



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Determinación electrofisiológica del proceso de exocitosis
mediado por calcio y su regulación por la proteína
Sinaptotagmina VII en células cromafines de ratón**

Tesis que presenta

Claudia Lizeth Robledo Jiménez

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Directora de la Tesis:

Dra. Imelda Bonifas Arredondo

San Luis Potosí, S.L.P., diciembre de 2006



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Determinación electrofisiológica del proceso de exocitosis mediado por calcio y su regulación por la proteína Sinaptotagmina VII en células cromafines de ratón**" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Claudia Lizeth Robledo Jiménez** y aprobada el 11 de diciembre de 2006 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Jorge Arreola Gómez
Presidente

Dra. Imelda Bonifas Arredondo
Secretaria

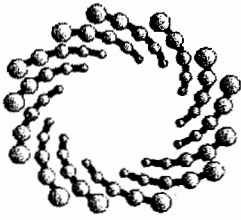
Dr. Carlos Barajas López
Sinodal



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Neurobiología de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio de Endocitosis y Exocitosis del Departamento de Fisiología Médica y Biofísica de la Universidad de Sevilla (Sevilla, España) bajo la dirección de la Dra. Imelda Bonifas Arredondo.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (182067) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 027 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 15 días del mes de diciembre del año 2006, se reunió a las 18:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Jorge Arreola Gómez	Presidente	UASLP
Dra. Imelda Bonifas Arredondo	Secretaria	IPICYT
Dr. Carlos Barajas López	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Claudia Lizeth Robledo Jiménez

sobre la Tesis intitulada:

Determinación Electrofisiológica del Proceso de Exocitosis Mediado por Calcio y su Regulación por la Proteína Sinaptotagmina VII en Células Cromafines de Ratón

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Imelda Bonifas Arredondo

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:35 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 15 días del mes diciembre de 2006.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Bonilla Marin
Secretario Académico



Agradecimientos

A todas aquellas personas o sentimientos que de alguna u otra manera hicieron alguna contribución en el andar de este camino lleno de baches pero bien librado.

Por hacerme decidir estudiar algo relacionado con Biología: Gracias a los dos mejores amigos que he tenido en la vida, **mi Locura y mi Espíritu Aventurero**.

Por ayudarme a elegir entre estudiar Física Médica en la UNAM y Biología Molecular en IPICYT: Gracias **X**, a pesar de que nuestro camino se ha separado, considero que no pude haber hecho mejor elección. Por ayudarme a mantenerme en tierras lejanas cuando pensé que no podía más, Gracias **Y**. Y por darme el aliento en éste último tirón, por ser mi fuerza y el amor de mi vida, Gracias **Z**.

Por ayudarme a levantarme cuando caí: Gracias **Dios**, por darme la fuerza y el coraje necesarios para enfrentar cuanto reto se me ha cruzado o me he propuesto en la vida.

Por todo el apoyo para mantenerme y poder seguir preparándome: Gracias **Juan y Alicia**, mis abuelitos del alma, por tenerme en sus oraciones todo el tiempo, por consentirme y brindarme todo ese inmenso cariño.

Por ayudarme a mantenerme de pie una vez que logré levantarme: Gracias **San y Alex**, mis preciosos hermanos, por quererme y sobre todo por ser mis más fieles admiradores, sin su admiración me hubiera quebrado más de mil veces pero ustedes me hacen fuerte pues como todos sabemos, no se le puede fallar a quien te admira.

Por brindarme su amistad siempre y apoyarme: Gracias **Lalo Cruz**, por ser tan Grinch y aún así tener un corazón enorme para compartir conmigo.

Por llegar a mi vida y ayudarme a superar mi tristeza: Gracias **Pablo, Gigio y Lalo Valdez**, por todos los momentos de alegría y todas esas noches bohemias de guitarra, chelas y tequila.

Por brindarme su amistad, por demostrarme que sabe estar en las buenas y en las malas, por ser mi oreja y mi apoyo, por permitirme compartir lo que con nadie más soy capaz de compartir, por permitirme ser parte de su vida, por dejarme ser su oreja y su apoyo, en fin, por quien la palabra AMIGA toma sentido para mí: Gracias **Areli**, amistades como la tuya, las cuento con los dedos de una de mis manos, y me sobran dedos.

Por los momentos interminables de agradable charla, por compartir el gusto musical, por los consejos, por todos esos pequeños detalles que tal vez tu no notas, pero que hicieron nacer y permiten hacer crecer la amistad: Gracias **Sergio**.

Por las charlas serias y profundas, por las carcajadas y los momentos geniales de comicidad: Gracias **Jacinto, Yadi, May, Alex y Ceskita.**

Por todo el cariño incondicional: Gracias a cada uno de los “hijos” que tuve durante mi estancia en San Luis Potosí, mis gatos **Sheika, Chester, Fiona y Nena**, mis tortugas **Sofía y Walter.** Y a mis hermanitos perrunos de Monclova, **Maky y Kikin** y especialmente a mi consentido, que más que perro era un miembro más de la familia, mi **Nano.**

A quienes me enseñaron todo lo que se de Biología Molecular: Gracias **Doctores,** por compartir sus conocimientos y permitir que sigamos creyendo que vale la pena dedicar la vida a esto.

Por todo el apoyo para poder salir de ésta: Gracias **Imelda,** por compartir tu espíritu de lucha, por ser tan aferrada y defender tus creencias y principios, por ser amiga además de asesora.

Por la enorme oportunidad para dejarme aprender y expandir mi horizonte: Gracias **Guillermo.**

Por dejarme compartir maravillosos momentos discutiendo ideas y permitiéndome aprender cada detalle: Gracias **Eva.**

Por ser amigos, por compartir la vida completa, por su confianza, por su apoyo en los muy buenos, buenos, malos y muy malos momentos, por dejarme ser como soy y apoyarme, por enseñarme tantas cosas de la vida, por amarme, pero sobre todo, por haberme dado la vida y permitirme volar: Gracias **Jesús y Tere,** mis padres amados, por ser la fuerza de mi corazón.

Y finalmente a todos aquellos que se cruzaron en mi camino, me apoyaron en ciertos momentos, me brindaron alegrías y palabras de aliento.

A todos ustedes, agradezco y dedico este trabajo.

Claudia Robledo

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Agradecimientos	v
Resumen	x
Abstract	xi
Introducción. Capítulo 1. El fenómeno de exocitosis	1
1.1 Exocitosis	2
1.1.1 La exocitosis constitutiva	2
1.1.2 La exocitosis regulada	3
1.1.3 Papel del calcio en la exocitosis	4
1.1.4 Proteínas involucradas en el fenómeno de exocitosis	5
1.2 Mecanismos de exocitosis	7
1.2.1 Fusión completa	8
1.2.2 Fusión transitoria	8
1.2.3 Modelos de formación del poro de fusión	9
1.2.4 Hipótesis de la naturaleza del poro de fusión	10
1.2.5 Etapas en la formación del poro de fusión	11
1.3 Células cromafines como modelo de estudio	11
1.4 Técnicas empleadas en el estudio de exocitosis	12
1.4.1 Microscopía de onda evanescente	13
1.4.2 Microscopía de fluorescencia	14
1.4.3 Microscopía de fuerza atómica	14
1.4.4 Patch clamp	15
1.4.5 Amperometría	17
1.4.6 Amperometría en parche	18
1.5 Exocitosis modulada por proteínas	22
1.5.1 Proteínas sensores de calcio	22
1.6 Sinaptotagminas	22
1.6.1 Dominios C2	23
1.7 Propiedades de isoformas de Sinaptotagminas	25
1.8 Sinaptotagmina VII	26
Hipótesis	30

Objetivos	31
Resultados: Capítulo 2. Efecto de la Sinaptotagmina VII en el proceso de exocitosis regulado por calcio	32
2.1 La Sinaptotagmina VII acelera la apertura del poro de fusión y la cinética de liberación de neurotransmisores	33
2.2 El efecto de la Sinaptotagmina VII no depende de la concentración de calcio extracelular	41
2.3 La regulación del poro de fusión y la cinética de liberación de neurotransmisores dependen de la concentración de calcio extracelular	45
Resultados: Capítulo 3. Papel del dominio C2B de la Sinaptotagmina VII en el proceso de exocitosis regulado por calcio	49
3.1 El dominio C2B de la proteína Sinaptotagmina VII participa en la regulación del poro de fusión y en el control de la cinética de liberación de neurotransmisores	51
3.2 La ausencia del dominio C2B incrementa la frecuencia de eventos de fusión transitoria	57
Discusión	60
Conclusiones	64
Referencias	67
Anexos: Materiales y Métodos	74
Anexo A. Preparación de microelectrodos y micropipetas de amperometría en parche	75
A1. Preparación de microelectrodos de amperometría en parche	75
A1.1. Preparación de microelectrodos de amperometría	75
A1.2 Preparación de micropipetas de patch clamp	78
Anexo B. Cultivo de células cromafines de ratón	79
B1. Preparación de cubreobjetos para la siembra celular	79
B2. Extracción y purificación de células cromafines	79
Anexo C. Preparación de soluciones	83
C1. Solución Locke	83
C2. Solución de dispersión	83
C3. Medio de incubación	83

C4. Solución externa para registros electrofisiológicos	84
C5. Solución interna para registros electrofisiológicos	84
Anexo D. Parámetros de amperometría en parche	85
D1. Equipo de amperometría en parche	85
D2. Parámetros de amperometría en parche	86
D3. ¿Cómo se lleva a cabo un experimento de amperometría en parche?	88

Resumen

En este trabajo examinamos el papel de la proteína Sinaptotagmina VII en el proceso de exocitosis regulado por calcio haciendo experimentos en células cromafines de genotipo silvestre (WT), knock out (KO) y knock in C2B (KI C2B) mediante la técnica de amperometría en parche. Estas mediciones nos generaron información importante acerca del mecanismo de exocitosis. Con los registros de amperometría y capacitancia detectamos la cantidad y la velocidad de flujo de los neurotransmisores liberados en un evento de fusión y también el diámetro de las vesículas fusionadas a la membrana celular. Demostramos que tanto la proteína Sinaptotagmina VII como la elevación en la concentración del calcio extracelular incrementan la relación de expansión del poro de fusión y el flujo de neurotransmisores. Además, investigamos el papel del dominio C2B de esta proteína. Los resultados obtenidos son muy importantes porque nos permitieron determinar que el dominio C2B gobierna el mecanismo de expansión del poro de fusión y el flujo de liberación de neurotransmisores. También encontramos que el dominio C2A incrementa la cantidad de eventos de fusión transitoria, lo que sugiere que los dominios C2 regulan la expansión del poro de fusión. Estos resultados nos permitieron proponer que el dominio C2A restringe la expansión del poro de fusión mientras que el dominio C2B la promueve.

Palabras clave: Sinaptotagmina VII, exocitosis, amperometría en parche, dominios C2.

ABSTRACT

Here we examine the role of Synaptotagmin VII in regulated exocytosis making experiments in wild type (WT), knock out (KO) and knock in C2B (KI C2B) chromaffin cells using patch amperometry. These measurements let us to determine if the cell uses full fusion or kiss and run as mechanism of exocytosis. Besides to register the variations in membrane capacitance this technique allowed us, through amperometry electrode, to detect the secretory neurotransmitter molecules released from a fused vesicle. Amperometric recordings permit us to detect the amount of neurotransmitter released in a fusion event and resolve how the release of neurotransmitters through the structure connecting the vesicle lumen with the extracellular medium, the fusion pore, is carried out. Here we show that both, Synaptotagmin VII and elevating extracellular calcium concentration increase the rate of fusion pore expansion and the neurotransmitters flux. In addition, we investigated the role of the C2B domain of this protein making experiments of patch amperometry with knock in (KI C2B) chromaffin cells. The obtained results are very important because they let us to determine that C2B domain govern the mechanism of fusion pore expansion and neurotransmitter release. We also found that C2A domain increases the amount of kiss and run events. This suggest that C2 domains regulate the fusion pore expansion. These results allowed us to propose that C2A domain restricts the fusion pore expansion whereas C2B domain promotes it.

Keywords: Synaptotagmin VII, exocytosis, patch amperometry, C2 domain.

EL FENÓMENO DE EXOCITOSIS

CAPÍTULO 1.

El fenómeno de exocitosis.

1.1 Exocitosis.

La exocitosis es un proceso de las células eucariotas en el cual una vesícula fusiona su membrana con la membrana celular, permitiendo así la comunicación entre los espacios intravesicular y extracelular. En neuronas, células neuroendocrinas y endocrinas dicho fenómeno se establece para realizar dos funciones diferentes: la adición de membrana vesicular a la membrana celular para su mantenimiento y la liberación de contenido vesicular (ej. proteínas, hormonas) al espacio extracelular. El fenómeno de exocitosis es un proceso que puede ser constitutivo o regulado (Scheller RH y Lin RC, 2000) (Figura 1.1). En ambas formas de exocitosis participan numerosas proteínas de membrana vesicular y de membrana celular que desempeñan diferentes papeles.

