema que representa las distintas fases de la expansión del poro de fusión que se pueden distinguir mediante la técnica de medida de la capacidad eléctrica de membrana en la configuración de "*cell-attached*" de la amperometría en parche.

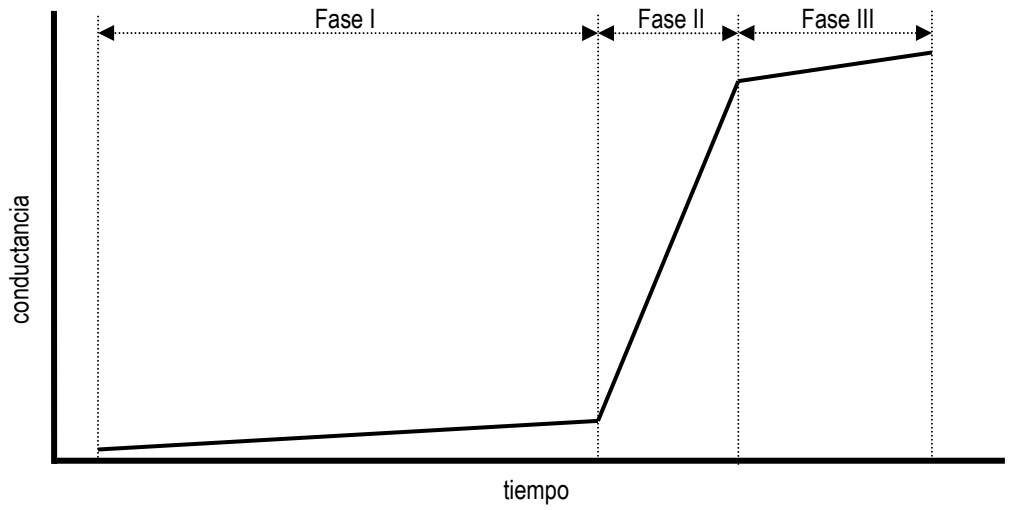

Figura V-3: Esquema representativo de las distintas fases de la expasión del poro de fusión en mastocitos registrados mediante la técnica de *"patch-amperometry"*. La primera fase se describe con una tasa de apertura de 5 nS / s. La segunda con 1000 nS / s y la tercera con una tasa similar a la primera fase. Con esta configuración, se pueden monitorizar conductancias superiores a pS. Modificado de (Tabares et al., 2003).

A diferencia de la técnica de la amperometría en parche, la medida de la capacidad eléctrica de la membrana en la configuración de célula completa no permite la medida de los poros de fusión más allá de varios cientos de nanosiemens de conductancia en mastocitos de ratones *beige* y siempre en función del tamaño de la vesícula. A pesar de esta limitación nuestros registros confirman la presencia de distintas fases en la expansión del poro de fusión. Es importante destacar que la existencia de las 3 fases anteriormente comentadas se describen mediante el uso de la configuración de "*cell-attached*" que permite medir conductancias del poro de fusión del orden de microsiemens (Tabares et al., 2003). Debido a que la última fase suele presentar conductancias superiores a varias centenas de nanosiemens, nuestra configuración no

puede resolver esta última fase de la expansión del poro de fusión. Es por ello que en los registros realizados en la configuración de célula completa solamente se distinguen dos fases con distinta cinética. En nuestros registros existe una corta primera fase inicial con un abrupto incremento en la conductancia que no presenta diferencias entre los poros de fusión de los mastocitos *beige* y las procedentes de la línea de ratones SCAMP1-beige (fig. V-4). Nuestra discusión se centrará a partir de ahora en las fases de la expansión siguientes a esta corta fase inicial.

En la figura V-4 se pueden apreciar claramente tres fases en la expansión del poro de fusión presentes tanto en los mastocitos control como en las mutantes carentes SCAMP1 tras la normalización respecto al tiempo. En la segunda fase, la expansión es un proceso relativamente lento, aunque ligeramente superior en los poros de fusión de mastocitos mutantes SCAMP1-beige. Es en esta fase dónde el incremento es lineal, con una pendiente de 0.73 y 1.05 nS por unidad de expansión en los controles y mutantes respectivamente.

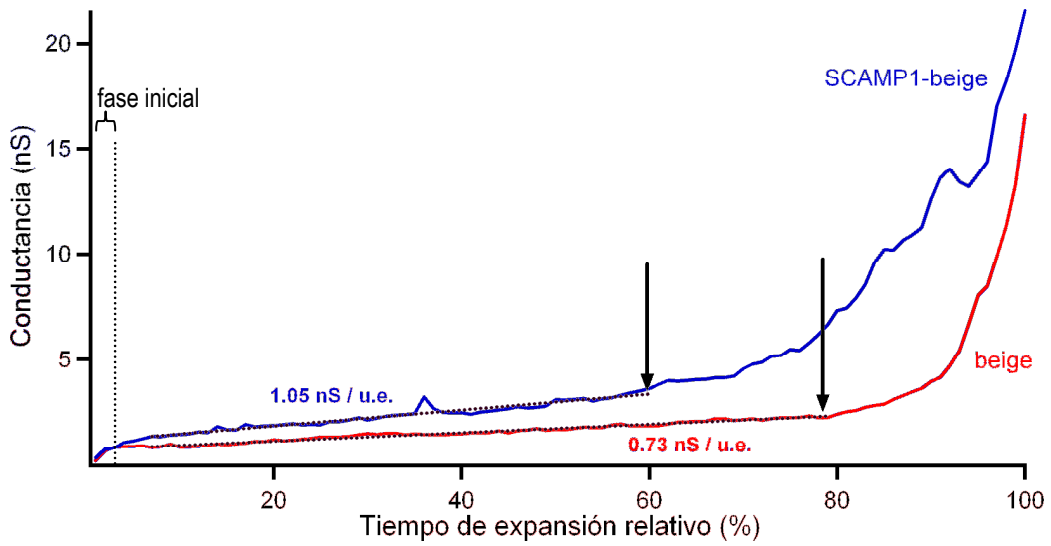

Figura V-4: Comparación de las cinéticas de la conductancia de los poros de mastocitos de ratones *beige* y mutantes SCAMP1-beige. Se muestra el ajuste lineal en la segunda fase de la expansión de la conductancia media de los poros de los dos tipos de células cebadas. Con flechas se señalan los finales de los ajustes lineales que se corresponden con los finales de la segunda fase de la expansión. En los poros control esta fase termina en el 80 % del tiempo de expansión mientras que en ausencia de SCAMP1, la fase exponencial se adelanta y comienza en el 60 % de la fase de expansión. La tasa de expansión en la segunda fase es constante e igual a 0.73 nS por unidad de expansión (u.e.) en la media de las conductancias control y 1.05 nS por unidad de expansión en la media de las conductancias mutantes.

Para la descripción de la tercera fase, nuestro planteamiento inicial consistió en la realización de un ajuste a una función exponencial. En ninguno de los dos casos, ni en el control

ni en el mutante, las funciones exponenciales se ajustan adecuadamente a la tercera fase de las medias de las conductancias. Para solucionar este hecho, recurrimos a la hipótesis de que la segunda fase de expansión fuese el resultado de la continuación de la fase de incremento lineal y de un segundo componente exponencial (fig. V-5). Esta hipótesis, se puede representar matemáticamente como una función que nos proporciona la conductancia del poro de fusión respecto al tiempo (t)

$$G_P = A \cdot t + B \cdot e^{C \cdot t}$$

donde A es la pendiente del componente lineal presente a lo largo de toda la expansión y que se ha estimado anteriormente en los poros control y mutantes, y B y C definen el componente exponencial. Dado que el componente lineal se mantiene a lo largo de toda la fase de expansión, realizando una resta aritmética podemos eliminar este componente y comprobar si el otro componente responde a una cinética exponencial.

La representación de esta aproximación matemática se muestra en la figura V-6. En ella se comprueba que existe un componente exponencial adicional al componente lineal que permite explicar la cinética observada al promediar las conductancias de los poros control y los mutantes y normalizarlos respecto al tiempo. Tras eliminar el componente lineal con una pendiente de 0.72 nS por unidad de expansión, la cinética resultante se ajusta de forma óptima a una función exponencial de parámetros B = 7.18 x 10^{-9} y C = 0.21. Si aplicamos el mismo análisis a la conductancia media de los poros de los mastocitos mutantes que no expresan SCAMP1, se obtiene una pendiente del componente lineal de 1.05 nS por unidad de expansión. Tras eliminar este componente, el ajuste al componente exponencial ofrece unos parámetros de B = 3.5 x 10^{-3} y C = 0.085 (fig. V-6).

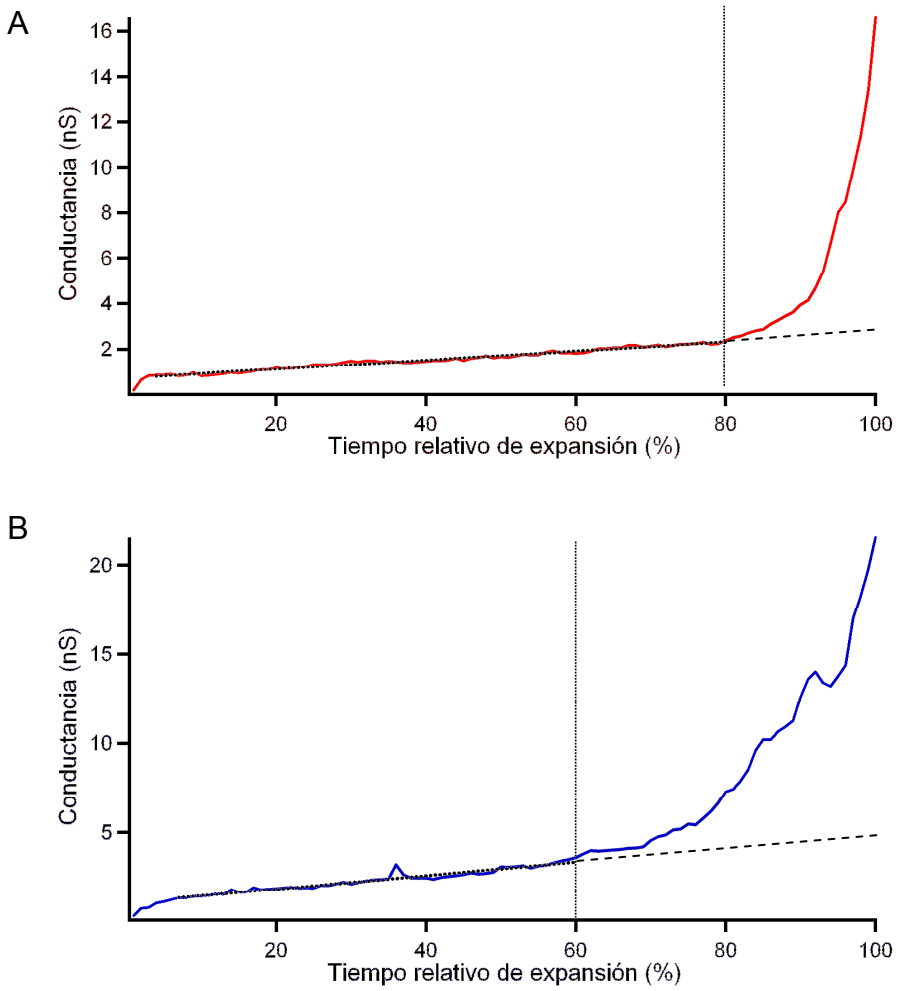

Figura V-5: (A) Conductancia media normalizada respecto al tiempo de los poros registrados en mastocitos control. El componente lineal se obtiene mediante un ajuste lineal a patir de la primera fase de expansión del poro hasta el 80 % del tiempo de expansión. (B) Conductancia media normalizada respecto al tiempo de los poros registrados en mastocitos mutantes de la línea SCAMP1-beige. Igual que en (A), la primera fase de la expansión se representa por el ajuste lineal. La pendiente es de 0.72 nS por unidad de expansión en el control y de 1.05 nS por unidad de expansión en ausencia de SCAMP1. En ninguno de los dos casos la segunda fase de la expansión se ajusta de forma óptima a una función exponencial. Los ajustes lineales se prolongan más allá de la región empleada para realizar el ajuste lineal, indicando que el primer componente está presente a lo largo de todo el proceso de expansión.