1.1.1 La exocitosis constitutiva.

La exocitosis constitutiva es un proceso continuo que se da en ausencia de estímulos externos. Dicho proceso es llevado a cabo por la célula para dar mantenimiento a la membrana celular mediante la incorporación de fosfolípidos y proteínas provenientes de la membrana vesicular. Algunos de los productos secretados por esta vía de exocitosis son proteínas celulares, anticuerpos, componentes del medio extracelular, entre otros (Burgess TL y Kelly RB, 1987). Este proceso emplea un mecanismo de secreción ayudado por algunos componentes homólogos a los que participan en la exocitosis regulada como por

ejemplo el complejo SNARE (por sus siglas en inglés, receptores de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida) (Schmoranzer J *et al.*, 2000).

1.1.2 La exocitosis regulada.

La exocitosis regulada es un fenómeno que ha sido ampliamente estudiado en la transmisión sináptica química, la cual constituye la principal forma de comunicación entre células del sistema nervioso. Dicho fenómeno es una vía propia de diversos tipos celulares siendo los más importantes las neuronas y las células neuroendocrinas. Este tipo de células llevan a cabo funciones específicas. En el caso de las neuronas su función principal es transmitir el impulso nervioso a través de todo el sistema nervioso, mientras que las células neuroendocrinas se encargan de liberar productos hormonales dependiendo del tipo celular en que se localicen (ej. células cromafines que liberan catecolaminas). En los años 50's, Katz y Fatt, sugirieron la existencia de vesículas sinápticas en neuronas para explicar la liberación cuántica¹ de acetilcolina observada en la unión neuromuscular (Fatt P y Katz B, 1952).

Las vesículas involucradas en esta vía son agrupadas a una distancia aproximada de 20 nm de la membrana celular (Zenisek D *et al.*, 2000) y permanecen esperando la señal de un segundo mensajero que promoverá la exocitosis de dichas vesículas. Los segundos mensajeros juegan un papel importante en la liberación de neurotransmisores, hormonas, enzimas, etc. Ejemplos de segundos mensajeros son el calcio intracelular (Douglas W, 1968), el Inositol trifosfato (IP₃) (Siegel GJ *et al.*, 1999), el Diacilglicerol (Nussey SS y Whitehead SA, 2001), entre otros. Una vez liberado el contenido vesicular se une a receptores específicos desencadenando el inicio de diversas vías celulares de señalización (Evanko D, 2005). En el proceso de exocitosis regulada por calcio, el calcio juega un papel importante al desencadenar la cascada de señales necesaria para iniciar dicho proceso. Algunas de las proteínas involucradas en este fenómeno (ej. la syntaxina, la sinaptobrevina) participan en la fusión de membranas vesicular y celular. Estas

¹ La liberación cuántica es una liberación por cuantos. En nuestro contexto consideramos un cuanto como el contenido de neurotransmisor liberado por una única vesícula.

proteínas ayudan a la formación del poro de fusión, estructura que permite la comunicación entre los medios intra y extracelular.

Como se mencionó antes, los segundos mensajeros juegan papeles importantes en el desarrollo del fenómeno de exocitosis. En nuestro caso particular el segundo mensajero que nos interesa estudiar es el calcio debido a que juega un papel importante en la exocitosis regulada de células cromafines.

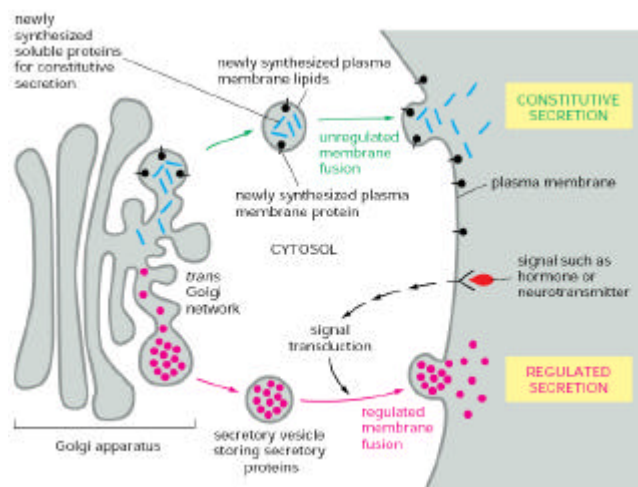


Figura 1.1 Vías de exocitosis. Las vesículas involucradas en ambos tipos de exocitosis se originan en la zona trans del complejo de Golgi. Dependiendo del contenido vesicular se define la vía por la cual se ha de llevar la exocitosis. La exocitosis constitutiva se lleva a cabo sin necesidad de una regulación por mensajeros celulares, mientras que la exocitosis regulada requiere de señales extracelulares para iniciarse. Adaptado del libro Essential Cell Biology.

1.1.3 Papel del calcio en la exocitosis.

Para llevarse a cabo la exocitosis regulada, las vesículas siguen una ruta de tráfico conocida como ciclo de las vesículas sinápticas, el cual se constituye de 4 etapas secuenciales específicas (Figura 1.2): Las vesículas son cargadas con neurotransmisor (etapa 1) y son agrupadas frente a la zona activa a una distancia aproximada de 20 nm de la membrana celular (Zenisek D *et al.*, 2000) (etapa 2). Posteriormente, mediante un proceso conocido como “acercamiento” (docking), las vesículas son acercadas a la zona activa a aproximadamente 10 nm (Gray EG, 1959) donde son “ancladas” (priming) y preparadas para la detección de la señal de calcio (etapa 3). Al producirse la elevación en la concentración de calcio extracelular se genera un potencial de acción que provoca la despolarización de la

membrana celular y abre canales de calcio dependientes de voltaje. La apertura de éstos canales permite la entrada de iones calcio necesarios para promover la exocitosis (etapa 4) (Südhof TC, 2004). Se sabe que el calcio lleva a cabo esta función mediante su interacción con proteínas localizadas en el sitio de fusión de la membrana o cerca de él (Barclay JW *et al.*, 2005).

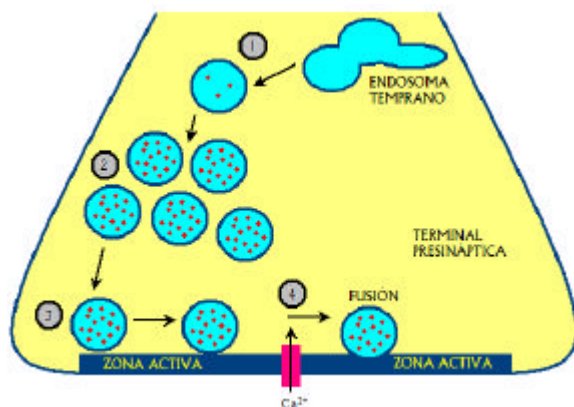


Figura 1.2 Ciclo de las vesículas sinápticas. 1) Las vesículas son cargadas con neurotransmisor y 2) agrupadas frente a la zona activa. 3) Luego son acercadas a la zona activa y 4) ancladas a la membrana para recibir la señal externa de calcio.

Cada etapa de este ciclo es mediada por diversas proteínas localizadas tanto en membrana vesicular como celular. Algunas de éstas proteínas forman complejos proteicos y cumplen diferentes funciones dependiendo del etapa en el que están involucradas. Se sabe también que el calcio activa estos complejos proteicos que están anclados a la superficie de las membranas vesicular y celular, facilitando la fusión de las vesículas y la liberación de neurotransmisores (etapa 4). Mediante estudios realizados en sistemas de fusión de membranas mediado por complejos proteicos se determinó que la regulación de la fusión de membranas mediada por calcio está dada por proteínas sensores de calcio (Meldolesi J y Chieriegatti E, 2004).

1.1.4 Proteínas involucradas en el fenómeno de exocitosis.

El proceso de exocitosis regulado requiere la participación de diversas proteínas para llevar a cabo las diferentes etapas de liberación de neurotransmisores (Figura 1.3). Se han realizado diversos estudios y se ha caracterizado un complejo formado por proteínas de membrana vesicular y membrana celular conocido como

complejo SNARE (por sus siglas en inglés, receptores de proteínas de unión al factor sensible a N-etilmaleimida) (O'Connor V *et al.*, 1994). Este complejo (Figura 1.4) está formado por una proteína de membrana vesicular, la Sinaptobrevina y dos proteínas de membrana celular, la Sintaxina y la SNAP-25 (por sus siglas en inglés, proteína asociada a sinaptosoma de 25 kilodaltones (KDa)). Dicho complejo es esencial para la dinámica de exocitosis.

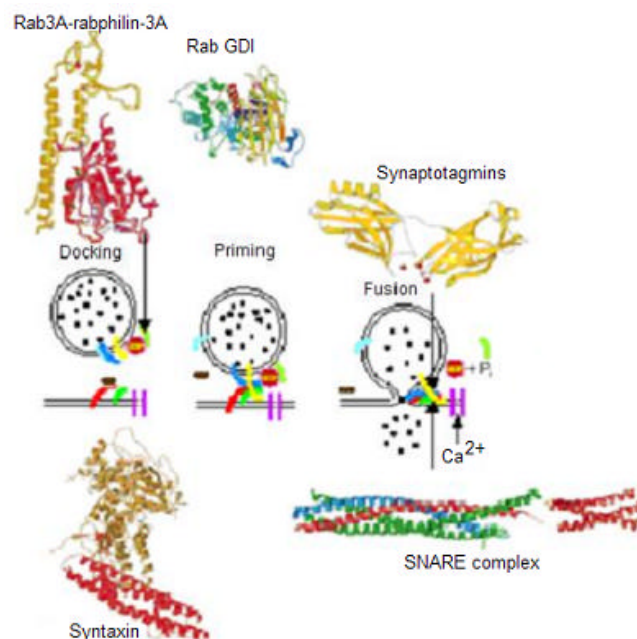


Figura 1.3. Diagrama ilustrativo de las proteínas involucradas en las diversas etapas del proceso de fusión. En el esquema se muestran algunas de las proteínas involucradas en el proceso de exocitosis en las etapas de acercamiento (docking) como es el caso de Rab3A, anclaje (priming) como por ejemplo RabGDI y fusión (fusion) como el complejo SNARE y las Sinaptotagmins. Adaptado de Brunger AT, 2000.

La Sintaxina y la Sinaptobrevina se unen entre sí, a lo largo de 60-70 aminoácidos y SNAP-25 estabiliza esta interacción (Lupas A *et al.*, 1991). Este complejo sirve de receptor para unas proteínas solubles que crean un sitio de alta afinidad para una ATPasa llamada NSF (por sus siglas en inglés, factor sensible a N-etilmaleimida) (Hayashi T *et al.*, 1994). Además de estas proteínas, participan muchas otras en las diversas etapas del ciclo y cumplen diferentes funciones como es el caso de Munc13 localizada en membrana celular, es una proteína que juega un papel importante en la etapa de anclaje. Existen en membrana celular otras proteínas como por ejemplo: Piccolo, Munc18, RIM (por sus siglas en inglés,

molécula que interactúa con la proteína Rab3), entre otras. Entre las proteínas de membrana vesicular se encuentran RAB3, proteína que participa en la etapa de acercamiento de la vesícula hacia la membrana celular, también la Rabfilina3A, Sinaptofisina y las familias de proteínas conocidas como Sinapsinas (ej. Sinapsina I, II y III), y Sinaptotagminas (ej. Syt I y Syt VII).

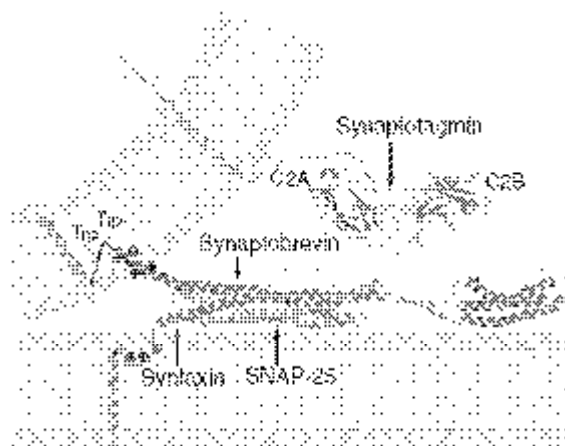


Fig. 1.4 Modelo del complejo SNARE y la Sinaptotagmina. El complejo SNARE está formado por las proteínas Sinaptobrevina (Synaptobrevin), Sintaxina (Syntaxin) y Snap25 (SNAP25). La Sinaptotagmina interactúa con este complejo a través de la unión con la proteína Sintaxina. Adaptado de Jackson MB y Chapman ER, 2006.

Actualmente se sugiere que existe energía proveniente de la unión de calcio con una proteína, la Sinaptotagmina, que facilita la fusión de membranas (Lin RC y Scheller RH, 1997). Esta proteína de 65 Kda (Chapman ER, 2002) está localizada en membrana vesicular y se ha propuesto que tiene la función de un sensor de la concentración de calcio (Geppert M *et al.*, 1994). Cada una de estas proteínas juega un papel importante en el fenómeno de exocitosis. Dicho fenómeno puede llevarse a cabo mediante el mecanismo de fusión completa o mediante el mecanismo de fusión transitoria. Estos mecanismos son definidos por la forma en que se lleva a cabo la fusión de membranas vesicular y celular, y la liberación de neurotransmisores. A continuación se describen estos mecanismos de exocitosis.

1.2 Mecanismos de exocitosis.

Existen dos mecanismos principales mediante los cuales las vesículas llevan a cabo el proceso de exocitosis: fusión completa y fusión transitoria.

1.2.1 Fusión completa.

El concepto de fusión completa indica que una vesícula fusiona su membrana con la membrana celular integrándose completamente y de forma irreversible. Este concepto fue introducido en 1973 por Heuser y Reese. Estos investigadores encontraron que al aplicar un estímulo eléctrico de 10 Hz a la unión neuromuscular de rana y mediante microscopía se detectaba una pérdida en la cantidad de membrana vesicular. Después de 15 minutos de estimulación, la pérdida en la membrana vesicular era balanceada por un incremento en la membrana celular. Este resultado sugirió que la membrana vesicular se integra completamente a la celular para permitir la liberación del contenido vesicular mediante exocitosis.

1.2.2 Fusión transitoria.

El concepto de fusión transitoria también conocido como “Kiss and Run” indica que una vesícula fusiona su membrana parcialmente con la membrana celular generándose un poro de fusión para luego retomar la membrana que ha fusionado y volver al espacio intracelular. Ceccarelli y colaboradores (1973) encontraron que mediante la aplicación de un estímulo eléctrico de 10 Hz durante 4 horas a la unión neuromuscular de rana, las vesículas una vez fusionadas se “re-formaban”. Notaron también que las vesículas que siguen este mecanismo de exocitosis son capaces de volver a almacenar y liberar neurotransmisor de forma parcial o total.

En base a estos mecanismos de exocitosis se han propuesto diversos modelos mediante los cuales se lleva a cabo la fusión de membranas y por lo tanto la formación del poro de fusión. A continuación se describe el modelo de fusión de membranas que prevalece debido a que requiere una menor cantidad de energía para llevar a cabo la fusión.

1.2.3 Modelos de formación del poro de fusión.

El poro de fusión es la estructura que se forma transitoriamente para conectar el lumen de la vesícula secretora y el medio extracelular. Es formado inmediatamente después de la fusión de membranas y termina antes de la integración completa de la membrana vesicular a la membrana celular. Fue observado por primera vez en mastocitos por medio de microscopía electrónica de criofactura (Chandler DE y Heuser JE, 1980).

Para minimizar la energía requerida en el proceso de fusión de membranas, la fusión debe realizarse a través de pequeños puntos de contacto. Para determinar como se lleva a cabo esta conexión, se han propuesto modelos de las posibles estructuras que sigue dicho fenómeno con la finalidad de minimizar el consumo de energía para llevar a cabo la fusión. El modelo que prevalece, debido a la menor cantidad de energía requerida es el llamado "Hipótesis Stalk (tallo)" (Figura 1.5). Este modelo describe las membranas como complejos de 2 monocapas lisas y capaces de curvarse. La formación del "tallo" es iniciada cuando las monocapas proximales hacen contacto en un punto determinado y forman una capa continua. Luego se da el contacto entre las monocapas distales. Una vez que las monocapas distales han hecho contacto seguirá la expansión del "tallo" lo cual provocará la ruptura de la capa continua formada por las monocapas distales generando así el poro de fusión. Otra opción en este modelo es que al hacer contacto las monocapas distales, estas sigan uniéndose una a la otra lo cual llevaría a un estado de hemifusión, en el cual la bicapa formada por las monocapas distales terminará por romperse dando paso a la formación del poro de fusión (Jahn R *et al.*, 2003).

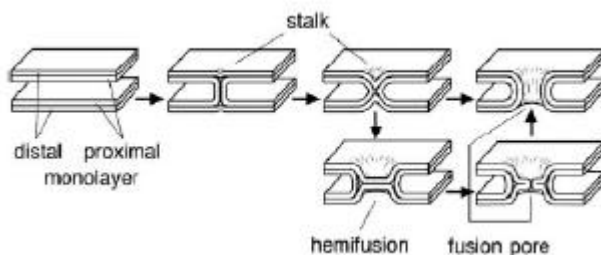


Figura 1.5. Estados de transición en el modelo de fusión de membranas conocido como Hipótesis Stalk.

Se sabe que en la formación del poro de fusión intervienen tanto los lípidos de las membranas como las proteínas involucradas en el ciclo de las vesículas sinápticas. Aún así no se ha logrado revelar si el poro de fusión está formado por proteínas, por lípidos o por ambos, es por ello que se han postulado diferentes hipótesis con la finalidad de elucidar la naturaleza de esta estructura (Almers W *et al.*, 1987; Monk JR y Fernández JM, 1992; Lindau M y Almers W, 1995).

1.2.4 Hipótesis de la naturaleza del poro de fusión.

Existen tres hipótesis que describen la forma en que ocurre la fusión de las membranas celular y vesicular, y por lo tanto la naturaleza del poro de fusión. La primera hipótesis indica que la fusión de membranas es de naturaleza proteica. Almers y colaboradores (1987) realizaron experimentos de patch clamp en mastocitos de ratón beige encontrando que la conductancia² inicial del poro de fusión durante la exocitosis es de 200 a 300 picosiemens (pS). Debido a que dicho valor es similar a la de un canal iónico de alta conductancia, se propuso que el poro de fusión es formado por proteínas. La segunda hipótesis indica que la fusión de membranas es de naturaleza lipídica. En experimentos realizados en neutrófilos con la técnica de patch clamp, se encontraron poros de fusión con conductancias bajas (alrededor de 50 pS). Debido a la variabilidad en las conductancias del poro de fusión y la transferencia de lípidos a través de poros de fusión transitorios, Monk y Fernández (1992) propusieron que el poro de fusión es formado por lípidos. Dichas hipótesis han generado un debate aún no resuelto, pero existe un consenso de opiniones. Lindau y Almers (1995) encontraron que cuando la conductancia del poro de fusión alcanza valores entre 0.5 y 1 nS el poro de fusión está formado por lípidos y proteínas. Esto constituye la tercer hipótesis que implica que el poro es de naturaleza proteolipídica. Independientemente de la naturaleza del poro de fusión, su formación se lleva a cabo siguiendo tres etapas: apertura, expansión y cierre.

² La conductancia en electricidad se designa con el símbolo G y se define como la capacidad que tiene un conductor para permitir el flujo de corriente a través de él. Sus unidades son los Siemens (S). En nuestro contexto el conductor es el poro de fusión y la corriente es el contenido vesicular liberado.

1.2.5 Etapas en la formación del poro de fusión.

Las etapas en la formación del poro de fusión son tres: apertura, expansión y cierre. En la etapa de apertura, el poro de fusión se abre abruptamente con una conductancia similar a la de un canal iónico de alta conductancia. Posteriormente comienza a expandirse. Esta expansión corresponde al reclutamiento de lípidos en la circunferencia del poro (Spruce AE *et al.*, 1990); puede ser lenta o rápida y se caracteriza por fluctuaciones rápidas y una gran conductancia (Álvarez de Toledo G y Fernández JM, 1988). Dichas fluctuaciones terminan generalmente con la expansión irreversible del poro hasta alcanzar una conductancia de gran valor que está por encima de los valores detectables. El valor límite alcanzado es de aproximadamente 20 nS. Si el poro alcanza estos valores de conductancia, raramente se cierra (Fernández Chacón R y Álvarez de Toledo G, 1995). Cuando el poro de fusión alcanza valores de conductancia menores a 20nS es posible que pueda cerrarse, dejando la vesícula casi intacta dentro de la célula (Fernández JM *et al.*, 1984). En ocasiones, una misma vesícula puede llevar a cabo varias fusiones transitorias antes de producirse la fusión irreversible (Álvarez de Toledo G y Fernández JM, 1988).

Los estudios de exocitosis y poro de fusión se han realizado con diversas técnicas y en diferentes tipos celulares que son considerados como modelos.

1.3 Células cromafines como modelo de estudio.

Existen diversos modelos en los cuales se ha estudiado la transmisión sináptica y en particular el fenómeno de exocitosis. Existen diversos tipos celulares que se emplean en la actualidad para el estudio de dichos fenómenos. Entre los más utilizados se encuentran las neuronas, los mastocitos, las células PC12, células beta y las células cromafines. Dichos modelos se utilizan para realizar diferentes estudios dependiendo de la técnica y del tópico de interés.

Las neuronas contienen vesículas sinápticas pero éstas son muy pequeñas por lo que es difícil trabajar con ellas debido a la resolución del equipo de amperometría

en parche. De los 4 tipos celulares mencionados los mastocitos contienen los gránulos secretores más grandes (1000 nm) (Popov AA, 1988) pero no son células excitables por calcio ya que en ellos es un cofactor (Lindau M y Fernández JM, 1986). Las células PC12 son una línea celular derivada de células cromafines y pueden ser un buen modelo de estudio, pero tienen la desventaja de que al ser una línea celular, no reflejan todas las características fisiológicas de una célula *in vivo*. Finalmente, las células cromafines que son células neuroendocrinas derivadas de neuronas contienen gránulos de aproximadamente 250 nm (Aunis D *et al.*, 1979) son células secretoras y excitables (Monck JR *et al.*, 1994), en ellas el calcio es crucial para el desarrollo del fenómeno de exocitosis. Además la exocitosis en estas células es rápida, de aproximadamente 400 milisegundos (Albillos A, 1997). Por todo lo anterior es que en este trabajo son utilizadas como modelo de estudio.

Las células cromafines están localizadas en la médula de la glándula suprarrenal y otros ganglios del sistema nervioso central. Son derivadas de neuronas y secretan catecolaminas como adrenalina y noradrenalina mismas que están implicados en la respuesta de alerta y estrés en mamíferos (Figura 1.6).



Figura 1.6 Localización y constitución de la glándula suprarrenal. La glándula suprarrenal está localizada en la parte superior de los riñones. Dicha glándula está compuesta por una corteza y una médula en donde se encuentran contenidas las células cromafines.

Las características de este tipo celular han permitido su utilización como modelo para el estudio del fenómeno de exocitosis haciendo uso de diversas técnicas.

1.4 Técnicas empleadas en el estudio de la exocitosis.

Para el estudio del fenómeno de exocitosis se han empleado diversas técnicas que incluyen técnicas de microscopía, electrofisiología y amperometría. A

continuación se describen algunas técnicas y su aplicación al estudio del fenómeno de exocitosis.

1.4.1 Microscopía de onda evanescente.

La técnica conocida como microscopía de onda evanescente o TIRFM (por sus siglas en inglés, Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) fue utilizada para estudiar cuantitativamente el movimiento y distribución de gránulos secretores cerca de la membrana plasmática, antes y durante la exocitosis de células cromafines de bovino (Johns LM *et al.*, 2001) y en vesículas sinápticas en terminales nerviosas (Zenisek D *et al.*, 2000; Duncan RR *et al.*, 2003). Esta técnica se basa en la ley de la óptica de Descartes: Si la luz que viaja en un medio denso (supongamos un cubreobjetos con un índice de refracción, n_1) choca con un medio menos denso (por ejemplo, un medio acuoso de menor índice de refracción, n_2) más allá de un “ángulo crítico”, θ , la luz tendrá reflexión total interna. Este ángulo crítico depende de los índices refractivos de ambos medios.

TIRFM ilumina selectivamente características subcelulares cercanas a la membrana plasmática (aprox. 300 nm) en regiones de contacto célula-sustrato, sin provocar señales de interferencia óptica posiblemente detectadas a mayor profundidad que la célula. Este método está basado en el uso de elementos fluorescentes como la proteína verde fluorescente (GFP), que se acumulan en compartimentos ácidos de la célula incluyendo gránulos cromafines. Actualmente se utilizan lípidos fluorescentes como el FM1-43 que tiñe vesículas sinápticas selectivamente. Este colorante es internalizado en vesículas cubiertas por clatrina cuando éstas son fusionadas a la membrana celular o cuando se produce alguna endocitosis. La ventaja de este método es que puede grabar en video los eventos de fluorescencia y efectuar superposiciones para identificar las diferencias en cada etapa. De esta forma permite estudiar varios eventos de fusión de vesículas simultáneamente.