Una vez demostrado que la cinética de la expansión del poro de fusión es el resultado de dos componentes se puede hacer una comparación más detallada entre los poros de fusión de ratones control y los de ratones mutantes. Los datos obtenidos en nuestros experimentos y el posterior análisis han mostrado que el componente lineal existe a lo largo de toda la expansión del poro. La primera diferencia entre los poros control y mutantes es la pendiente de este componente, que representa la tasa de apertura del poro de fusión.

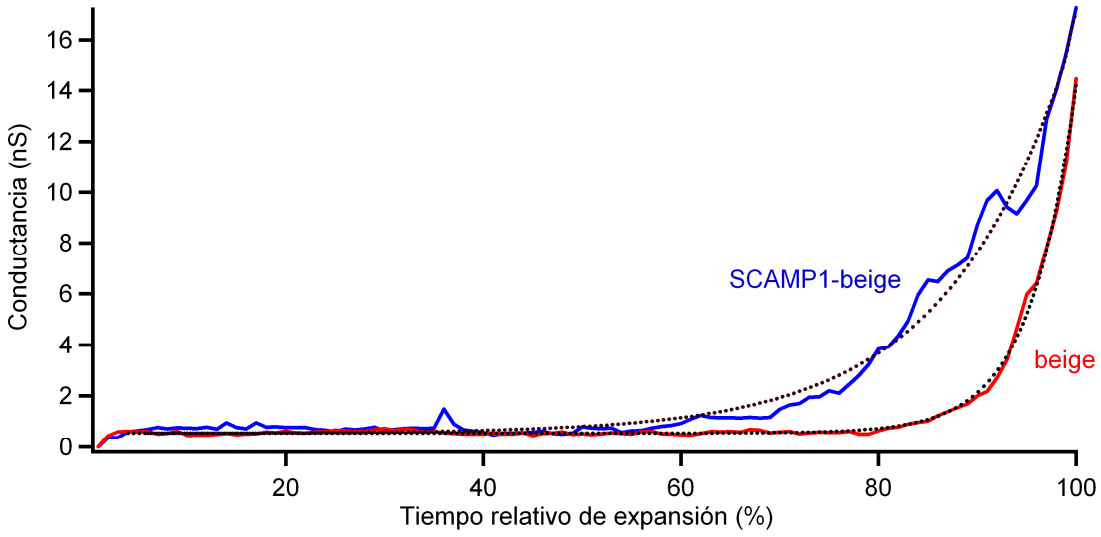

Figura V-6: Comparación de los componentes exponenciales de los cursos temporales de la apertura de los poros de fusión de mastocitos *beige* y carentes de SCAMP1 (SCAMP1-beige). El ajuste a las funciones exponenciales explica las diferencias encontradas en cuanto al comienzo de la segunda fase.

Adicionalmente al componente lineal, el segundo componente, que presenta una cinética exponencial, no interviene en toda la fase de expansión y es la responsable de la aparición de una tercera fase con una tasa de apertura mucho mayor que la fase anterior. Es el comienzo de su aportación al aumento de conductancia de esta fase lo que señala otra diferencia entre la cinética de apertura de los poros de fusión control y los mutantes. En el caso de los controles, el aumento de conductacia debido a la segunda fase de la expansión comienza aproximadamente tras el 80 % del tiempo total de expansión. En el caso de los mastocitos de la línea de ratones SCAMP1-beige el aumento de la tasa de expansión debido a que el incremento de conductancia debido a la segunda fase del proceso comienza antes que en los controles, trascurrido el 60 % del tiempo de expansión del poro de fusión.

Atendiendo a las características de esta última fase de apertura detectable del poro de fusión, el ajuste a las funciones exponenciales mostradas en la figura V-6 permite conocer las propiedades cinéticas de esta segunda fase de la apertura del poro de fusión. De acuerdo con nuestros ajustes, aunque el componente exponencial está presente a lo largo de todo el proceso de expansión, su aportación al aumento de conductancia no comienza en la fase de expansión desde el principio del proceso como ya se ha comentado anteriormente.

Aunque SCAMP1 no es necesario para la exocitosis ni para la fusión de membranas, todos los datos mostrados confirman su implicación en la última fase del proceso de fusión de

membranas. Este papel queda patente por la modificación de las propiedades cinéticas de la apertura del poro de fusión. Los valores de conductancia son superiores siempre en los poros de fusión de los mastocitos mutantes, aunque no se encuentre afectada la cinética de forma global puesto que el curso temporal de la apertura de los poros de fusión presenta el mismo número de fases. SCAMP1 por lo tanto no determina las características cinéticas básicas del proceso pero ha de presentar un papel modulador en el proceso de expansión.

La conductancia es mayor si no hay expresión de SCAMP1 a lo largo de toda la fase de expansión debido a que los dos componentes que constituyen el curso temporal presentan valores superiores. De acuerdo con nuestros ajustes matemáticos de las distintas fases de la expasión del poro de fusión, existen dos posibilidades que expliquen estas diferencias basándonos en los datos que demuestran el papel regulador de SCAMP1 en la expansión del poro de fusión.

La primera posibilidad es que la función de SCAMP1 consista en el control de la tasa de expansión exclusivamente en el componente lineal de la apertura. Es importante señalar que modelos teóricos demuestran que cada una de las fases de la expansión presenta unos requerimientos energéticos distintos (Curran et al., 1993). En estos trabajos se indica que, debido a los valores de curvatura de la membrana, la energía necesaria para la expansión del poro de fusión es mayor en la fase de incremento constante que en la posterior fase de crecimiento exponencial. Es por ello que se acepta que a partir de cierto tamaño del poro, los requerimientos de energía son menores y se favorece así la expansión con una cinética exponencial típica de la tercera fase del proceso de apertura.

SCAMP1 podría regular una tasa de apertura más lenta disminuyendo la pendiente del componente lineal. La ausencia de esta isoforma puede generar una tasa de apertura mayor en la fase lineal, favoreciendo la entrada en la siguiente fase al disminuir la energía necesaria para la expansión. Esto explicaría el adelanto en el tiempo de la aparición del componente exponencial. Según esta hipótesis, los valores de conductancia a los que el componente exponencial provoca un aumento de conductancia deberían coincidir en los mastocitos control y mutantes. Las medias obtenidas en nuestros registros de conductancia del poro de fusión nos permiten calcular en qué valor de conductancia aparece el componente exponencial. La media de conductancia a la que comienza la fase exponencial es 2.38 ± 0.34 nS en el control y 3.60 ± 0.51 nS en los poros de fusión de los mastocitos de la línea de ratones SCAMP1-beige. Bajo la

misma hipótesis, esta diferencia puede ser explicada por la variabilidad de tamaños de las vesículas secretoras. Diferentes tamaños de vesícula producen pequeñas alteraciones geométricas en las membranas que sufren el proceso de fusión. Se ha demostrado en células PC12 que el volumen vesicular tiene efectos en las características del poro de fusión, alterando la cinética de la secreción (Sombers et al., 2004). Estas pequeñas variaciones podrían modificar el punto a partir del cual los requerimientos energéticos de la expansión cambian y dan comienzo a la fase exponencial de crecimiento.

El aumento de eventos reversibles que se ha observado en mastocitos normales refuerza la hipótesis de que SCAMP1 esté implicada en las características cinéticas del componente lineal de la fase de expansión (Fernandez-Chacon et al., 1999). Estudios biofísicos teóricos señalan a la fase intermedia de la expansión como un estado semi-estable donde la fusión puede ser un proceso reversible (Curran et al., 1993). El incremento en la aparición de eventos de fusión reversibles en ausencia de SCAMP1 señala a esta proteína como implicada en el componente lineal constituyente del curso temporal de la expansión.

Una segunda interpretación de los datos obtenidos es admitir que la función de SCAMP1 de controlar la apertura del poro esté presente en toda la fase de expansión. Esto explicaría las diferentes propiedades cinéticas del componente exponencial, que no pueden ser explicadas con la hipótesis anterior. De este modo SCAMP1 ejercería de freno al proceso de apertura completo, no permitiendo un curso temporal con los valores de conductancia tan elevados como los que se observan en los poros de fusión de los mastocitos de la línea SCAMP1-beige.

Aunque cualquiera de las dos posibilidades pueden explicar el papel que presenta SCAMP1 en la apertura del poro de fusión, ninguna de las dos hipótesis explica de forma completa los datos. La gran resolución que ofrece la técnica del análisis de la admitancia permite mostrar pequeñas diferencias en el curso temporal de la fase de expansión del poro de fusión entre los mastocitos *beige* control y las procedentes de la línea de ratones SCAMP1-beige. Partiendo de un papel estructural y basándonos en el modelo de dos componentes cinéticos que explican el curso temporal de los valores de conductancia durante la apertura del poro de fusión, hemos podido atribuir una función de retención de este proceso a SCAMP1.

El papel de SCAMP1 en la regulación de la expansión del poro de fusión puede deberse a la interacción con otras proteínas, puesto que se ha demostrado que SCAMP1 puede provocar el

reclutamiento de proteínas implicadas en el tráfico de membrana en múltiples tipos celulares. Otro argumento a favor de esta función de SCAMP1 está en la existencia de proteínas como la epsina que presenta dominios NPF y que induce curvatura de las membranas a través de dominios ENTH (Ford et al., 2002).

Como se comentó en la introducción de este trabajo, la peculiaridad de los mastocitos es que el modo de exocitosis regulada que presentan es del tipo todo o nada. Aunque plantear un sistema de regulación de la secreción a nivel de la expansión del poro de fusión en este tipo celular puede carecer de implicación fisiológica, el descubrimiento de proteínas que están implicadas en el proceso de expansión del poro de fusión permite establecer las bases de una regulación en otros tipos celulares. Por ejemplo, en tipos celulares con alta tasa de liberación y alto nivel de regulación de la respuesta secretora, mecanismos de regulación a nivel del poro de fusión pueden poseer una gran importancia fisiológica. Dado que SCAMP1 se expresa en neuronas, es muy posible que tenga un papel regulador de la tasa de liberación en este tipo celular. En neuronas, la tasa de liberación ha de estar perfectamente controlada y pequeñas variaciones en la conductancia del poro de fusión pueden tener grandes implicaciones fisiológicas. El hecho de no encontrar un fenotipo más evidente en los ratones carentes de SCAMP1 puede explicarse por la existencia de isoformas que asumirían la función de SCAMP1 en su ausencia.