La microscopía de onda evanescente permite determinar el tamaño de las vesículas que se fusionan y estimar el tiempo que le toma a una vesícula anclarse a la membrana celular y llevar a cabo exocitosis. La desventaja es que no es lo suficientemente cuantitativa y no permite medir los parámetros cinéticos de la liberación vesicular.

1.4.2 Microscopía de fluorescencia.

Esta técnica combina microscopía electrónica y tinción de muestras con colorantes fluorescentes (FM dyes, por sus siglas en inglés). Cuando un colorante es aplicado a la muestra, la superficie celular es teñida. Después se induce endocitosis lo que hará que el colorante sea internalizado en las vesículas. Posteriormente se realiza un lavado con medio libre de colorante, y las membranas se “destiñen” parcialmente, ya que las moléculas son retiradas de la membrana celular. Mediante un estímulo se induce la exocitosis y el resultado es un incremento en la superficie fluorescente que es una medida de la cantidad acumulada de membrana agregada por exocitosis (Brumback AC *et al.*, 2004).. Esta propiedad permite el estudio de la exocitosis directamente.

1.4.3 Microscopía de fuerza atómica.

El desarrollo de la técnica de microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) permite obtener imágenes de muestras biológicas con una resolución de unos cuantos nanómetros (Binnig G *et al.*, 1986). En AFM, una punta fabricada de silicio es utilizada para realizar un barrido de la superficie de la muestra con una fuerza constante (Albrecht TH *et al.*, 1990). Ambos, la punta y la muestra pueden ser movidos en dirección xyz para realizar el barrido de la muestra. Esto significa que la muestra puede moverse en dirección xyz para localizar una región particular en donde se desea realizar el barrido. Ya que se ha localizado dicha región, la muestra deja de moverse y entonces la punta puede ser movida en dirección xyz para localizarla sobre la región de interés. Una vez realizado esto, el equipo se encargará de realizar el barrido moviendo únicamente la punta sobre la muestra que ha quedado fija. La deflexión de la punta medida de forma óptica,

permite la obtención de un relieve de la superficie analizada (Figura 1.7). Para el estudio de muestras biológicas, es necesario realizar el barrido colocando la muestra en buffers que imitan condiciones fisiológicas. Dicha técnica se ha empleado para estudiar la existencia de poros de fusión en células neuroendocrinas (Jena BP, 2003).

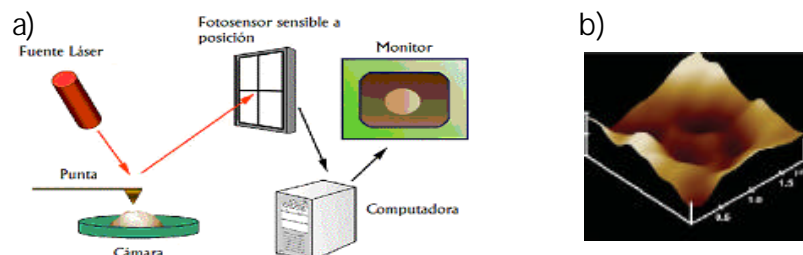


Figura 1.7 (a) Diagrama esquemático de los componentes de un microscopio de fuerza atómica. (b) Micrografía AFM de un poro de fusión en células acinares pancreáticas. Adaptados de Jena BP, 2003.

1.4.4 Patch Clamp.

Esta técnica fue desarrollada en los años 70 para elucidar el funcionamiento de los canales iónicos. Se utiliza una micropipeta para crear un contacto con una pequeña área de membrana celular conocida como parche. Después de la aplicación de una pequeña succión a través de la pipeta, el sello entre ésta y la membrana se vuelve tan estrecho que los iones no pueden fluir entre la pipeta y la membrana. Los iones que fluyen cuando un canal iónico se abre pasan directamente al interior de la pipeta. La corriente eléctrica resultante es medida con un amplificador electrónico conectado a la pipeta. Esta configuración es conocida como célula adherida o “Cell attached”. Existen otras configuraciones que permiten estudiar diversos aspectos celulares. Esas otras configuraciones son célula completa o “whole cell”, “inside-out” y “outside-out” (Figura 1.8). En el recuadro “Cell attached recording” se muestra la configuración de célula adherida. En dicha configuración se produce un parche de membrana y se registra lo que sucede solamente en el parche. A partir de esta configuración se puede pasar a la configuración “Inside-out” (Figura 1.8, recuadro “Inside-out recording”) donde el parche es separado del resto de la membrana celular y el interior celular queda expuesto al aire. Esta configuración permite el registro de corrientes de canales

iónicos únicos. Un beneficio de esta configuración es la posibilidad de cambiar el medio al que es expuesta la superficie intracelular. A partir de célula adherida se puede también pasar a la configuración de célula completa (Figura 1.8, recuadro “Whole cell recording”) mediante la aplicación de una succión más fuerte que rompe el parche y permite el registro de lo que sucede en el interior celular. Finalmente a partir de la configuración de “Whole cell” se puede pasar a la configuración “Outside-out” (Figura 1.8, recuadro “Outside-out recording”) en donde después de romper el parche, los extremos de la membrana se juntan dejando expuesta la superficie extracelular. Esta configuración sirve para estudiar cómo las señales extracelulares influyen en la actividad de canales iónicos.

En el estudio del fenómeno de exocitosis la técnica de patch clamp permite un control experimental del potencial de membrana para caracterizar la dependencia de voltaje de las corrientes de la membrana. Además, al basarse en el modelo eléctrico de la membrana (ver apartado de Amperometría en parche), permite el registro de un incremento en la capacitancia³ de la membrana celular que refleja el aumento en el área celular provocado por la fusión de vesículas que realizan exocitosis (Álvarez de Toledo G *et al.*, 1993).

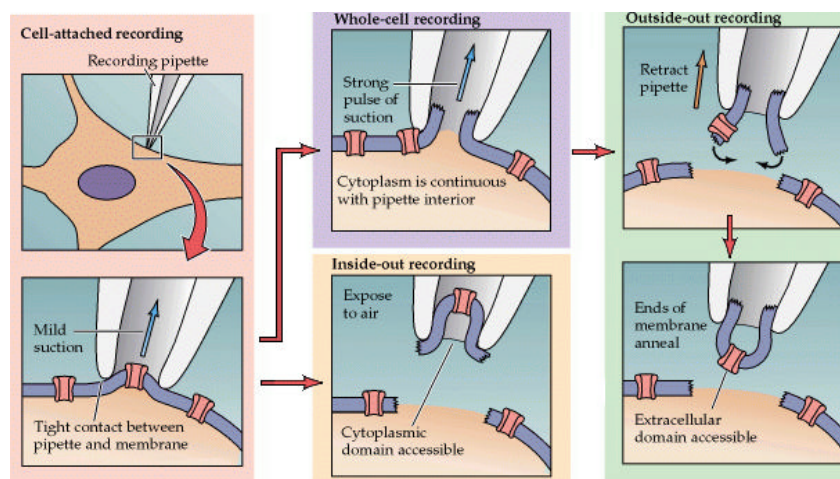


Figura 1.8. Configuraciones de la técnica de patch clamp. En este esquema ilustrativo se muestra como se lleva a cabo cada una de las configuraciones de patch clamp. Adaptado de Purves D *et al.*, 2001.

³ La capacitancia en electricidad es una medida de la capacidad que tiene un condensador para almacenar cargas. Sus unidades son los faradios (F). En este contexto el condensador es la membrana celular.

1.4.5 Amperometría.

Esta técnica está basada en una técnica de los años 80 conocida como voltametría o polarografía. En voltametría se aplica un voltaje a un electrodo que se encuentra inmerso en una mezcla de reacción para oxidar las moléculas de interés. El uso de varios perfiles de voltaje aplicado durante la oxidación, resulta en la transferencia de electrones a la superficie del electrodo, produciendo una corriente que varía dependiendo del voltaje aplicado y de la identidad de la molécula oxidada. El análisis de estas corrientes oxidativas permite la identificación de las diferentes moléculas químicas presentes en la mezcla de reacción.

Tomando las bases de oxidación de monoaminas en la superficie del electrodo (Kissinger PT *et al.*, 1973; McCreery RL *et al.*, 1974), Wightman y sus colegas consideraron que la combinación de la técnica de amperometría a voltaje constante combinada con el uso de un pequeño electrodo de fibra de carbono (alrededor de 8 μm de diámetro) (Gonon F *et al.*, 1980) proveían las herramientas necesarias para la detección del fenómeno de exocitosis. Colocando un electrodo en la superficie de una célula cromafin durante la estimulación de la liberación de neurotransmisores, lograron realizar mediciones presinápticas de liberación exocitótica de adrenalina y noradrenalina almacenadas en vesículas individuales (Leszczyszyn DJ *et al.*, 1990) (Figura 1.9a).

En un experimento de amperometría, se genera un trazo de corriente donde cada espiga de amperometría representa la corriente producida por la oxidación de las moléculas liberadas por una vesícula (Figura 1.9b). El área bajo esta curva de corriente es utilizada para calcular el número de moléculas de neurotransmisor liberadas en cada evento de exocitosis, mientras que la forma de la espiga brinda información acerca de los diferentes estados de la liberación del neurotransmisor ya sea el inicio de la liberación, el punto máximo y la difusión de neurotransmisores (Evanko D, 2005).

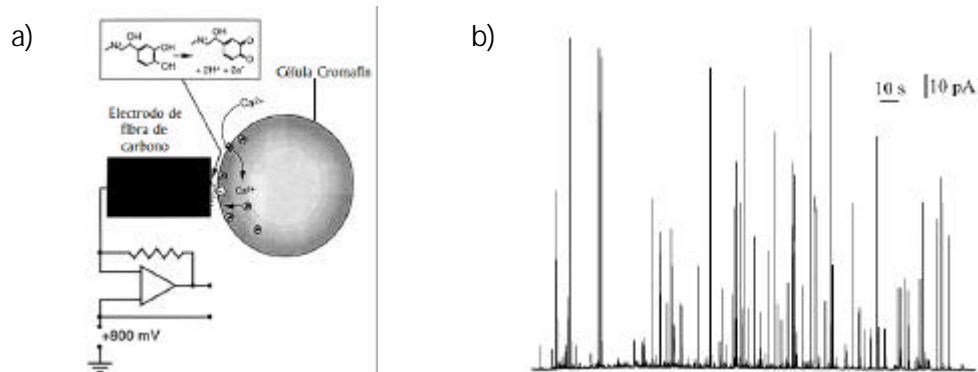


Figura 1.9 (a) Diagrama ilustrativo de un experimento de amperometría. Adaptado de <http://www.mpibpc.mpg.de/groups/neher/groups/mme/projects.html> (b) Ejemplo de registro de amperometría en células cromafines de bovino. Adaptado de Amato re C *et al.*, 2005.

1.4.6 Amperometría en parche.

Esta técnica combina simultáneamente la medida de capacitancia de membrana en registro “in situ” con la detección electroquímica del neurotransmisor oxidable por amperometría. Esto se logra al insertar un electrodo de fibra de carbono en el interior de la micropipeta de registro (Figura 1.10). Consiste básicamente en detectar en un pequeño parche de membrana la fusión de vesículas y además el contenido que liberan dichas vesículas al fusionarse a la membrana celular.

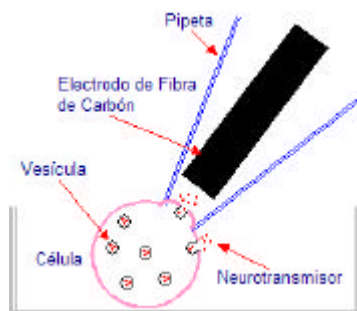


Figura 1.10. Diagrama representativo de la configuración empleada durante un experimento de amperometría en parche.

La capacitancia de membrana refleja la adhesión de membrana vesicular a la membrana celular o la eliminación de membrana celular. Lo cual permite determinar la fusión de vesículas a la membrana celular. En esta técnica se trabaja con la configuración de célula adherida o “cell attached” de patch clamp.

Una vez realizado el sello, se detecta la capacitancia de la membrana celular y se estimula el fenómeno de exocitosis registrándose las variaciones en la capacitancia.

La membrana celular es capaz de generar una corriente capacitativa ante un cambio de voltaje y comportarse como un condensador eléctrico, en el cual los medios intra y extracelular son las placas del condensador y la bicapa lipídica actúa como dieléctrico (Figura 1.11).