Se conocen varias isoformas de SCAMP cuya implicación en el proceso secretor esta demostrada. A pesar de que se conocen también sus secuencias, estructuras e interacciones, no se conoce con certeza la forma que tienen de ejercer sus funciones en detalle. Esto hace fundamental que se avance en el conocimiento de una familia de proteínas cuyos componentes presentan similitudes de secuencia y de patrones de expresión para dislucidar de qué forma intervienen en el trafico de membranas y, más concretamente, en la última fase de la exocitosis.

5. ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE LA SECRECIÓN MEDIANTE SIMULACIONES

La generación de espigas simuladas mediante el método de Monte Carlo es una aproximación que permite inferir las condiciones en las que se produce el evento secretor. En el diseño de una simulación, se pueden tener en cuenta diversos factores geométricos que permiten el estudio de variables que afecten a la tasa de liberación. En las simulaciones presentadas en el apartado de resultados de esta tesis el principal factor, además de la geometría de la célula y del detector, ha sido la distancia entre el evento y el detector. Mediante estas simulaciones se han generado espigas amperométricas cuyos parámetros cinéticos responden únicamente al factor distancia entre el evento y el detector según un proceso difusional. De este modo se ha demostrado que en ausencia de matriz intravesicular las espigas amperométricas están gobernadas por la difusión. En la secreción de serotonina procedente de vesículas secretoras con heparina, en cambio, la tasa de liberación no puede explicarse únicamente por la difusión, existiendo una modificación respecto al modelo difusional puro. Existe por lo tanto una tasa de liberación de las moléculas de serotonina desde la matriz que enlentece el proceso de secreción.

Una vez demostrado el efecto que tiene la presencia de matriz de heparina en la secreción de serotonina, cabe preguntarse cuales son sus propiedades. Existen modelos biofísicos que explican las propiedades de la unión de las moléculas de serotonina a la matriz intravesicular. Aplicando dichos modelos hemos realizado simulaciones para estimar la tasa de liberación de las moléculas de serotonina desde la matriz. Este proceso ha sido simulado según el modelo de intercambio iónico desde la matriz intravesicular detallado en modelos biofísicos teóricos (Marszalek et al., 1997). Según este modelo, la liberación de serotonina a lo largo del tiempo depende del volumen de la matriz, es decir que el número de moléculas de serotonina liberadas por unidad de tiempo es función del hinchamiento ("*swelling*") de la matriz. El hinchamiento de la matriz se produce debido a la sustitución de las moléculas de serotonina que se encuentran unidas a la matriz por cationes monovalentes y moléculas de agua. El radio de la matriz r(t), durante el hinchamiento responde a la siguiente ecuación:

$$r(t) = r_f - (r_f - r_0)e^{(-t/\tau)} \quad (1)$$

siendo r_f el valor del radio máximo que puede alcanzarse, r_0 el radio inicial y $\tau = r_f^{\,2}/(D_{gel}\pi^2)$.

D_{gel} es el coeficiente de difusión de la matriz.

Para indagar en el papel de la matriz en la cinética de liberación, se plantea la pregunta de cómo afecta el tamaño de la vesícula y por lo tanto el tamaño de la matriz a la tasa de liberación. Para responder a esta pregunta hemos calculado la tasa de liberación que proporcionan matrices de distinto tamaño. El flujo de moléculas que la matriz proporciona durante su hinchamiento es función de su volumen. El volumen de una esfera, depende del radio según la fórmula

$$V(t) = \frac{4}{3} \cdot \pi \cdot r(t)^3 \qquad (2)$$

Si sustituimos en la fórmula del volumen el radio con la ecuación (1), la liberación de moléculas en función del tiempo , R(t) queda

$$R(t) = K \cdot 4\pi \cdot (r_f - (r_f - r_0) \cdot e^{-t/\tau})^2 (1/\tau)(r_f - r_0) \cdot e^{-t/\tau} \qquad (3)$$

Nuestro objetivo es conocer la tasa de liberación en matrices intravesiculares de distintos tamaños, por lo que nos interesa obtener una expresión que nos relacione la tasa de liberación con el tamaño de la matriz, esto es, con su radio. Para ello hallamos la relación entre el tiempo y el radio despejando de la expresión (1)

$$r(t) = r_f - (r_f - r_0) \cdot e^{-t/\tau} \rightarrow t = \tau \ln\left(\frac{r_f - r_0}{r_f - r}\right) \qquad (4)$$

y sustituyendo el tiempo por su expresión en la ecuación (3), obtenemos

$$R(r) = k \cdot 4\pi \cdot r^2 \cdot (1/\tau) \cdot (r_f - r_0) \cdot \left(\frac{r_f - r}{r_f - r_0}\right) \qquad (5)$$

Esta expresión nos permite calcular la liberación de moléculas procedentes de una matriz entre los valores de radio inicial, el cual sería el radio en su estado condensado r_0, y r_f que es el radio final. Dando distintos valores a los radios inicial y final podemos hacer una comparación de la cinética de liberación desde matrices de distinto tamaño (fig. V-7).

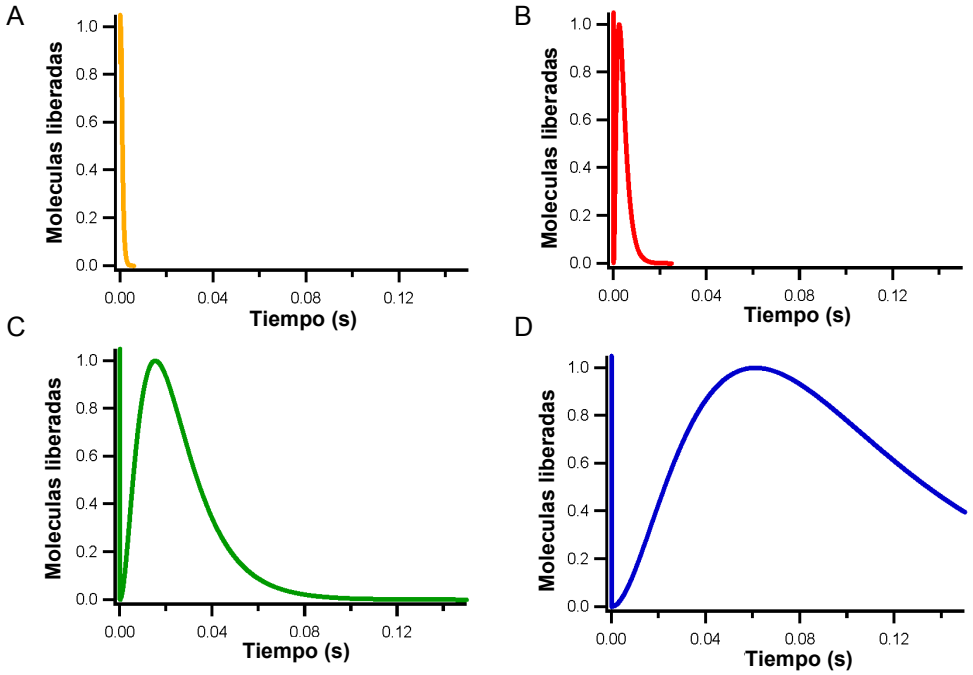

Figura V-7: Liberación normalizada de moléculas procedentes de matrices de distinto tamaño y con distinto incremento de volumen. Los incrementos de radio utilizados son (A) 100-250 nm, (B) 200-500 nm, (C) 300-750 nm y (D) 400-1000 nm. Se considera un 30 % del contenido de la vesícula no unido a la matriz, lo que genera una rápida liberación inicial visible en los tamaños de matriz mayores.

Como puede apreciarse en la figura, las cinéticas son muy distintas para distintos tamaños de vesícula. Hay que tener en cuenta que para todos los tamaños se ha considerado que un 30 % de las moléculas no se encuentran unidas a la matriz. Estas moléculas serían las que primero se liberan y generarían el pie amperométrico tras atravesar el poro de fusión. Es importante destacar que para tamaños pequeños de matriz la tasa de liberación es mucho más rápida que en matrices intravesiculares grandes. En el primer caso la liberación de la matriz se solapa con la liberación de las moléculas no unidas a ella, lo que demuestra que el papel de la matriz en la tasa de liberación es prácticamente nulo. A medida que los tamaños de matriz aumentan, existe una mayor diferencia temporal entre la liberación de las moléculas no unidas a la matriz y las que sí son liberadas durante el hinchamiento, lo que aumenta la duración de los pies amperométricos. Estos datos confirman la relación entre la duración (Alvarez de Toledo et al., 1993) y la carga (Sombers et al., 2004) de los pies amperométricos y el tamaño de la vesícula secretora.

La implicación de la matriz intravesicular en la tasa de secreción en función de su tamaño puede hacer pensar que las diferencias encontradas en la tasa de secreción en los mutantes carentes de heparina se deben a la disminución del tamaño que presentan las vesículas de la línea NDST-2. En los mastocitos de ratón control las vesículas secretoras presentan una media

de 360 nm de radio mientras que los mutantes NDST-2 presentan 260 nm de radio. De acuerdo con nuestras estimaciones, en ambos tamaños la matriz intravesicular afecta a la tasa de liberación de serotonina. Por lo tanto, las diferencias encontradas en las propiedades cinéticas de las espigas están causadas por la ausencia de matriz y no por la disminución del tamaño de la vesícula secretora.

VI. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES:

1. La ausencia de matriz intravesicular de heparina altera la cinética de la exocitosis en mastocitos. La alteración consiste en una menor tasa de incorporación de membrana durante el proceso secretor debido a la menor cantidad de membrana vesicular en el interior de los mastocitos carentes de matriz.
2. Las vesículas secretoras de los mastocitos sin matriz de heparina son de menor tamaño que los de mastocitos normales, lo que explica la menor cantidad de membrana disponible para fusionarse con la membrana plasmática y el menor incremento de superficie de los mastocitos tras la desgranulación.
3. La capacidad de almacenaje de serotonina es inferior en ausencia de matriz intravesicular. De esta forma se demuestra que la matriz de heparina afecta de forma directa a la concentración de serotonina almacenada en las vesículas secretoras.
4. Las propiedades cinéticas de la etapa inicial de expansión del poro de fusión son independientes de la matriz intravesicular, no siendo el hinchamiento de la matriz la fuerza que genera la expansión.
5. La ausencia de matriz de heparina aumenta la tasa de liberación de serotonina, pudiéndose explicar la cinética de liberación mediante un modelo difusional.
6. La expansión del poro de fusión se produce con normailidad en ausencia de matriz de heparina, lo que indica que la expansión del poro de fusión se debe a un proceso activo intrínseco de su estructura molecular.
7. La ausencia de SCAMP1 no afecta a las propiedades secretoras de los mastocitos. No existen diferencias en el tamaño de las vesículas secretoras ni en las características cinéticas de la liberación de serotonina cuando SCAMP1 no se expresa.
8. La duración del poro de fusión es similar en ausencia o presencia de SCAMP1 lo que indica que dicha proteína no tiene un papel catalizador en el proceso de expansión del poro de fusión.
9. Los valores de conductancia son más elevados cuando SCAMP1 no se expresa, mostrando una función estructural en el proceso de expansión del poro de fusión. Las diferencias en los valores de conductancia ocurren a lo largo de toda la fase de expansión, pero estas son máximas en la segunda mitad de la fase de expansión.
10. La función de la proteína SCAMP1 sobre la expansión del poro de fusión puede interpretarse como un freno en el proceso de expansión del poro de fusión. Este efecto podría deberse a una acción inespecífica sobre el poro de fusión. Estudiar la acción de otras proteínas sobre el

poro de fusión ayudará a entender en mejor medida la selectividad o la especificidad de la acción de proteínas sobre el poro de fusión.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Ahnert-Hilger, G., Bader, M.F., Bhakdi, S. and Gratzl, M.: Introduction of macromolecules into bovine adrenal medullary chromaffin cells and rat pheochromocytoma cells (PC12) by permeabilization with streptolysin O: inhibitory effect of tetanus toxin on catecholamine secretion. J Neurochem 52 (1989) 1751-8.