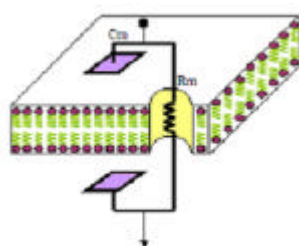


Figura 1.11. Modelo eléctrico de la membrana. En este diagrama se muestra como la membrana actúa como un condensador donde los medios intra y extracelular son las placas del condensador y la bicapa lipídica actúa como dieléctrico. C_m representa la capacitancia de la membrana. R_m representa la resistencia de la membrana.

La capacitancia de la membrana está dada por:

$$C = \epsilon \epsilon_0 \times \frac{S}{d}$$

Donde C es la capacitancia de la membrana, ϵ es la constante dieléctrica del material aislante que separa los medios intra y extracelular, es decir, la bicapa fosfolipídica, ϵ_0 es la constante dieléctrica del espacio, d es la distancia que separa las placas del condensador, es decir, el grosor de la bicapa lipídica que es de aproximadamente 5 nm y S la superficie de la membrana celular. Los parámetros ϵ , ϵ_0 y d se consideran constantes, por lo tanto, existe una relación directa entre la superficie de la membrana celular (S) y la capacitancia de la membrana (C). Esto indica que las variaciones registradas en la capacitancia son debidas a la adición o sustracción de fosfolípidos en la membrana es decir, a un aumento en la superficie membranal.

Por otra parte, el electrodo de amperometría detecta la liberación de neurotransmisor. El electrodo es sometido a un potencial fijo que oxida las

moléculas de neurotransmisor. Al ser oxidadas en la superficie del electrodo, estas moléculas liberan electrones que son transferidos a través de éste produciendo un flujo de corriente. Como se mencionó antes (apartado 1.3) las células cromafines secretan catecolaminas. Las diversas catecolaminas poseen diferentes potenciales de oxidación. Para garantizar que todo el contenido vesicular es oxidado se fija el potencial de oxidación del electrodo de amperometría en parche en +750 milivolts (mV). La técnica de amperometría en parche es una herramienta muy poderosa y versátil en el estudio de exocitosis ya que mantiene inalterable el citoplasma celular respetando sus funciones e incrementa la resolución en la medida de la capacitancia. La resolución del equipo de amperometría en parche permite la detección de la exocitosis de vesículas del orden de 50nm de diámetro (Dernick G *et al.*, 2005). Además permite la detección de la liberación de neurotransmisores durante una fusión transitoria o durante la etapa inicial de apertura del poro de fusión o incluso la detección de la fusión de vesículas que no liberan neurotransmisor (Figura 1.12).

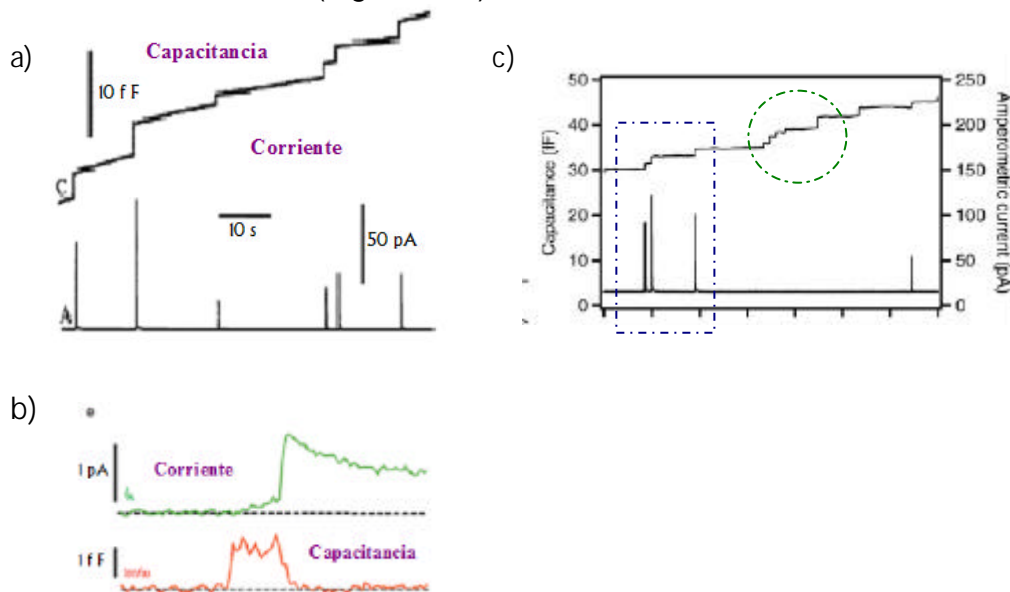


Figura 1.12. Ejemplos de registros de amperometría en parche. (a) Eventos de fusión completa (irreversible). El trazo superior marcado con C representa las variaciones en la capacitancia de membrana mientras que el trazo inferior marcado con A, representa el trazo de amperometría. Adaptado de Gong LW *et al.*, 2003. (b) Evento de fusión transitoria. Puede observarse que existe un aumento en la capacitancia de membrana seguido de una disminución, lo cual indica que la vesícula se fusionó a la membrana celular y posteriormente se despegó, regresando al medio citosólico. Adaptado de Dernick G *et al.*, 2003. (c) Eventos de fusión irreversible (rectángulo) y eventos de fusiones de vesículas sin secreción (círculo). Adaptado de Tabares L *et al.*, 2001.

Al obtener un registro de amperometría en parche (Figura 1.12), se analizan los incrementos o saltos de capacitancia y las espigas de amperometría. En un evento de fusión completa se analizan los siguientes parámetros (Figura 1.13): **STEP** (representa el valor del salto de capacitancia, es decir, la variación en la capacitancia de la membrana al fusionarse una vesícula, y da una medida directa del tamaño de vesícula), **DELAY** (representa el tiempo que transcurre desde que se da la fusión de la vesícula hasta que inicia la secreción de neurotransmisores), **I_{max}** (amplitud máxima, representa el valor máximo de la corriente generada por la oxidación de neurotransmisores, es decir el flujo al cual se liberan los neurotransmisores), **HALFWIDTH** o **t_{1/2}** (representa la anchura de la espiga al 50% de su amplitud máxima, este tiempo representa la cinética de liberación del neurotransmisor), **RT (rise time)** (tiempo transcurrido desde el inicio de la secreción, hasta alcanzar la amplitud máxima de la corriente, PEAK), y **Q** (carga, cantidad de neurotransmisor liberado, se obtiene integrando el área bajo la espiga).

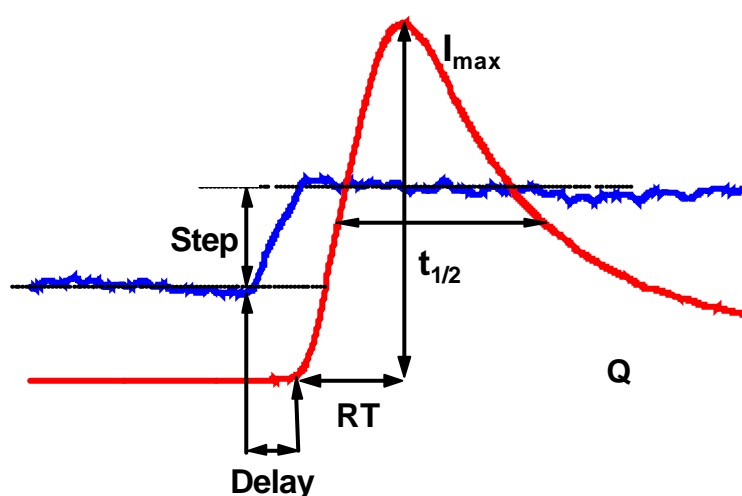


Figura 1.13 Diagrama que muestra los parámetros analizados en un registro de amperometría en parche (evento de fusión irreversible).

1.5 Exocitosis modulada por proteínas.

En el proceso de exocitosis regulado se involucran numerosas proteínas que realizan diferentes funciones. Como se mencionó en el capítulo anterior, algunas de las proteínas involucradas en dicho proceso, funcionan como sensores del calcio necesario para disparar la exocitosis. En este capítulo se describen algunas de las principales proteínas que se proponen como encargadas de llevar a cabo esta función.

1.5.1 Proteínas sensores de calcio.

En el proceso de exocitosis regulada por calcio, la liberación de neurotransmisores por vesículas sinápticas ocurre debido al flujo de iones de calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje (Südhof TC, 1995). En esta etapa del ciclo de las vesículas sinápticas, se involucran proteínas cuya función es detectar las variaciones en la concentración de calcio intracelular. Una vez que dicha concentración se incrementa en el espacio intracelular, la maquinaria secretora lo detecta a través de los sensores de calcio. Se conoce que en este proceso participan diversos sensores de calcio, pero actualmente se propone la familia de proteínas Sinaptotagminas, las cuales desempeñan un papel importante en la detección de las variaciones en la concentración de calcio intracelular (Südhof TC, 1995).

1.6 Sinaptotgminas.

Las Sinaptotagminas son una familia de proteínas de membrana presentes en varios organelos intracelulares. En vertebrados se han encontrado 16 isoformas, de las cuales la más abundante es la Sinaptotagmina I (Sugita S *et al.*, 2001). Esta familia de proteínas se caracteriza por tener un dominio transmembranal N-terminal o TMR y dos dominios C2 terminal, homólogos al dominio C2 de la proteína cinasa C, conocidos como C2A y C2B (Südhof TC y Rizo J, 1996). A través del dominio C2A, estas proteínas interactúan con la Sintaxina (Li C *et al.*, 1995). Aunque aún no se conoce exactamente el mecanismo de función del

dominio C2B se cree que está implicado en el proceso de endocitosis (Südhof TC, 2004).

1.6.1 Dominios C2.

Los dominios C2 son porciones de proteína de alrededor de 130 aminoácidos. Fueron definidos primero en la proteína cinasa C (PKC, por sus siglas en inglés) y posteriormente en alrededor de 50 proteínas más, de las cuales, la mayoría participa en tráfico celular y transducción de señales (Rizo J y Südhof TC, 1998). La característica más común de estos dominios es su capacidad de unir iones calcio y fosfolípidos (Nalefski EA *et al.*, 1998). Ambos dominios tienen estructura de β -sandwich conformado por dos hojas β antiparalelas (Figura 1.14). El dominio C2B es 20 aminoácidos más largo que el dominio C2A y contiene dos estructuras α -hélice; el dominio C2A carece de dichas estructuras. En las caras superior e inferior de la estructura β -sandwich, existen diversos loops. En el caso de las Sinaptotagminas, los loops localizados en la cara superior de la estructura β -sandwich se encargan de unir iones calcio. El dominio C2A une tres iones calcio mientras que el dominio C2B une solamente 2 (Figura 1.14). Se sabe que estos dominios permiten modular la exocitosis controlando el cambio entre la fusión completa y la fusión transitoria (Wang CT, 2003).

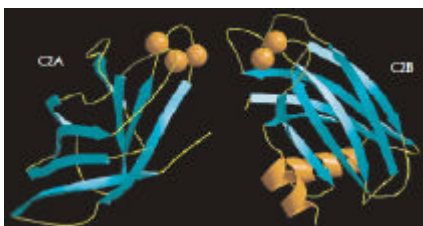


Figura 1.14. Estructura tridimensional de los dominios C2. Las esferas en naranja son los iones calcio que une cada uno de los dominios. En azul, las láminas beta, y en naranja las hélices alfa. Adaptado de Yoshihara M, 2003.

Aunque los isoformas de la Sinaptotagmina (Syt) comparten los mismos dominios receptores de iones calcio (Figura 1.15), existe variabilidad en la afinidad por el calcio entre los diferentes miembros de esta familia de proteínas. La diferencia en afinidad por dichos iones depende de su conformación tridimensional, específicamente de la cantidad de superficie hidrofóbica expuesta al momento de plegarse la proteína (Rhee JS, 2005). En experimentos realizados en células

PC12, se encontró que las Sinaptotagminas de membrana celular unen calcio con una afinidad 5 a 10 veces mayor que las sinaptotagminas de membrana vesicular (Sugita S, 2002). Los resultados de un experimento realizado en liposomas mediante quelación de calcio, demostraron que las diferentes sinaptotagminas liberan calcio con cinéticas diferentes (Hui E, 2005). Esto permitió organizar a las diferentes sinaptotagminas en tres grupos. En el grupo I se encuentran las sinaptotagminas que liberan calcio rápidamente (50 ms) y entre ellas se encuentran la Syt I, II y III. En el segundo grupo, se encuentran las Syt V, VI, IX y X; y su cinética de liberación de calcio es media (250 ms). Finalmente en el tercer grupo se encuentra la Syt VII, la proteína con cinética de liberación de calcio más lenta (500ms) (Hui E *et al.*, 2005), es decir que esta última es la de mayor afinidad por el calcio. Las diversas Syts tienen diferentes propiedades o funciones debido a las diferencias en afinidad por el calcio y a su diferente localización, ya sea en membrana vesicular o membrana celular.