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

Ales, E., Tabares, L., Poyato, J.M., Valero, V., Lindau, M. and Alvarez de Toledo, G.: High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss-and-run mechanism. Nat Cell Biol 1 (1999) 40-4.

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

Alvarez de Toledo, G., Fernandez-Chacon, R. and Fernandez, J.M.: Release of secretory products during transient vesicle fusion. Nature 363 (1993) 554-8.

Alvarez de Toledo, G. and Fernandez, J.M.: The events leading to secretory granule fusion. Soc Gen Physiol Ser 43 (1988) 333-44.

Ammala, C., Eliasson, L., Bokvist, K., Larsson, O., Ashcroft, F.M. and Rorsman, P.: Exocytosis elicited by action potentials and voltage-clamp calcium currents in individual mouse pancreatic B-cells. J Physiol 472 (1993) 665-88.

Artalejo, C.R., Henley, J.R., McNiven, M.A. and Palfrey, H.C.: Rapid endocytosis coupled to exocytosis in adrenal chromaffin cells involves Ca2+, GTP, and dynamin but not clathrin. Proc Natl Acad Sci U S A 92 (1995) 8328-32.

Assaad, F.F., Huet, Y., Mayer, U. and Jurgens, G.: The cytokinesis gene KEULE encodes a Sec1 protein that binds the syntaxin KNOLLE. J Cell Biol 152 (2001) 531-43.

Augustine, G.J. and Neher, E.: Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. J Physiol 450 (1992) 247-71.

Baker, P.F. and Knight, D.E.: Calcium-dependent exocytosis in bovine adrenal medullary cells with leaky plasma membranes. Nature 276 (1978) 620-2.

Baker, P.F. and Knight, D.E.: Calcium control of exocytosis and endocytosis in bovine adrenal medullary cells. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 296 (1981) 83-103.

Baker, P.F. and Whitaker, M.J.: Influence of ATP and calcium on the cortical reaction in sea urchin eggs. Nature 276 (1978) 513-5.

Banerjee, A., Barry, V.A., DasGupta, B.R. and Martin, T.F.: N-Ethylmaleimide-sensitive factor acts at a prefusion ATP-dependent step in Ca2+-activated exocytosis. J Biol Chem 271 (1996) 20223-6.

Baram, D., Adachi, R., Medalia, O., Tuvim, M., Dickey, B.F., Mekori, Y.A. and Sagi-Eisenberg, R.: Synaptotagmin II negatively regulates Ca2+-triggered exocytosis of lysosomes in mast cells. J Exp Med 189 (1999) 1649-58.

Baram, D., Linial, M., Mekori, Y.A. and Sagi-Eisenberg, R.: Ca2+-dependent exocytosis in mast cells is stimulated by the Ca2+ sensor, synaptotagmin I. J Immunol 161 (1998) 5120-3.

Barnard, R.J., Morgan, A. and Burgoyne, R.D.: Stimulation of NSF ATPase activity by alpha-SNAP is required for SNARE complex disassembly and exocytosis. J Cell Biol 139 (1997) 875-83.

Bennett, M.K., Calakos, N. and Scheller, R.H.: Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. Science 257 (1992) 255-9.

Bennett, M.K. and Scheller, R.H.: The molecular machinery for secretion is conserved from yeast to neurons. Proc Natl Acad Sci U S A 90 (1993) 2559-63.

Binz, T., Blasi, J., Yamasaki, S., Baumeister, A., Link, E., Sudhof, T.C., Jahn, R. and Niemann, H.: Proteolysis of SNAP-25 by types E and A botulinal neurotoxins. J Biol Chem 269 (1994) 1617-20.

Bittner, M.A., DasGupta, B.R. and Holz, R.W.: Isolated light chains of botulinum neurotoxins inhibit exocytosis. Studies in digitonin-permeabilized chromaffin cells. J Biol Chem 264 (1989) 10354-60.

Bittner, M.A. and Holz, R.W.: Effects of tetanus toxin on catecholamine release from intact and digitonin-permeabilized chromaffin cells. J Neurochem 51 (1988) 451-6.

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

Borregaard, N., Kjeldsen, L., Lollike, K. and Sengelov, H.: Granules and vesicles of human neutrophils. The role of endomembranes as source of plasma membrane proteins. Eur J Haematol 51 (1993) 318-22.

Brand, S.H. and Castle, J.D.: SCAMP 37, a new marker within the general cell surface recycling system. Embo J 12 (1993) 3753-61.

Brand, S.H., Laurie, S.M., Mixon, M.B. and Castle, J.D.: Secretory carrier membrane proteins 31-35 define a common protein composition among secretory carrier membranes. J Biol Chem 266 (1991) 18949-57.

Breckenridge, L.J. and Almers, W.: Currents through the fusion pore that forms during exocytosis of a secretory vesicle. Nature 328 (1987a) 814-7.

Breckenridge, L.J. and Almers, W.: Final steps in exocytosis observed in a cell with giant secretory granules. Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987b) 1945-9.

Bruns, D. and Jahn, R.: Real-time measurement of transmitter release from single synaptic vesicles. Nature 377 (1995) 62-5.

Bryant, N.J. and James, D.E.: Vps45p stabilizes the syntaxin homologue Tlg2p and positively regulates SNARE complex formation. Embo J 20 (2001) 3380-8.

Burgess, T.L. and Kelly, R.B.: Constitutive and regulated secretion of proteins. Annu Rev Cell Biol 3 (1987) 243-93.

Burgoyne, R.D.: Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. Biochim Biophys Acta 1071 (1991) 174-202.

Burgoyne, R.D.: Fast exocytosis and endocytosis triggered by depolarisation in single adrenal chromaffin cells before rapid Ca2+ current run-down. Pflugers Arch 430 (1995) 213-9.

Burgoyne, R.D. and Barclay, J.W.: Splitting the quantum: regulation of quantal release during vesicle fusion. Trends Neurosci 25 (2002) 176-8.

Burgoyne, R.D. and Cheek, T.R.: Reorganisation of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis. Biosci Rep 7 (1987) 281-8.

Burgoyne, R.D., Fisher, R.J. and Graham, M.E.: Regulation of kiss-and-run exocytosis. Trends Cell Biol 11 (2001a) 404-5.

Burgoyne, R.D., Fisher, R.J., Graham, M.E., Haynes, L.P. and Morgan, A.: Control of membrane fusion dynamics during regulated exocytosis. Biochem Soc Trans 29 (2001b) 467-72.

Burgoyne, R.D. and Handel, S.E.: Activation of exocytosis by GTP analogues in adrenal chromaffin cells revealed by patch-clamp capacitance measurement. FEBS Lett 344 (1994) 139-42.

Burgoyne, R.D. and Morgan, A.: Analysis of regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells: insights into NSF/SNAP/SNARE function. Bioessays 20 (1998a) 328-35.

Burgoyne, R.D. and Morgan, A.: Calcium sensors in regulated exocytosis. Cell Calcium 24 (1998b) 367-76.

Burgoyne, R.D., Morgan, A. and O'Sullivan, A.J.: The control of cytoskeletal actin and exocytosis in intact and permeabilized adrenal chromaffin cells: role of calcium and protein kinase C. Cell Signal 1 (1989) 323-34.

Burns, M.E. and Augustine, G.J.: Synaptic structure and function: dynamic organization yields architectural precision. Cell 83 (1995) 187-94.

Castle, J.D., Guo, Z. and Liu, L.: Function of the t-SNARE SNAP-23 and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) in exocytosis in mast cells. Mol Immunol 38 (2002) 1337-40.

Catterall, W.A.: Structure and function of neuronal Ca2+ channels and their role in neurotransmitter release. Cell Calcium 24 (1998) 307-23.

Catterall, W.A.: Structure and regulation of voltage-gated Ca2+ channels. Annu Rev Cell Dev Biol 16 (2000) 521-55.

Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. and Mauro, A.: Turnover of transmitter and synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. J Cell Biol 57 (1973) 499-524.

Cohen, F.S. and Melikyan, G.B.: The energetics of membrane fusion from binding, through hemifusion, pore formation, and pore enlargement. J Membr Biol 199 (2004) 1-14.

Corcoran, J.J., Wilson, S.P. and Kirshner, N.: Flux of catecholamines through chromaffin vesicles in cultured bovine adrenal medullary cells. J Biol Chem 259 (1984) 6208-14.

Cremona, O. and De Camilli, P.: Synaptic vesicle endocytosis. Curr Opin Neurobiol 7 (1997) 323-30.

Curran, M.J., Cohen, F.S., Chandler, D.E., Munson, P.J. and Zimmerberg, J.: Exocytotic fusion pores exhibit semi-stable states. J Membr Biol 133 (1993) 61-75.

Chamberlain, L.H., Roth, D., Morgan, A. and Burgoyne, R.D.: Distinct effects of alpha-SNAP, 14-3-3 proteins, and calmodulin on priming and triggering of regulated exocytosis. J Cell Biol 130 (1995) 1063-70.

Chandler, D.E.: Membrane fusion as seen in rapidly frozen secretory cells. Ann N Y Acad Sci 635 (1991) 234-45.

Chandler, D.E. and Heuser, J.E.: Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing. J Cell Biol 86 (1980) 666-74.

Chanturiya, A., Chernomordik, L.V. and Zimmerberg, J.: Flickering fusion pores comparable with initial exocytotic pores occur in protein-free phospholipid bilayers. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997) 14423-8.

Chavez-Noriega, L.E. and Stevens, C.F.: Increased transmitter release at excitatory synapses produced by direct activation of adenylate cyclase in rat hippocampal slices. J Neurosci 14 (1994) 310-7.

Cheek, T.R.: Calcium regulation and homeostasis. Curr Opin Cell Biol 3 (1991) 199-205.

Cheek, T.R. and Burgoyne, R.D.: Nicotine-evoked disassembly of cortical actin filaments in adrenal chromaffin cells. FEBS Lett 207 (1986) 110-4.

Cheek, T.R., Morgan, A., O'Sullivan, A.J., Moreton, R.B., Berridge, M.J. and Burgoyne, R.D.: Spatial localization of agonist-induced Ca2+ entry in bovine adrenal chromaffin cells. Different patterns induced by histamine and angiotensin II, and relationship to catecholamine release. J Cell Sci 105 (Pt 4) (1993) 913-21.

Chernomordik, L.V., Zimmerberg, J. and Kozlov, M.M.: Membranes of the world unite! J Cell Biol 175 (2006) 201-7.

Chi, E.Y., Ignacio, E. and Lagunoff, D.: Mast cell granule formation in the beige mouse. J Histochem Cytochem 26 (1978) 131-7.

Chi, E.Y. and Lagunoff, D.: Abnormal mast cell granules in the beige (Chediak-Higashi syndrome) mouse. J Histochem Cytochem 23 (1975) 117-22.

Chizmadzhev, Y.A., Kuzmin, P.I., Kumenko, D.A., Zimmerberg, J. and Cohen, F.S.: Dynamics of fusion pores connecting membranes of different tensions. Biophys J 78 (2000) 2241-56.

Choi, S., Klingauf, J. and Tsien, R.W.: Postfusional regulation of cleft glutamate concentration during LTP at 'silent synapses'. Nat Neurosci 3 (2000) 330-6.

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

Darchen, F. and Goud, B.: Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. Biochimie 82 (2000) 375-84.

Davis, A.F., Bai, J., Fasshauer, D., Wolowick, M.J., Lewis, J.L. and Chapman, E.R.: Kinetics of synaptotagmin responses to Ca2+ and assembly with the core SNARE complex onto membranes. Neuron 24 (1999) 363-76.

de Beer, T., Carter, R.E., Lobel-Rice, K.E., Sorkin, A. and Overduin, M.: Structure and Asn-Pro-Phe binding pocket of the Eps15 homology domain. Science 281 (1998) 1357-60.

DeBello, W.M., O'Connor, V., Dresbach, T., Whiteheart, S.W., Wang, S.S., Schweizer, F.E., Betz, H., Rothman, J.E. and Augustine, G.J.: SNAP-mediated protein-protein interactions essential for neurotransmitter release. Nature 373 (1995) 626-30.

Desai, R.C., Vyas, B., Earles, C.A., Littleton, J.T., Kowalchyck, J.A., Martin, T.F. and Chapman, E.R.: The C2B domain of synaptotagmin is a Ca(2+)-sensing module essential for exocytosis. J Cell Biol 150 (2000) 1125-36.

DiAntonio, A., Parfitt, K.D. and Schwarz, T.L.: Synaptic transmission persists in synaptotagmin mutants of Drosophila. Cell 73 (1993) 1281-90.

Diaz, R., Mayorga, L.S., Weidman, P.J., Rothman, J.E. and Stahl, P.D.: Vesicle fusion following receptor-mediated endocytosis requires a protein active in Golgi transport. Nature 339 (1989) 398-400.

Douglas, W.W.: Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. Br J Pharmacol 34 (1968) 453-74.

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

Eiseman, E. and Bolen, J.B.: Engagement of the high-affinity IgE receptor activates src protein-related tyrosine kinases. Nature 355 (1992) 78-80.

Elhamdani, A., Palfrey, H.C. and Artalejo, C.R.: Quantal size is dependent on stimulation frequency and calcium entry in calf chromaffin cells. Neuron 31 (2001) 819-30.

Eliasson, L., Proks, P., Ammala, C., Ashcroft, F.M., Bokvist, K., Renstrom, E., Rorsman, P. and Smith, P.A.: Endocytosis of secretory granules in mouse pancreatic beta-cells evoked by transient elevation of cytosolic calcium. J Physiol 493 (Pt 3) (1996) 755-67.

Engisch, K.L. and Nowycky, M.C.: Compensatory and excess retrieval: two types of endocytosis following single step depolarizations in bovine adrenal chromaffin cells. J Physiol 506 (Pt 3) (1998) 591-608.

Evans, G.J. and Morgan, A.: Phosphorylation-dependent interaction of the synaptic vesicle proteins cysteine string protein and synaptotagmin I. Biochem J 364 (2002) 343-7.

Fasshauer, D., Eliason, W.K., Brunger, A.T. and Jahn, R.: Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. Biochemistry 37 (1998a) 10354-62.

Fasshauer, D., Sutton, R.B., Brunger, A.T. and Jahn, R.: Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998b) 15781-6.

Fernandez-Chacon, R., Achiriloaie, M., Janz, R., Albanesi, J.P. and Sudhof, T.C.: SCAMP1 function in endocytosis. J Biol Chem 275 (2000) 12752-6.

Fernandez-Chacon, R. and Alvarez de Toledo, G.: Cytosolic calcium facilitates release of secretory products after exocytotic vesicle fusion. FEBS Lett 363 (1995) 221-5.

Fernandez-Chacon, R., Alvarez de Toledo, G., Hammer, R.E. and Sudhof, T.C.: Analysis of SCAMP1 function in secretory vesicle exocytosis by means of gene targeting in mice. J Biol Chem 274 (1999) 32551-4.

Fernandez-Chacon, R., Konigstorfer, A., Gerber, S.H., Garcia, J., Matos, M.F., Stevens, C.F., Brose, N., Rizo, J., Rosenmund, C. and Sudhof, T.C.: Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. Nature 410 (2001) 41-9.

Fernandez-Peruchena, C., Navas, S., Montes, M.A. and Alvarez de Toledo, G.: Fusion pore regulation of transmitter release. Brain Res Brain Res Rev 49 (2005) 406-15.

Fernandez, J.M., Neher, E. and Gomperts, B.D.: Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. Nature 312 (1984) 453-5.

Ferro-Novick, S. and Jahn, R.: Vesicle fusion from yeast to man. Nature 370 (1994) 191-3.

Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F. and Meldolesi, J.: Neurotransmitter release: fusion or 'kiss-and-run'? Trends Cell Biol 4 (1994) 1-4.

Fidler, N. and Fernandez, J.M.: Phase tracking: an improved phase detection technique for cell membrane capacitance measurements. Biophys J 56 (1989) 1153-62.

Fisher, R.J., Pevsner, J. and Burgoyne, R.D.: Control of fusion pore dynamics during exocytosis by Munc18. Science 291 (2001) 875-8.

Ford, M.G., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J., Evans, P.R. and McMahon, H.T.: Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. Nature 419 (2002) 361-6.

Forsberg, E., Pejler, G., Ringvall, M., Lunderius, C., Tomasini-Johansson, B., Kusche-Gullberg, M., Eriksson, I., Ledin, J., Hellman, L. and Kjellen, L.: Abnormal mast cells in mice deficient in a heparin-synthesizing enzyme. Nature 400 (1999) 773-6.

Fournier, S. and Trifaro, J.M.: A similar calmodulin-binding protein expressed in chromaffin, synaptic, and neurohypophyseal secretory vesicles. J Neurochem 50 (1988) 27-37.

Furuya, S., Edwards, C. and Ornberg, R.L.: Exocytosis of bovine chromaffin granules in Ficoll captured by rapid freezing. J Electron Microsc (Tokyo) 38 (1989) 143-7.

Geppert, M., Bolshakov, V.Y., Siegelbaum, S.A., Takei, K., De Camilli, P., Hammer, R.E. and Sudhof, T.C.: The role of Rab3A in neurotransmitter release. Nature 369 (1994a) 493-7.

Geppert, M., Goda, Y., Hammer, R.E., Li, C., Rosahl, T.W., Stevens, C.F. and Sudhof, T.C.: Synaptotagmin I: a major Ca2+ sensor for transmitter release at a central synapse. Cell 79 (1994b) 717-27.

Geppert, M., Goda, Y., Stevens, C.F. and Sudhof, T.C.: The small GTP-binding protein Rab3A regulates a late step in synaptic vesicle fusion. Nature 387 (1997) 810-4.

Gerona, R.R., Larsen, E.C., Kowalchyk, J.A. and Martin, T.F.: The C terminus of SNAP25 is essential for Ca(2+)-dependent binding of synaptotagmin to SNARE complexes. J Biol Chem 275 (2000) 6328-36.

Giovannucci, D.R., Hlubek, M.D. and Stuenkel, E.L.: Mitochondria regulate the Ca(2+)-exocytosis relationship of bovine adrenal chromaffin cells. J Neurosci 19 (1999) 9261-70.

Goda, Y. and Sudhof, T.C.: Calcium regulation of neurotransmitter release: reliably unreliable? Curr Opin Cell Biol 9 (1997) 513-8.

Gomperts, B.D.: Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of Ca2+ by receptors. Nature 306 (1983) 64-6.

Graham, M.E. and Burgoyne, R.D.: Comparison of cysteine string protein (Csp) and mutant alpha-SNAP overexpression reveals a role for csp in late steps of membrane fusion in dense-core granule exocytosis in adrenal chromaffin cells. J Neurosci 20 (2000) 1281-9.

Graham, M.E., Fisher, R.J. and Burgoyne, R.D.: Measurement of exocytosis by amperometry in adrenal chromaffin cells: effects of clostridial neurotoxins and activation of protein kinase C on fusion pore kinetics. Biochimie 82 (2000) 469-79.

Graham, M.E., Washbourne, P., Wilson, M.C. and Burgoyne, R.D.: SNAP-25 with mutations in the zero layer supports normal membrane fusion kinetics. J Cell Sci 114 (2001) 4397-405.

Guo, Z., Turner, C. and Castle, D.: Relocation of the t-SNARE SNAP-23 from lamellipodia-like cell surface projections regulates compound exocytosis in mast cells. Cell 94 (1998) 537-48.

Halachmi, N. and Lev, Z.: The Sec1 family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. J Neurochem 66 (1996) 889-97.

Haller, M., Heinemann, C., Chow, R.H., Heidelberger, R. and Neher, E.: Comparison of secretory responses as measured by membrane capacitance and by amperometry. Biophys J 74 (1998) 2100-13.

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

Hanson, P.I., Heuser, J.E. and Jahn, R.: Neurotransmitter release - four years of SNARE complexes. Curr Opin Neurobiol 7 (1997a) 310-5.

Hanson, P.I., Roth, R., Morisaki, H., Jahn, R. and Heuser, J.E.: Structure and conformational changes in NSF and its membrane receptor complexes visualized by quick-freeze/deep-etch electron microscopy. Cell 90 (1997b) 523-35.

Hartmann, J. and Lindau, M.: A novel Ca(2+)-dependent step in exocytosis subsequent to vesicle fusion. FEBS Lett 363 (1995) 217-20.

Hay, J.C. and Martin, T.F.: Resolution of regulated secretion into sequential MgATP-dependent and calcium-dependent stages mediated by distinct cytosolic proteins. J Cell Biol 119 (1992) 139-51.

Hayashi, T., McMahon, H., Yamasaki, S., Binz, T., Hata, Y., Sudhof, T.C. and Niemann, H.: Synaptic vesicle membrane fusion complex: action of clostridial neurotoxins on assembly. Embo J 13 (1994) 5051-61.

He, P., Southard, R.C., Chen, D., Whiteheart, S.W. and Cooper, R.L.: Role of alpha-SNAP in promoting efficient neurotransmission at the crayfish neuromuscular junction. J Neurophysiol 82 (1999) 3406-16.

Heidelberger, R., Heinemann, C., Neher, E. and Matthews, G.: Calcium dependence of the rate of exocytosis in a synaptic terminal. Nature 371 (1994) 513-5.

Heinemann, C., Chow, R.H., Neher, E. and Zucker, R.S.: Kinetics of the secretory response in bovine chromaffin cells following flash photolysis of caged Ca2+. Biophys J 67 (1994) 2546-57.

Heinemann, C., von Ruden, L., Chow, R.H. and Neher, E.: A two-step model of secretion control in neuroendocrine cells. Pflugers Arch 424 (1993) 105-12.