Figura 1.15. Dominios compartidos por las Syts. Los diversos isoformas de las Syts comparten los mismos dominios aceptores de iones calcio que en la figura se representan por C₂A y C₂B. Adaptado de Südhof TC, 2002.



1.7 Propiedades de isoformas de Sinaptotagminas.

A pesar de que la mayoría de las proteínas de esta familia se desconoce su función, algunas de ellas han podido elucidarse. En la Tabla 1.1 se muestran propiedades de las diferentes Sinaptotagminas, tales como su localización subcelular y su dependencia de calcio.

Aunque estas proteínas son las principales candidatas para funcionar como sensores de calcio en la exocitosis regulada por calcio se sabe que no son las únicas responsables pues se ha encontrado que en su ausencia persiste la exocitosis dependiente de calcio (Fernández-Chacón R *et al.*, 2001). La Syt I interactúa con SNAP-25 de forma dependiente de calcio, también mediante el dominio C2A (Schiavo G *et al.*, 1997). La Syt VII y la Syt III se localizan en membrana celular, (Butz S *et al.*, 1999; Sugita S *et al.*, 2001; Littleton JT y Adolfsen B, 2001). Se ha encontrado que la Syt VII se localiza también en lisosomas (Martinez I *et al.*, 2000). Sugita (2002) ha propuesto que las Sinaptotagminas de membrana vesicular y celular funcionan como sensores de calcio complementarios entre sí. Esto significa que existe alguna Sinaptotagmina en membrana vesicular que trabaja como complemento de otra Sinaptotagmina localizada en membrana celular. Así mismo propone que los diferentes isoformas de la sinaptotagmina participan en la exocitosis con una afinidad por el calcio de forma jerárquica. Su propuesta se basa en las diferentes afinidades por el calcio y localizaciones de las diversas Sinaptotagminas.

En membrana vesicular la más importante es la Sinaptotagmina I, mientras que en membrana celular es la Sinaptotagmina VII. Existen estudios realizados para elucidar la función de la Syt I (Desai RC *et al.*, 2001; Yoshihara M y Montana ES, 2004; Rhee JS *et al.*, 2005) pero de la Syt VII no se conoce con exactitud el papel que juega en el proceso de exocitosis regulado por calcio.

Tabla 1.1. Propiedades de las Sinaptotagminas. Adaptado: Littleton JT y Adolfsen B, 2000; Südhof TC 2002.

Gen	Especies	Patrón de expresión	Localización subcelular	¿Unión a fosfolípidos dependiente de calcio?	Función
Syt I	Humano, rata, ratón, C.elegans, Drosophila	Neuronal	Vesículas sinápticas	Si	Sensor de calcio para exocitosis rápida
Syt II	Humano, rata, ratón	Neuronal, mastocitos, células pancreáticas	Vesículas sinápticas, lisosomas de mastocitos	Si	Sensor de calcio para exocitosis rápida
Syt III	Rata, ratón	Neuronal, células pancreáticas	Membrana plasmática presináptica, gránulos en células β	Si	¿Sensor de calcio en exocitosis?
Syt IV	Rata, ratón, C.elegans, Drosophila	Neuronal	En Drosophila en vesículas sinápticas; en rata, colocaliza con marcadores del aparato de Golgi	No	Se desconoce
Syt V	Rata, ratón, Drosophila	Neuronal, baja expresión en hígado, tejido adiposo, pulmón y corazón de rata	En zona activa y membrana plasmática	Si	¿Sensor de calcio en exocitosis?
Syt VI	Humano, rata, ratón	Cerebro, Ubicuo	En zona activa y membrana plasmática	No	¿Sensor de calcio en exocitosis?
Syt VII	Humano, rata, ratón, C.elegans, Drosophila	Cerebro, Ubicuo	En zona activa y membrana plasmática	Si	¿Sensor de calcio en exocitosis?
Syt VIII	Humano, ratón	Cerebro, Ubicuo	Se desconoce	No	Se desconoce
Syt IX	Humano, rata, ratón, Drosophila	Cerebro, Ubicuo	Se desconoce, ¿vesículas sinápticas?	No	Se desconoce
Syt X	Rata, ratón	Neuronal	En zona activa y membrana plasmática	Se desconoce	¿Sensor de calcio en exocitosis?
Syt XI	Humano, rata, ratón	Neuronal	Se desconoce	No	Se desconoce

1.8 Sinaptotagmina VII.

Sugita y colaboradores (2001) sugieren que la proteína sinaptotagmina VII se encuentra localizada en membrana celular, en donde funciona como sensor de calcio para la exocitosis. Ellos proponen que ésta proteína actúa como un

complemento para otros isoformas de sinaptotagmina localizados en membrana vesicular. Por otra parte, existen otros trabajos que proponen que su localización es vesicular o lisosomal (Fukuda M *et al.*, 2004; Wang CT *et al.*, 2006). En un estudio llevado a cabo en células PC12 y con marcaje de la proteína Syt VII con proteína verde fluorescente (GFP) se demostró por medio de ensayos inmunohistoquímicos que ésta línea celular expresa establemente el complejo Syt VII-GFP y se localiza tanto en vesículas como en otros organelos membranales tales como el aparato de Golgi y lisosomas (Fukuda M *et al.*, 2004). Wang y colaboradores (2006) demostraron en células PC12 que Syt VII colocaliza con Syt I. Este resultado les hizo sugerir que la proteína Syt VII, localizada en membrana vesicular, funciona como sensor de calcio de alta afinidad.

En la exocitosis regulada por calcio la Syt VII restringe el poro de fusión (Jaiswal JK *et al.*, 2004). Haciendo uso de microscopía de evanescencia se llevaron a cabo estudios en lisosomas de fibroblastos de embriones de ratón con la finalidad de estudiar el fenómeno de exocitosis en fibroblastos de ratones silvestres (Syt VII WT) y lisosomas de fibroblastos de ratones knock out para la proteína Syt VII (Syt VII KO). En dichos estudios los lisosomas fueron cargados con dextranos de diferentes pesos moleculares (10 kDa, 70kDa, 145kDa, 250kDa y 500kDa) y se indujo la exocitosis. En células de genotipo silvestre los dextranos de 10kDa a 250kDa pudieron pasar a través del poro de fusión formado durante el evento de exocitosis, no así el dextrano de 500kDa. En células de genotipo knock out todos los dextranos pudieron pasar a través del poro de fusión. Se encontró que en los fibroblastos de ratones silvestres la mayoría de los lisosomas liberaron su contenido parcialmente y las proteínas de sus membranas no se difundieron completamente a la membrana celular. Por otra parte, los fibroblastos de ratones Syt VII KO llevaron a cabo exocitosis mediada por calcio y las proteínas de la membrana se difundieron a la membrana celular. Esto indicó que la proteína Syt VII no es la principal implicada para llevar a cabo la exocitosis mediada por calcio, pero si está implicada en la restricción de la cinética de expansión del poro de fusión (Jaiswal JK *et al.*, 2004).

De acuerdo a lo anterior, la sinaptotagmina VII se localiza tanto en membrana vesicular como en membrana celular. Aunque esto sigue siendo tema de debate, es posible que se localice en ambos tipos de membrana, ya que puede tomar varias formas dependiendo del tipo de "splicing" que sufra. Existen tres formas de Syt VII: truncada, pequeña y larga (Sugita S *et al.*, 2001). La forma truncada carece de dominios C2, la forma pequeña posee un fragmento de 45-115 residuos entre los dominios C2 y el dominio TMR. La forma larga posee un fragmento de más de 314 residuos entre los dominios C2 y el dominio TMR (Sugita S *et al.*, 2001). Esta característica podría permitir a la Syt VII localizarse en diferentes tipos de membranas y no exclusivamente en un tipo como la Syt I que localiza únicamente en membrana vesicular (Südhof TC, 2002).

Las técnicas utilizadas en los estudios realizados previamente para elucidar la función de ésta proteína en la regulación de la exocitosis mediada por calcio no ofrecen resultados contundentes ya que no permiten distinguir si la liberación de neurotransmisores es debida a un fenómeno de fusión transitoria o a una fusión completa. Haciendo uso de la técnica de amperometría en parche es posible elucidar de forma más concreta en que puntos participa ésta proteína debido a que permite la detección simultánea de la capacitancia de membrana celular y vesicular y de la corriente amperométrica producida por la oxidación de los neurotransmisores liberados.

Es por ello que es de nuestro interés y objetivo de este trabajo determinar el papel de la proteína Sinaptotagmina VII en el proceso de liberación de neurotransmisor para lo que diseñamos experimentos de amperometría en parche con células cromafines de ratones de genotipo silvestre, knock out y knock in.

En el presente trabajo damos a conocer los resultados de los estudios realizados en ratones de genotipo silvestre (WT), ratones carentes de la proteína Syt VII, cuyo genotipo es knock out (KO) y ratones cuya proteína Syt VII contiene

mutaciones puntuales en el dominio C2B, lo cual hace que dicho dominio esté inactivo, genotipo knock in (C2B KI).

La Sinaptotagmina VII participa en el proceso de exocitosis mediado por calcio regulando el poro de fusión excitotico

OBJETIVOS

GENERALES

- Determinar el efecto de la proteína Sinaptotagmina VII en el proceso de exocitosis mediado por calcio.
- Determinar la función de los dominios C2 de la proteína Sinaptotagmina VII en la regulación del poro de fusión exocitótico.

ESPECÍFICOS

- Realizar experimentos de amperometría en parche con células cromafines de genotipo silvestre (WT) y knock out (KO) para la proteína Sinaptotagmina VII con la finalidad de determinar el efecto de ésta proteína en el proceso de exocitosis mediado por calcio.
- Estudiar el efecto producido por la proteína a diferentes concentraciones de calcio extracelular con la finalidad de confirmar que el efecto de la proteína Sinaptotagmina VII es el mismo independientemente de la concentración de calcio extracelular.
- Realizar experimentos de amperometría en parche en células cromafines de genotipo silvestre, células sin la proteína Sinaptotagmina VII (genotipo knock out) y células cuya proteína Sinaptotagmina VII tiene el dominio C2B inactivo (genotipo knock in) con la finalidad de elucidar la función que desempeñan los dominios C2 en el proceso de exocitosis mediado por calcio.

**EFEECTO DE LA SINAPTOTAGMINA VII
EN EL PROCESO DE EXOCITOSIS
REGULADO POR CALCIO**

CAPÍTULO 2.

Efecto de la Sinaptotagmina VII en el proceso de exocitosis regulado por calcio.

En la introducción se mencionó el posible papel de la sinaptotagmina VII como sensor de calcio en el proceso de exocitosis mediado por calcio. En el presente capítulo se muestran los resultados de los experimentos de amperometría en parche llevados a cabo en ratones de genotipo silvestre y knock out para la proteína Syt VII con la finalidad de determinar el papel que juega esta proteína en el proceso de exocitosis mediado por calcio. Se muestra además el efecto que tiene el calcio en dicho proceso.

2.1 La Sinaptotagmina VII acelera la apertura del poro de fusión y la velocidad de liberación de neurotransmisores.

La técnica de amperometría en parche permite la detección simultánea de la capacitancia de membrana y de la corriente amperométrica producidas en el proceso de exocitosis. Esto permite determinar cómo se lleva a cabo la fusión de vesículas a la membrana celular (ya sea por fusión completa o fusión transitoria) y la detección del contenido vesicular liberado. A partir de esto se puede obtener información acerca de cómo está regulado el poro de fusión excitotóxico. Por estas razones, dicha técnica resulta una herramienta poderosa en el estudio del fenómeno de exocitosis. En este estudio la utilizamos para determinar el papel que juega la proteína Syt VII en el proceso de exocitosis mediado por calcio. Para ello, se hicieron experimentos de amperometría en parche en células cromafines (CC) de ratones de genotipo silvestre (WT) y knock out para la proteína Syt VII (Syt VII

KO) de la cepa Blacksix en condiciones de calcio extracelular (i.e. calcio en la pipeta, $[Ca^{2+}]_p$) de 5 mM (Figura 2.1). Para llevar a cabo dichos experimentos, el equipo fue ajustado a las condiciones mencionadas en el Anexo D.