Henkel, A.W., Horstmann, H. and Henkel, M.K.: Direct observation of membrane retrieval in chromaffin cells by capacitance measurements. FEBS Lett 505 (2001) 414-8.

Hide, I., Bennett, J.P., Pizzey, A., Boonen, G., Bar-Sagi, D., Gomperts, B.D. and Tatham, P.E.: Degranulation of individual mast cells in response to Ca2+ and guanine nucleotides: an all-or-none event. J Cell Biol 123 (1993) 585-93.

Hilfiker, S., Czernik, A.J., Greengard, P. and Augustine, G.J.: Tonically active protein kinase A regulates neurotransmitter release at the squid giant synapse. J Physiol 531 (2001) 141-6.

Hohl, T.M., Parlati, F., Wimmer, C., Rothman, J.E., Sollner, T.H. and Engelhardt, H.: Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. Mol Cell 2 (1998) 539-48.

Hohne-Zell, B. and Gratzl, M.: Adrenal chromaffin cells contain functionally different SNAP-25 monomers and SNAP-25/syntaxin heterodimers. FEBS Lett 394 (1996) 109-16.

Holz, R.W., Bittner, M.A., Peppers, S.C., Senter, R.A. and Eberhard, D.A.: MgATP-independent and MgATP-dependent exocytosis. Evidence that MgATP primes adrenal chromaffin cells to undergo exocytosis. J Biol Chem 264 (1989) 5412-9.

Holz, R.W., Senyshyn, J. and Bittner, M.A.: Mechanisms involved in calcium-dependent exocytosis. Ann N Y Acad Sci 635 (1991) 382-92.

Howell, T.W., Cockcroft, S. and Gomperts, B.D.: Essential synergy between Ca2+ and guanine nucleotides in exocytotic secretion from permeabilized rat mast cells. J Cell Biol 105 (1987) 191-7.

Hubbard, C., Singleton, D., Rauch, M., Jayasinghe, S., Cafiso, D. and Castle, D.: The secretory carrier membrane protein family: structure and membrane topology. Mol Biol Cell 11 (2000) 2933-47.

Humphries, D.E., Wong, G.W., Friend, D.S., Gurish, M.F., Qiu, W.T., Huang, C., Sharpe, A.H. and Stevens, R.L.: Heparin is essential for the storage of specific granule proteases in mast cells. Nature 400 (1999) 769-72.

Ito, K., Miyashita, Y. and Kasai, H.: Micromolar and submicromolar Ca2+ spikes regulating distinct cellular functions in pancreatic acinar cells. Embo J 16 (1997) 242-51.

Jorgensen, E.M., Hartwieg, E., Schuske, K., Nonet, M.L., Jin, Y. and Horvitz, H.R.: Defective recycling of synaptic vesicles in synaptotagmin mutants of Caenorhabditis elegans. Nature 378 (1995) 196-9.

Katz, B. and Miledi, R.: The Effect of Calcium on Acetylcholine Release from Motor Nerve Terminals. Proc R Soc Lond B Biol Sci 161 (1965) 496-503.

Kelly, R.B.: Pathways of protein secretion in eukaryotes. Science 230 (1985) 25-32.

Kelly, R.B.: Storage and release of neurotransmitters. Cell 72 Suppl (1993) 43-53.

Kennedy, R.T., Huang, L., Atkinson, M.A. and Dush, P.: Amperometric monitoring of chemical secretions from individual pancreatic beta-cells. Anal Chem 65 (1993) 1882-7.

Kiraly-Borri, C.E., Morgan, A., Burgoyne, R.D., Weller, U., Wollheim, C.B. and Lang, J.: Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein and N-ethylmaleimide-insensitive factors are required for Ca2+-stimulated exocytosis of insulin. Biochem J 314 (Pt 1) (1996) 199-203.

Kishimoto, T., Liu, T.T., Ninomiya, Y., Takagi, H., Yoshioka, T., Ellis-Davies, G.C., Miyashita, Y. and Kasai, H.: Ion selectivities of the Ca(2+) sensors for exocytosis in rat phaeochromocytoma cells. J Physiol 533 (2001) 627-37.

Knight, D.E., Sugden, D. and Baker, P.F.: Evidence implicating protein kinase C in exocytosis from electropermeabilized bovine chromaffin cells. J Membr Biol 104 (1988) 21-34.

Koopmann, W.R., Jr. and Jackson, R.C.: Calcium- and guanine-nucleotide-dependent exocytosis in permeabilized rat mast cells. Modulation by protein kinase C. Biochem J 265 (1990) 365-73.

Kraszewski, K., Mundigl, O., Daniell, L., Verderio, C., Matteoli, M. and De Camilli, P.: Synaptic vesicle dynamics in living cultured hippocampal neurons visualized with CY3-conjugated antibodies directed against the lumenal domain of synaptotagmin. J Neurosci 15 (1995) 4328-42.

Lagnado, L., Gomis, A. and Job, C.: Continuous vesicle cycling in the synaptic terminal of retinal bipolar cells. Neuron 17 (1996) 957-67.

Lagunoff, D. and Rickard, A.: Evidence for control of mast cell granule protease in situ by low pH. Exp Cell Res 144 (1983) 353-60.

Laurie, S.M., Cain, C.C., Lienhard, G.E. and Castle, J.D.: The glucose transporter GluT4 and secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) colocalize in rat adipocytes and partially segregate during insulin stimulation. J Biol Chem 268 (1993) 19110-7.

Lemons, P.P., Chen, D., Bernstein, A.M., Bennett, M.K. and Whiteheart, S.W.: Regulated secretion in platelets: identification of elements of the platelet exocytosis machinery. Blood 90 (1997) 1490-500.

Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Jr., Near, J.A. and Wightman, R.M.: Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. Chemical evidence for exocytosis. J Biol Chem 265 (1990) 14736-7.

Leszczyszyn, D.J., Jankowski, J.A., Viveros, O.H., Diliberto, E.J., Jr., Near, J.A. and Wightman, R.M.: Secretion of catecholamines from individual adrenal medullary chromaffin cells. J Neurochem 56 (1991) 1855-63.

Leveque, C., Hoshino, T., David, P., Shoji-Kasai, Y., Leys, K., Omori, A., Lang, B., el Far, O., Sato, K., Martin-Moutot, N. and et al.: The synaptic vesicle protein synaptotagmin associates with calcium channels and is a putative Lambert-Eaton myasthenic syndrome antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 89 (1992) 3625-9.

Li, Z., Burrone, J., Tyler, W.J., Hartman, K.N., Albeanu, D.F. and Murthy, V.N.: Synaptic vesicle recycling studied in transgenic mice expressing synaptopHluorin. Proc Natl Acad Sci U S A 102 (2005) 6131-6.

Lillie, T.H. and Gomperts, B.D.: Kinetic characterization of guanine-nucleotide-induced exocytosis from permeabilized rat mast cells. Biochem J 290 (Pt 2) (1993) 389-94.

Lindau, M. and Almers, W.: Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. Curr Opin Cell Biol 7 (1995) 509-17.

Lindau, M. and Gomperts, B.D.: Techniques and concepts in exocytosis: focus on mast cells. Biochim Biophys Acta 1071 (1991) 429-71.

Lindau, M. and Neher, E.: Patch-clamp techniques for time-resolved capacitance measurements in single cells. Pflugers Arch 411 (1988) 137-46.

Link, E., Edelmann, L., Chou, J.H., Binz, T., Yamasaki, S., Eisel, U., Baumert, M., Sudhof, T.C., Niemann, H. and Jahn, R.: Tetanus toxin action: inhibition of neurotransmitter release linked to synaptobrevin proteolysis. Biochem Biophys Res Commun 189 (1992) 1017-23.

Littleton, J.T., Chapman, E.R., Kreber, R., Garment, M.B., Carlson, S.D. and Ganetzky, B.: Temperature-sensitive paralytic mutations demonstrate that synaptic exocytosis requires SNARE complex assembly and disassembly. Neuron 21 (1998) 401-13.

Littleton, J.T., Stern, M., Schulze, K., Perin, M. and Bellen, H.J.: Mutational analysis of Drosophila synaptotagmin demonstrates its essential role in Ca(2+)-activated neurotransmitter release. Cell 74 (1993) 1125-34.

Liu, L., Liao, H., Castle, A., Zhang, J., Casanova, J., Szabo, G. and Castle, D.: SCAMP2 interacts with Arf6 and phospholipase D1 and links their function to exocytotic fusion pore formation in PC12 cells. Mol Biol Cell 16 (2005) 4463-72.

Lollike, K., Borregaard, N. and Lindau, M.: The exocytotic fusion pore of small granules has a conductance similar to an ion channel. J Cell Biol 129 (1995) 99-104.

Lollike, K. and Lindau, M.: Membrane capacitance techniques to monitor granule exocytosis in neutrophils. J Immunol Methods 232 (1999) 111-20.

Lomneth, R., Martin, T.F. and DasGupta, B.R.: Botulinum neurotoxin light chain inhibits norepinephrine secretion in PC12 cells at an intracellular membranous or cytoskeletal site. J Neurochem 57 (1991) 1413-21.

Ludowyke, R.I. and Lagunoff, D.: Amine uptake into intact mast cell granules in vitro. Biochemistry 25 (1986) 6287-93.

Marks, B. and McMahon, H.T.: Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. Curr Biol 8 (1998) 740-9.

Marsh, M. and McMahon, H.T.: The structural era of endocytosis. Science 285 (1999) 215-20.

Marszalek, P., Farrell, B. and Fernandez, J.M.: Ion-exchange gel regulates neurotransmitter release through the exocytotic fusion pore. Soc Gen Physiol Ser 51 (1996) 211-22.

Marszalek, P.E., Farrell, B., Verdugo, P. and Fernandez, J.M.: Kinetics of release of serotonin from isolated secretory granules. II. Ion exchange determines the diffusivity of serotonin. Biophys J 73 (1997) 1169-83.

Marszalek, P.E., Markin, V.S., Tanaka, T., Kawaguchi, H. and Fernandez, J.M.: The secretory granule matrix-electrolyte interface: a homologue of the p-n rectifying junction. Biophys J 69 (1995) 1218-29.

McInnes, C. and Dolly, J.O.: Ca2(+)-dependent noradrenaline release from permeabilised PC12 cells is blocked by botulinum neurotoxin A or its light chain. FEBS Lett 261 (1990) 323-6.

McNew, J.A., Parlati, F., Fukuda, R., Johnston, R.J., Paz, K., Paumet, F., Sollner, T.H. and Rothman, J.E.: Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. Nature 407 (2000a) 153-9.

McNew, J.A., Weber, T., Engelman, D.M., Sollner, T.H. and Rothman, J.E.: The length of the flexible SNAREpin juxtamembrane region is a critical determinant of SNARE-dependent fusion. Mol Cell 4 (1999) 415-21.

McNew, J.A., Weber, T., Parlati, F., Johnston, R.J., Melia, T.J., Sollner, T.H. and Rothman, J.E.: Close is not enough: SNARE-dependent membrane fusion requires an active mechanism that transduces force to membrane anchors. J Cell Biol 150 (2000b) 105-17.

Miesenbock, G., De Angelis, D.A. and Rothman, J.E.: Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. Nature 394 (1998) 192-5.

Monck, J.R., Alvarez de Toledo, G. and Fernandez, J.M.: Tension in secretory granule membranes causes extensive membrane transfer through the exocytotic fusion pore. Proc Natl Acad Sci U S A 87 (1990) 7804-8.