En la Figura 2.1 se observan los registros representativos de un experimento llevado a cabo en células de genotipo WT (a) y en células de genotipo KO (b). Tanto en (a) como en (b) el trazo inferior muestra las espigas de corriente amperométrica, esto es, las espigas generadas por la oxidación de catecolaminas en la superficie del microelectrodo al fusionarse una vesícula a la membrana celular. Cada espiga corresponde a la liberación de única vesícula (Wightman RM y Haynes CL, 2004). En el trazo superior, se muestran los saltos de capacitancia de membrana que indican las fusiones de membrana vesicular a la membrana celular. Del registro de sucesión de picos y saltos es necesario analizar cada evento por separado. Lo que significa que en el trazo de amperometría (inferior) se analiza espiga por espiga con sus respectivos trazos de capacitancia de membrana (superior).

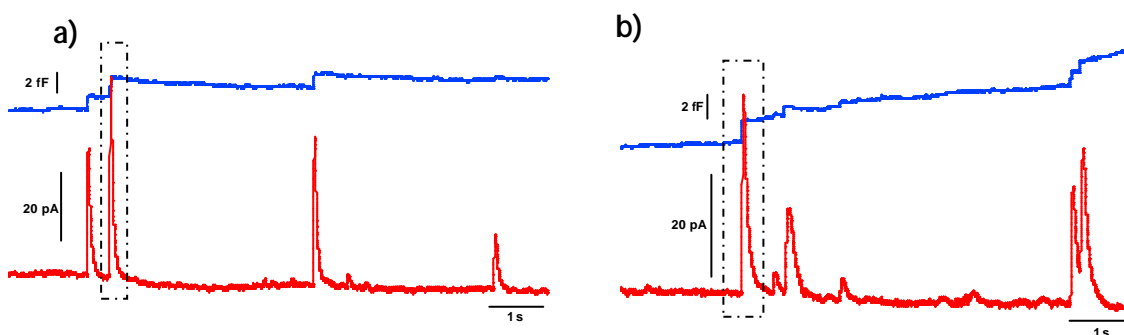


Figura 2.1. Experimentos de amperometría en parche en células cromafines (CC) de ratones de la cepa Blacksix en condiciones de calcio extracelular (i.e. calcio en la pipeta, $[Ca^{2+}]_p$) 5mM. a) CC de ratones de genotipo silvestre (WT). b) CC de ratones de genotipo knock out (KO). El trazo superior representa el registro de capacitancia. El trazo inferior representa el registro de amperometría. En las zonas punteadas se indica un evento a analizar (ver Figura 3.5). A través de todo el registro se analiza espiga por espiga (amperometría) y sus correspondientes saltos (capacitancia).

Las etapas de la exocitosis pueden dividirse en 4 en relación a la forma de la espiga de la señal amperométrica (Figura 2.2). En la etapa I, se lleva a cabo la aproximación de la vesícula a la membrana celular. En la etapa II, la vesícula se fusiona a la membrana celular y se genera la formación del poro de fusión

transmembranal y su posterior expansión. El poro de fusión permite la comunicación entre el interior de la vesícula y el espacio extracelular. Cuando el poro de fusión es lo suficientemente estable, i.e. cuando su tiempo de duración es mayor a 1 ms, las pequeñas cantidades de catecolaminas liberadas durante esta etapa son detectadas por la superficie del microelectrodo y generan pequeñas corrientes amperométricas. Estas pequeñas corrientes son observadas como un “pie” que precede a la espiga amperométrica. En el caso contrario no es posible detectar esta pequeña señal y se observa la espiga de amperometría sin “pie”. La etapa de apertura del poro de fusión (etapa II) está dada por el *Delay* (el tiempo transcurrido desde la formación del poro de fusión hasta el inicio de la liberación de neurotransmisor). Una vez que se ha fusionado la vesícula transcurre un tiempo para que la liberación de neurotransmisor inicie (en algunos casos es tan rápido que el equipo registra un *Delay* casi de cero). Cuando se inicia el registro del trazo de amperometría ha iniciado la liberación. Esto es, el poro de fusión ha iniciado su expansión. En la Etapa III se da la máxima expansión del poro de fusión, lo cual se ve reflejado en el valor máximo de la corriente (I_{max}). Una vez que el poro ha alcanzado su máxima expansión (Etapa III), éste se rompe dando lugar a la integración de la membrana vesicular a la membrana celular liberando el contenido vesicular. Se observa un incremento rápido de la espiga y finalmente en la etapa IV, los neurotransmisores difunden fuera de la matriz vesicular y conducen a una disminución exponencial de la corriente de la espiga.

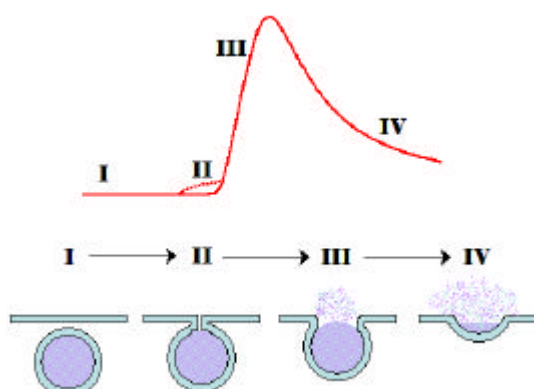


Figura 2.2. Etapas de la exocitosis. En éste esquema se muestran las diferentes fases definidas de acuerdo a lo registrado por el electrodo de amperometría. Etapa I: aproximación de la vesícula a la membrana celular. Etapa II: fusión de la vesícula a la membrana celular y formación del poro de fusión. Etapa III: expansión del poro de fusión. Etapa IV: integración total de la membrana vesicular a la membrana celular y difusión de neurotransmisores. La línea punteada en la espiga indica el “pie” que es posible registrar cuando el poro de fusión es estable.

En la introducción se mostró la fórmula que rige el comportamiento de la capacitancia de membrana: $C = \epsilon \epsilon_0 \times S/d$, y observamos que al ser constantes los valores ϵ , ϵ_0 y d , la capacitancia da información sobre la fusión de vesículas a la membrana celular, es decir que partiendo de esta fórmula es posible calcular el área de membrana vesicular fusionada a la membrana celular. Considerando que la vesícula posee una forma esférica, es posible obtener su diámetro a partir del parámetro S ya que $S=4\pi r^2$. Por lo tanto, podemos obtener el tamaño de la vesícula. En base a esto y considerando que en el análisis de los registros de los experimentos realizados en CC WT y CC KO se observó que la diferencia en el salto de capacitancia entre genotipos WT y KO a una concentración de calcio extracelular de 5mM no es significativamente diferente, (Tabla 2.1, Figura 2.3) lo que nos lleva a proponer que el tamaño de vesícula tampoco lo es.

Tabla 2.1. Parámetros analizados en registros de CC de ratones de genotipo WT y KO a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM.

$[Ca^{2+}]_p=5mM$	WT	KO	Diferencia Significativa
Step (fF)	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	ND
Delay(ms)	9.4 ± 0.7	12.1 ± 0.8	**
I_{max} (pA)	21.7 ± 1.6	31.1 ± 3.1	**
t_{1/2} (ms)	78.6 ± 3.5	107.8 ± 4.9	***
RT (ms)	17.3 ± 0.8	22.6 ± 1.1	***
Q (pC)	2.4 ± 0.2	3.5 ± 0.3	***
No. eventos (n)	209	183	
No. Células	20	16	
No. Ratones	6	4	

El símbolo * denota que tan significativa es la diferencia. Con * se denota una diferencia significativa del 95% ($p<0.05$). Con ** se denota una diferencia significativa del 99% ($p<0.01$). Finalmente, con *** se denota una diferencia significativa del 99.9% ($p<0.001$). Con ND se denota que no existe diferencia significativa.

En la Tabla 2.1 se muestra un resumen de los datos obtenidos a partir del análisis de los registros de experimentos en células cromafines de ratones de genotipo silvestre y ratones de genotipo knock out. El error estándar (ES) fue calculado mediante la fórmula $ES=s/\sqrt{n}$ donde s representa la desviación estándar de la muestra y n el tamaño de la muestra. Se realizaron 6 cultivos de ratones de

genotipo silvestre y 4 cultivos de ratones de genotipo knock out. La diferencia significativa fue calculada mediante la prueba paramétrica Wilcoxon-Mann-Whitney para muestras de diferente tamaño.

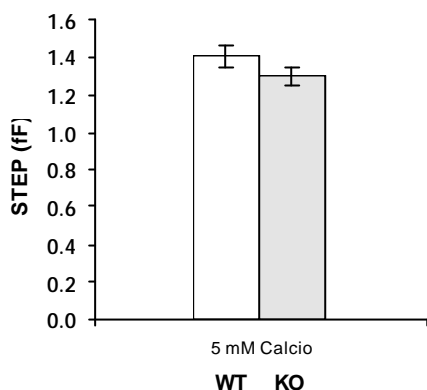


Figura 2.3. Capacitancia de membrana. Se observa que el tamaño de salto de capacitancia de membrana (STEP) no es significativamente diferente entre genotipos. $p=0.4057$. El valor de p se obtuvo mediante la prueba paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. $[Ca^{2+}]_p = 5$ mM. WT: $n=209$; KO: $n=183$.

Al realizar el análisis de los registros de amperometría se observó que los parámetros *Delay* y anchura de la espiga ($t_{1/2}$) son mayores en el genotipo KO (Tabla 2.1, Figura 2.4). Un aumento en la duración del *Delay* nos indica que a las células de genotipo KO les toma más tiempo lograr la apertura del poro de fusión, pues la vesícula tarda más en iniciar la liberación de su contenido una vez que se ha fusionado con la membrana celular y formado el poro de fusión (Figura 2.5).

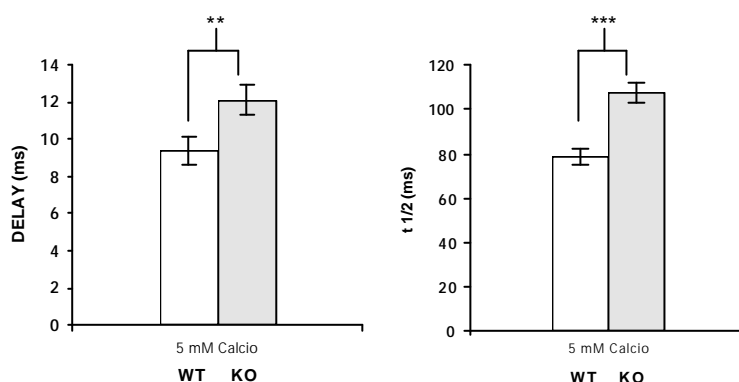


Figura 2.4. Análisis de los parámetros cinéticos *Delay* y $t_{1/2}$. En los histogramas de ambos parámetros puede observarse una mayor duración para el genotipo KO. Esto indica que tanto la apertura y expansión del poro de fusión como la liberación de neurotransmisores es más lenta en las células de genotipo KO comparada con el control, cuando la proteína Syt VII se encuentra ausente. WT: $n=209$; KO: $n=183$.

El $t_{1/2}$ también es mayor en CC KO (Tabla 2.1, Figura 2.4) lo que significa que en éstas células la liberación de neurotransmisores es más lenta comparado con el control. En la Figura 2.5 se muestra la amplificación de los eventos enmarcados en la zona punteada en la Figura 2.1 y puede apreciarse que en las CC KO (c) el *Delay* y el $t_{1/2}$ son de mayor magnitud que en las CC WT (b).

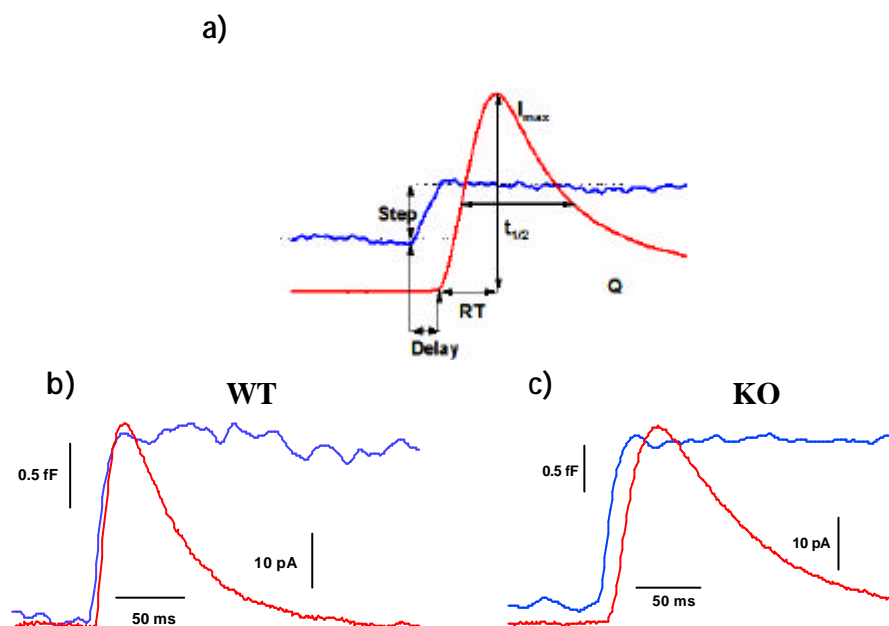


Figura 2.5. Diferencias entre eventos representativos de CC de genotipo WT y KO. a) Esquema ilustrativo de los parámetros analizados: *Step*, *Delay*, *RT*, $t_{1/2}$, I_{max} y *Q*. b) Amplificación del evento enmarcado en la Figura 2.1a, (WT). c) Amplificación del evento enmarcado en la Figura 2.1b, (KO). Al comparar dos eventos representativos en b y c, se pueden observar diferencias respecto a los parámetros cinéticos. En c) puede observarse un *Delay* mayor, así como una espiga más ancha ($t_{1/2}$) comparado con b).