Monck, J.R. and Fernandez, J.M.: The exocytotic fusion pore. J Cell Biol 119 (1992) 1395-404.

Monck, J.R. and Fernandez, J.M.: The exocytotic fusion pore and neurotransmitter release. Neuron 12 (1994) 707-16.

Monck, J.R., Oberhauser, A.F., Alvarez de Toledo, G. and Fernandez, J.M.: Is swelling of the secretory granule matrix the force that dilates the exocytotic fusion pore? Biophys J 59 (1991) 39-47.

Monck, J.R., Oberhauser, A.F. and Fernandez, J.M.: The exocytotic fusion pore interface: a model of the site of neurotransmitter release. Mol Membr Biol 12 (1995) 151-6.

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

Morgan, A. and Burgoyne, R.D.: Stimulation of Ca2(+)-independent catecholamine secretion from digitonin-permeabilized bovine adrenal chromaffin cells by guanine nucleotide analogues. Relationship to arachidonate release. Biochem J 269 (1990) 521-6.

Morgan, A. and Burgoyne, R.D.: A role for soluble NSF attachment proteins (SNAPs) in regulated exocytosis in adrenal chromaffin cells. Embo J 14 (1995) 232-9.

Nadler, M.J., Matthews, S.A., Turner, H. and Kinet, J.P.: Signal transduction by the high-affinity immunoglobulin E receptor Fc epsilon RI: coupling form to function. Adv Immunol 76 (2000) 325-55.

Nagamatsu, S., Watanabe, T., Nakamichi, Y., Yamamura, C., Tsuzuki, K. and Matsushima, S.: alpha-soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein is expressed in pancreatic beta cells and functions in insulin but not gamma-aminobutyric acid secretion. J Biol Chem 274 (1999) 8053-60.

Nanavati, C., Markin, V.S., Oberhauser, A.F. and Fernandez, J.M.: The exocytotic fusion pore modeled as a lipidic pore. Biophys J 63 (1992) 1118-32.

Neher, E.: The influence of intracellular calcium concentration on degranulation of dialysed mast cells from rat peritoneum. J Physiol 395 (1988) 193-214.

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

Neher, E. and Marty, A.: 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 (1982) 6712-6.

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

Newman, T.M., Tian, M. and Gomperts, B.D.: Ultrastructural characterization of tannic acid-arrested degranulation of permeabilized guinea pig eosinophils stimulated with GTP-gamma-S. Eur J Cell Biol 70 (1996) 209-20.

Nonet, M.L., Grundahl, K., Meyer, B.J. and Rand, J.B.: Synaptic function is impaired but not eliminated in C. elegans mutants lacking synaptotagmin. Cell 73 (1993) 1291-305.

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

Nusse, O. and Lindau, M.: The dynamics of exocytosis in human neutrophils. J Cell Biol 107 (1988) 2117-23.

Oberhauser, A.F. and Fernandez, J.M.: A fusion pore phenotype in mast cells of the ruby-eye mouse. Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996) 14349-54.

Oberhauser, A.F., Monck, J.R. and Fernandez, J.M.: Events leading to the opening and closing of the exocytotic fusion pore have markedly different temperature dependencies. Kinetic analysis of single fusion events in patch-clamped mouse mast cells. Biophys J 61 (1992) 800-9.

Ohara-Imaizumi, M., Fukuda, M., Niinobe, M., Misonou, H., Ikeda, K., Murakami, T., Kawasaki, M., Mikoshiba, K. and Kumakura, K.: Distinct roles of C2A and C2B domains of synaptotagmin in the regulation of exocytosis in adrenal chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997) 287-91.

Olofsson, C.S., Gopel, S.O., Barg, S., Galvanovskis, J., Ma, X., Salehi, A., Rorsman, P. and Eliasson, L.: Fast insulin secretion reflects exocytosis of docked granules in mouse pancreatic B-cells. Pflugers Arch 444 (2002) 43-51.

Otto, H., Hanson, P.I. and Jahn, R.: Assembly and disassembly of a ternary complex of synaptobrevin, syntaxin, and SNAP-25 in the membrane of synaptic vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A 94 (1997) 6197-201.

Palade, G.: Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science 189 (1975) 347-58.

Palfrey, H.C. and Artalejo, C.R.: Vesicle recycling revisited: rapid endocytosis may be the first step. Neuroscience 83 (1998) 969-89.

Parlati, F., McNew, J.A., Fukuda, R., Miller, R., Sollner, T.H. and Rothman, J.E.: Topological restriction of SNARE-dependent membrane fusion. Nature 407 (2000) 194-8.

Parsons, T.D., Coorssen, J.R., Horstmann, H. and Almers, W.: Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. Neuron 15 (1995) 1085-96.

Parsons, T.D., Lenzi, D., Almers, W. and Roberts, W.M.: Calcium-triggered exocytosis and endocytosis in an isolated presynaptic cell: capacitance measurements in saccular hair cells. Neuron 13 (1994) 875-83.

Paumet, F., Le Mao, J., Martin, S., Galli, T., David, B., Blank, U. and Roa, M.: Soluble NSF attachment protein receptors (SNAREs) in RBL-2H3 mast cells: functional role of syntaxin 4 in exocytosis and identification of a vesicle-associated membrane protein 8-containing secretory compartment. J Immunol 164 (2000) 5850-7.

Phillips, J.H.: Dynamic aspects of chromaffin granule structure. Neuroscience 7 (1982) 1595-609.

Pihel, K., Hsieh, S., Jorgenson, J.W. and Wightman, R.M.: Electrochemical detection of histamine and 5-hydroxytryptamine at isolated mast cells. Anal Chem 67 (1995) 4514-21.

Pihel, K., Hsieh, S., Jorgenson, J.W. and Wightman, R.M.: Quantal corelease of histamine and 5-hydroxytryptamine from mast cells and the effects of prior incubation. Biochemistry 37 (1998) 1046-52.

Pinxteren, J.A., O'Sullivan, A.J., Tatham, P.E. and Gomperts, B.D.: Regulation of exocytosis from rat peritoneal mast cells by G protein beta gamma-subunits. Embo J 17 (1998) 6210-8.

Plattner, H., Artalejo, A.R. and Neher, E.: Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. J Cell Biol 139 (1997) 1709-17.

Poirier, M.A., Xiao, W., Macosko, J.C., Chan, C., Shin, Y.K. and Bennett, M.K.: The synaptic SNARE complex is a parallel four-stranded helical bundle. Nat Struct Biol 5 (1998) 765-9.

Pryer, N.K., Wuestehube, L.J. and Schekman, R.: Vesicle-mediated protein sorting. Annu Rev Biochem 61 (1992) 471-516.

Rabe, C.S., Schneider, J. and McGee, R., Jr.: Enhancement of depolarization-dependent neurosecretion from PC12 cells by forskolin-induced elevation of cyclic AMP. J Cyclic Nucleotide Res 8 (1982) 371-84.

Ramaswami, M., Krishnan, K.S. and Kelly, R.B.: Intermediates in synaptic vesicle recycling revealed by optical imaging of Drosophila neuromuscular junctions. Neuron 13 (1994) 363-75.

Rieke, F. and Schwartz, E.A.: A cGMP-gated current can control exocytosis at cone synapses. Neuron 13 (1994) 863-73.

Robinson, I.M., Yamada, M., Carrion-Vazquez, M., Lennon, V.A. and Fernandez, J.M.: Specialized release zones in chromaffin cells examined with pulsed-laser imaging. Cell Calcium 20 (1996) 181-201.

Rosenboom, H. and Lindau, M.: Exo-endocytosis and closing of the fission pore during endocytosis in single pituitary nerve terminals internally perfused with high calcium concentrations. Proc Natl Acad Sci U S A 91 (1994) 5267-71.

Rosenmund, C. and Stevens, C.F.: Definition of the readily releasable pool of vesicles at hippocampal synapses. Neuron 16 (1996) 1197-207.

Rothman, J.E.: Mechanisms of intracellular protein transport. Nature 372 (1994) 55-63.

Rupnik, M., Kreft, M., Sikdar, S.K., Grilc, S., Romih, R., Zupancic, G., Martin, T.F. and Zorec, R.: Rapid regulated dense-core vesicle exocytosis requires the CAPS protein. Proc Natl Acad Sci U S A 97 (2000) 5627-32.

Ryan, T.A. and Smith, S.J.: Vesicle pool mobilization during action potential firing at hippocampal synapses. Neuron 14 (1995) 983-9.

Rybin, V., Ullrich, O., Rubino, M., Alexandrov, K., Simon, I., Seabra, M.C., Goody, R. and Zerial, M.: GTPase activity of Rab5 acts as a timer for endocytic membrane fusion. Nature 383 (1996) 266-9.

Sabatini, B.L. and Regehr, W.G.: Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. Nature 384 (1996) 170-2.

Salcini, A.E., Hilliard, M.A., Croce, A., Arbucci, S., Luzzi, P., Tacchetti, C., Daniell, L., De Camilli, P., Pelicci, P.G., Di Fiore, P.P. and Bazzicalupo, P.: The Eps15 C. elegans homologue EHS-1 is implicated in synaptic vesicle recycling. Nat Cell Biol 3 (2001) 755-60.

Sankaranarayanan, S. and Ryan, T.A.: Calcium accelerates endocytosis of vSNAREs at hippocampal synapses. Nat Neurosci 4 (2001) 129-36.

Scepek, S., Coorssen, J.R. and Lindau, M.: Fusion pore expansion in horse eosinophils is modulated by Ca2+ and protein kinase C via distinct mechanisms. Embo J 17 (1998) 4340-5.

Scepek, S., Moqbel, R. and Lindau, M.: Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and their role in parasite killing. Parasitol Today 10 (1994) 276-8.

Schiavo, G., Benfenati, F., Poulain, B., Rossetto, O., Polverino de Laureto, P., DasGupta, B.R. and Montecucco, C.: Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin. Nature 359 (1992) 832-5.

Schiavo, G., Gmachl, M.J., Stenbeck, G., Sollner, T.H. and Rothman, J.E.: A possible docking and fusion particle for synaptic transmission. Nature 378 (1995) 733-6.

Schiavo, G., Malizio, C., Trimble, W.S., Polverino de Laureto, P., Milan, G., Sugiyama, H., Johnson, E.A. and Montecucco, C.: Botulinum G neurotoxin cleaves VAMP/synaptobrevin at a single Ala-Ala peptide bond. J Biol Chem 269 (1994) 20213-6.

Schiavo, G., Santucci, A., Dasgupta, B.R., Mehta, P.P., Jontes, J., Benfenati, F., Wilson, M.C. and Montecucco, C.: Botulinum neurotoxins serotypes A and E cleave SNAP-25 at distinct COOH-terminal peptide bonds. FEBS Lett 335 (1993a) 99-103.

Schiavo, G., Shone, C.C., Rossetto, O., Alexander, F.C. and Montecucco, C.: Botulinum neurotoxin serotype F is a zinc endopeptidase specific for VAMP/synaptobrevin. J Biol Chem 268 (1993b) 11516-9.

Schmidt, W., Patzak, A., Lingg, G., Winkler, H. and Plattner, H.: Membrane events in adrenal chromaffin cells during exocytosis: a freeze-etching analysis after rapid cryofixation. Eur J Cell Biol 32 (1983) 31-7.

Schoch, S., Deak, F., Konigstorfer, A., Mozhayeva, M., Sara, Y., Sudhof, T.C. and Kavalali, E.T.: SNARE function analyzed in synaptobrevin/VAMP knockout mice. Science 294 (2001) 1117-22.

Schroeder, T.J., Borges, R., Finnegan, J.M., Pihel, K., Amatore, C. and Wightman, R.M.: Temporally resolved, independent stages of individual exocytotic secretion events. Biophys J 70 (1996) 1061-8.

Schulze, K.L., Broadie, K., Perin, M.S. and Bellen, H.J.: Genetic and electrophysiological studies of Drosophila syntaxin-1A demonstrate its role in nonneuronal secretion and neurotransmission. Cell 80 (1995) 311-20.

Schwarz, T.L.: Synaptotagmin promotes both vesicle fusion and recycling. Proc Natl Acad Sci U S A 101 (2004) 16401-2.

Segawa, A. and Yamashina, S.: Roles of microfilaments in exocytosis: a new hypothesis. Cell Struct Funct 14 (1989) 531-44.

Segev, N.: Ypt and Rab GTPases: insight into functions through novel interactions. Curr Opin Cell Biol 13 (2001) 500-11.

Segura, J., Gil, A. and Soria, B.: Modeling study of exocytosis in neuroendocrine cells: influence of the geometrical parameters. Biophys J 79 (2000) 1771-86.

Simpson, F., Hussain, N.K., Qualmann, B., Kelly, R.B., Kay, B.K., McPherson, P.S. and Schmid, S.L.: SH3-domain-containing proteins function at distinct steps in clathrin-coated vesicle formation. Nat Cell Biol 1 (1999) 119-24.

Smith, C. and Neher, E.: Multiple forms of endocytosis in bovine adrenal chromaffin cells. J Cell Biol 139 (1997) 885-94.

Smith, C.B. and Betz, W.J.: Simultaneous independent measurement of endocytosis and exocytosis. Nature 380 (1996) 531-4.

Smith, P.A., Duchen, M.R. and Ashcroft, F.M.: A fluorimetric and amperometric study of calcium and secretion in isolated mouse pancreatic beta-cells. Pflugers Arch 430 (1995) 808-18.

Solsona, C., Innocenti, B. and Fernandez, J.M.: Regulation of exocytotic fusion by cell inflation. Biophys J 74 (1998) 1061-73.

Sollner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H. and Rothman, J.E.: A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. Cell 75 (1993a) 409-18.

Sollner, T., Whiteheart, S.W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P. and Rothman, J.E.: SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature 362 (1993b) 318-24.

Sombers, L.A., Hanchar, H.J., Colliver, T.L., Wittenberg, N., Cans, A., Arbault, S., Amatore, C. and Ewing, A.G.: The effects of vesicular volume on secretion through the fusion pore in exocytotic release from PC12 cells. J Neurosci 24 (2004) 303-9.

Spruce, A.E., Breckenridge, L.J., Lee, A.K. and Almers, W.: Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. Neuron 4 (1990) 643-54.

Staal, R.G., Mosharov, E.V. and Sulzer, D.: Dopamine neurons release transmitter via a flickering fusion pore. Nat Neurosci 7 (2004) 341-6.

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

Sun, J.Y., Wu, X.S. and Wu, L.G.: Single and multiple vesicle fusion induce different rates of endocytosis at a central synapse. Nature 417 (2002) 555-9.

Sutton, R.B., Ernst, J.A. and Brunger, A.T.: Crystal structure of the cytosolic C2A-C2B domains of synaptotagmin III. Implications for Ca(+2)-independent snare complex interaction. J Cell Biol 147 (1999) 589-98.

Sutton, R.B., Fasshauer, D., Jahn, R. and Brunger, A.T.: Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 A resolution. Nature 395 (1998) 347-53.

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

Tagaya, M., Genma, T., Yamamoto, A., Kozaki, S. and Mizushima, S.: SNAP-25 is present on chromaffin granules and acts as a SNAP receptor. FEBS Lett 394 (1996) 83-6.

Tagaya, M., Toyonaga, S., Takahashi, M., Yamamoto, A., Fujiwara, T., Akagawa, K., Moriyama, Y. and Mizushima, S.: Syntaxin 1 (HPC-1) is associated with chromaffin granules. J Biol Chem 270 (1995) 15930-3.

Takamori, S., Holt, M., Stenius, K., Lemke, E.A., Gronborg, M., Riedel, D., Urlaub, H., Schenck, S., Brugger, B., Ringler, P., Muller, S.A., Rammner, B., Grater, F., Hub, J.S., De Groot, B.L., Mieskes, G., Moriyama, Y., Klingauf, J., Grubmuller, H., Heuser, J., Wieland, F. and Jahn, R.: Molecular anatomy of a trafficking organelle. Cell 127 (2006) 831-46.

Tantravahi, R.V., Stevens, R.L., Austen, K.F. and Weis, J.H.: A single gene in mast cells encodes the core peptides of heparin and chondroitin sulfate proteoglycans. Proc Natl Acad Sci U S A 83 (1986) 9207-10.

Tatham, P.E. and Gomperts, B.D.: Rat mast cells degranulate in response to microinjection of guanine nucleotide. J Cell Sci 98 (Pt 2) (1991) 217-24.

Thomas, P., Surprenant, A. and Almers, W.: Cytosolic Ca2+, exocytosis, and endocytosis in single melanotrophs of the rat pituitary. Neuron 5 (1990) 723-33.

Thomas, P., Wong, J.G. and Almers, W.: Millisecond studies of secretion in single rat pituitary cells stimulated by flash photolysis of caged Ca2+. Embo J 12 (1993a) 303-6.

Thomas, P., Wong, J.G., Lee, A.K. and Almers, W.: A low affinity Ca2+ receptor controls the final steps in peptide secretion from pituitary melanotrophs. Neuron 11 (1993b) 93-104.

Trimble, W.S., Cowan, D.M. and Scheller, R.H.: VAMP-1: a synaptic vesicle-associated integral membrane protein. Proc Natl Acad Sci U S A 85 (1988) 4538-42.

Turner, K.M., Burgoyne, R.D. and Morgan, A.: Protein phosphorylation and the regulation of synaptic membrane traffic. Trends Neurosci 22 (1999) 459-64.

Uvnas, B., Aborg, C.H., Lyssarides, L., Thyberg, J. and Danielsson, L.G.: Rat mast cells superfused with isotonic solutions release histamine, probably via intracellular cation exchange K+ in equilibrium Hi+ ions. Acta Physiol Scand 128 (1986) 657-8.

Vaidyanathan, V.V., Puri, N. and Roche, P.A.: The last exon of SNAP-23 regulates granule exocytosis from mast cells. J Biol Chem 276 (2001) 25101-6.

Vaidyanathan, V.V., Yoshino, K., Jahnz, M., Dorries, C., Bade, S., Nauenburg, S., Niemann, H. and Binz, T.: Proteolysis of SNAP-25 isoforms by botulinum neurotoxin types A, C, and E: domains and amino acid residues controlling the formation of enzyme-substrate complexes and cleavage. J Neurochem 72 (1999) 327-37.

Verhage, M., Maia, A.S., Plomp, J.J., Brussaard, A.B., Heeroma, J.H., Vermeer, H., Toonen, R.F., Hammer, R.E., van den Berg, T.K., Missler, M., Geuze, H.J. and Sudhof, T.C.: Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. Science 287 (2000) 864-9.

Vitale, M.L., Seward, E.P. and Trifaro, J.M.: Chromaffin cell cortical actin network dynamics control the size of the release-ready vesicle pool and the initial rate of exocytosis. Neuron 14 (1995) 353-63.

Voets, T., Moser, T., Lund, P.E., Chow, R.H., Geppert, M., Sudhof, T.C. and Neher, E.: Intracellular calcium dependence of large dense-core vesicle exocytosis in the absence of synaptotagmin I. Proc Natl Acad Sci U S A 98 (2001) 11680-5.

von Gersdorff, H. and Matthews, G.: Inhibition of endocytosis by elevated internal calcium in a synaptic terminal. Nature 370 (1994) 652-5.

Walch-Solimena, C., Blasi, J., Edelmann, L., Chapman, E.R., von Mollard, G.F. and Jahn, R.: The t-SNAREs syntaxin 1 and SNAP-25 are present on organelles that participate in synaptic vesicle recycling. J Cell Biol 128 (1995) 637-45.

Wang, C.T., Grishanin, R., Earles, C.A., Chang, P.Y., Martin, T.F., Chapman, E.R. and Jackson, M.B.: Synaptotagmin modulation of fusion pore kinetics in regulated exocytosis of dense-core vesicles. Science 294 (2001) 1111-5.

Washbourne, P., Thompson, P.M., Carta, M., Costa, E.T., Mathews, J.R., Lopez-Bendito, G., Molnar, Z., Becher, M.W., Valenzuela, C.F., Partridge, L.D. and Wilson, M.C.: Genetic ablation of the t-SNARE SNAP-25 distinguishes mechanisms of neuroexocytosis. Nat Neurosci 5 (2002) 19-26.

Weber, T., Zemelman, B.V., McNew, J.A., Westermann, B., Gmachl, M., Parlati, F., Sollner, T.H. and Rothman, J.E.: SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. Cell 92 (1998) 759-72.

Wigge, P. and McMahon, H.T.: The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. Trends Neurosci 21 (1998) 339-44.

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.: Temporally resolved catecholamine spikes correspond to single vesicle release from individual chromaffin cells. Proc Natl Acad Sci U S A 88 (1991) 10754-8.

Wightman, R.M., Schroeder, T.J., Finnegan, J.M., Ciolkowski, E.L. and Pihel, K.: Time course of release of catecholamines from individual vesicles during exocytosis at adrenal medullary cells. Biophys J 68 (1995) 383-90.

Wu, T.T. and Castle, J.D.: Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs). J Cell Sci 110 (Pt 13) (1997) 1533-41.

Xu, T., Ashery, U., Burgoyne, R.D. and Neher, E.: Early requirement for alpha-SNAP and NSF in the secretory cascade in chromaffin cells. Embo J 18 (1999) 3293-304.

Zerial, M. and McBride, H.: Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol 2 (2001) 107-17.

Zhang, H., Yasrebi-Nejad, H. and Lang, J.: G-protein betagamma-binding domains regulate insulin exocytosis in clonal pancreatic beta-cells. FEBS Lett 424 (1998) 202-6.

Zhou, Z., Misler, S. and Chow, R.H.: Rapid fluctuations in transmitter release from single vesicles in bovine adrenal chromaffin cells. Biophys J 70 (1996) 1543-52.

Zimmerberg, J., Curran, M., Cohen, F.S. and Brodwick, M.: Simultaneous electrical and optical measurements show that membrane fusion precedes secretory granule swelling during exocytosis of beige mouse mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A 84 (1987) 1585-9.

Zimmerberg, J., Vogel, S.S., Whalley, T., Plonsky, I., Sokoloff, A., Chanturia, A. and Chernomordik, L.V.: Intermediates in membrane fusion. Cold Spring Harb Symp Quant Biol 60 (1995) 589-99.

Zucker, R.S.: Exocytosis: a molecular and physiological perspective. Neuron 17 (1996) 1049-55.

VIII. ANEXOS

Códigos del software desarrollado