Se observó también que tanto el punto máximo del flujo de liberación de neurotransmisores (I_{max}) como la carga de neurotransmisor (*Q*) son mayores en las células cromafines de genotipo KO comparadas con el control (Figura 2.6). Recordemos que la carga (*Q*) es el área bajo la curva, por lo que la diferencia en este valor entre genotipos WT y KO está relacionado con el punto máximo del flujo de liberación (I_{max}) como con la liberación de neurotransmisores ($t_{1/2}$).

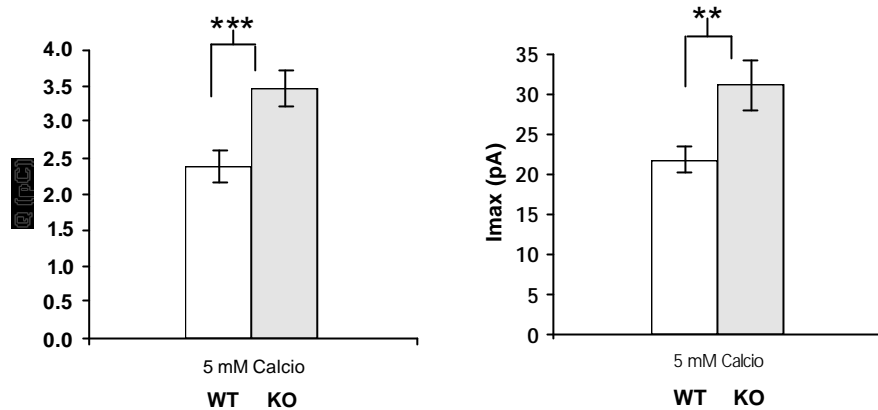


Figura 2.6. Valores de Q e I_{max} en CC WT y CC KO. En los histogramas puede observarse que tanto la carga como la corriente máxima tienen valores mayores en el genotipo KO. WT: n=209, 20 células, 6 ratones, $Q(pC)=2.4\pm 0.2$, $I_{max}(pA)=21.7\pm 1.6$; KO: n=183, 16 células, 4 ratones, $Q(pC)=3.5\pm 0.3$, $I_{max}(pA)=31.1\pm 3.1$.

Con estos datos es posible sugerir que la proteína Sinaptotagmina VII ayuda a la apertura y expansión del poro de fusión, ya que cuando está ausente se observa un incremento en el tiempo desde la formación del poro de fusión hasta su apertura lo que da lugar al inicio de la liberación de los neurotransmisores (*Delay*, Figura 2.4, Figura 2.5). Además el flujo de liberación de neurotransmisores también se ve afectado cuando la proteína está ausente ($t_{1/2}$, Figura 2.4; Figura 2.5). Sin embargo, mediante esta técnica no es posible elucidar los mecanismos mediante los cuales la célula genera vesículas con mayor carga cuando la proteína está ausente.

De acuerdo a lo anterior se sugiere que el papel de la proteína Syt VII en el fenómeno de exocitosis mediado por calcio es acelerar la apertura y expansión del poro de fusión, así como la velocidad de liberación de neurotransmisores en células cromafines de ratón.

Continuando con el análisis de los registros, se separaron los eventos de fusión transitoria de los eventos de fusión completa. Un evento de fusión transitoria se diferencia de uno de fusión completa ya que el segundo presenta una variación en la capacitancia de membrana en forma de salto (Figura 2.7a). Las fusiones transitorias presentan una variación en el trazo de capacitancia que aparece como un aumento en la capacitancia seguido de una disminución y puede tener forma

cuadrada o de pico; la diferencia entre estas formas depende del tiempo que la vesícula permanezca fusionada a la membrana celular. En la Figura 2.7b se presenta un evento de fusión transitoria en forma de pico, este tipo de fenómenos son conocidos como "Flickers" (oscilaciones). En otros casos, la fusión transitoria es tan rápida que no es posible registrar una variación en la capacitancia de membrana (Figura 2.7c).

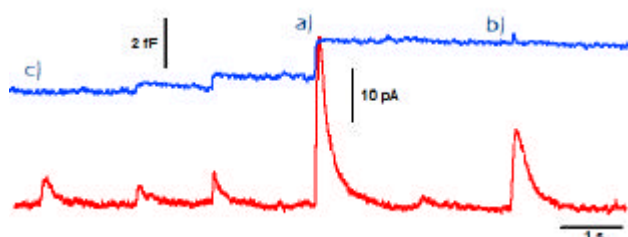


Figura 2.7. Tipos de eventos de fusión vesicular. Evento de fusión completa (a), evento de fusión transitoria con variación en la capacitancia, conocido como flicker (b) y evento de fusión transitoria sin variación en la capacitancia (c).

Se hizo la separación de eventos de fusión transitoria y fusión completa en los registros obtenidos en ambos genotipos. Posterior a esto se contabilizaron los eventos y se observó que en el genotipo knock out existe una disminución en la cantidad de transitorias comparado con el genotipo silvestre, los resultados se muestran en la Figura 2.8.

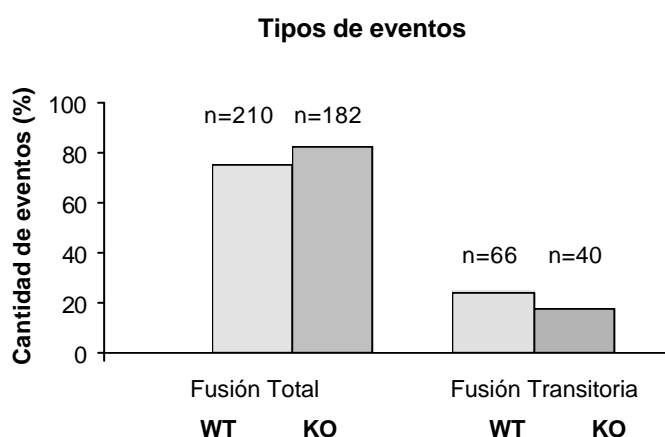


Figura 2.8. Tipos de eventos. En este gráfico se muestra la cantidad de eventos de cada tipo para ambos genotipos, silvestre y knock out. Se puede observar que la cantidad de eventos de fusión transitoria es menor en el genotipo knock out. Los porcentajes para fusión total son: 76 y 82% para los genotipos WT y KO respectivamente; para fusión transitoria: 24 y 18% para WT y KO respectivamente. En condiciones $[Ca^{2+}]_i$ 5mM. Total de eventos (Fusión total + Fusión transitoria): WT=276, KO=222.

En resumen, observando los resultados mostrados en la Tabla 2.1 se sugiere que en ausencia de la proteína Syt VII la célula no modifica la maquinaria encargada de la formación de las vesículas ya que con o sin ésta proteína el tamaño de las

vesículas no se altera (Valor *Step* en Tabla 2.1; Figura 2.3). Esto indica que la proteína Syt VII no está implicada a este nivel del ciclo de las vesículas sinápticas lo cual correlaciona con la idea de que el papel principal de dicha proteína es funcionar como sensor de calcio para la exocitosis mediada por calcio (Sugita S *et al.*, 2001; Wang CT *et al.*, 2005). Por otra parte, se observan diferencias significativas en los parámetros *Delay* y $t_{1/2}$ (Tabla 2.1; Figura 2.4). Esto sugiere que la célula requiere de la proteína Syt VII para facilitar la apertura y expansión del poro de fusión ya que la liberación de neurotransmisores es más lenta en su ausencia. Se observó también que tanto la corriente máxima (I_{max}) como la carga (Q) tienen magnitudes mayores en células cromafines de genotipo KO (Figura 2.6) y se observó también que en ausencia de la proteína Syt VII se observa una ligera disminución en la cantidad de eventos de fusión transitoria (Figura 2.7). Por el contrario, en presencia de la proteína se observaron más eventos de fusión transitoria sugiriendo que probablemente la proteína participa de alguna forma en la regulación (vía restricción) del tamaño del poro de fusión, lo cual correlaciona con lo observado por Jaiswal y colaboradores (2004). De acuerdo a esto se sugiere que la proteína Syt VII está involucrada en el proceso de exocitosis mediada por calcio donde juega un papel importante en la regulación del poro de fusión y por lo tanto en la liberación de neurotransmisores.

2.2 El efecto de la Sinaptotagmina VII no depende de la concentración de calcio extracelular.

Con la finalidad de corroborar que el efecto producido por la proteína Syt VII en el fenómeno de exocitosis mediada por calcio se debe a la proteína en sí, y no a la concentración de calcio extracelular, se realizaron experimentos de amperometría en parche en CC de ratones de genotipo WT y KO a las concentraciones de calcio extracelular (i.e. calcio en la pipeta, $[Ca^{2+}]_p$) de 5mM (ver apartado 3.1) y $[Ca^{2+}]_p$ de 10mM. Las condiciones de trabajo están descritas en el Anexo D. En los registros obtenidos se analizaron las variaciones en la capacitancia y se observó que el salto de capacitancia no es significativamente diferente entre genotipos WT y KO a una $[Ca^{2+}]_p$ 10mM (Tabla 2.2, Figura 2.9). De acuerdo a lo planteado en el

apartado 2.1, nuevamente observamos que el tamaño de vesícula no es afectado por la ausencia de la proteína Syt VII aún a una concentración de calcio extracelular mayor. Esto reafirma la idea que la proteína Syt VII no está involucrada en esta etapa del ciclo de las vesículas sinápticas.

Por otra parte, al analizar los registros obtenidos de los experimentos realizados en células cromafines de ratones de genotipo WT y KO a una $[Ca^{2+}]_p$ 10mM se observó que al igual que en el apartado 2.1 donde se discutieron los resultados obtenidos al realizar experimentos de amperometría en parche en células cromafines de ratones de genotipo WT y KO a una $[Ca^{2+}]_p$ 5mM, los parámetros *Delay* y $t_{1/2}$ tienen mayor duración en las células de genotipo KO a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM comparado con el control (Tabla 2.2, Figura 2.10).

Tabla 2.2. Parámetros analizados en registros de CC de ratones de genotipo WT y KO a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM.

$[Ca^{2+}]_p=10mM$	WT	KO	Diferencia Significativa
Step (fF)	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.04	ND
Delay (ms)	6.0 ± 0.5	8.1 ± 0.6	*
I_{max} (pA)	30.5 ± 1.9	43.1 ± 3.9	*
t_{1/2} (ms)	61.7 ± 2.7	73.6 ± 4.1	**
RT (ms)	15.5 ± 0.7	18.6 ± 1.0	**
Q (pC)	2.4 ± 0.2	2.9 ± 0.2	**
No. eventos (n)	199	173	
No. Células	12	12	
No. Ratones	5	5	

*p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.001. ND: no existe diferencia significativa.

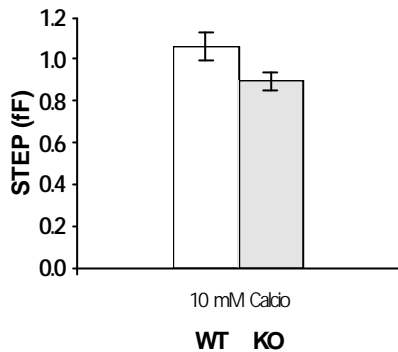


Figura 2.9. Capacitancia de membrana. Se observa que el tamaño de salto de capacitancia de membrana (STEP) no es significativamente diferente entre genotipos. $p=0.3867$. El valor de p se obtuvo mediante la prueba paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. $[Ca^{2+}]_p$ 10 mM. WT: $n=199$; KO: $n=173$.

Así mismo se observó que aún a una concentración de calcio extracelular mayor el efecto de la Sinaptotagmina VII es el mismo ya que los resultados a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM muestran la misma tendencia que los resultados obtenidos a una $[Ca^{2+}]_p$ 5mM. Estos resultados reafirman la idea de que la Syt VII acelera la apertura y expansión del poro de fusión así como la liberación de neurotransmisores.

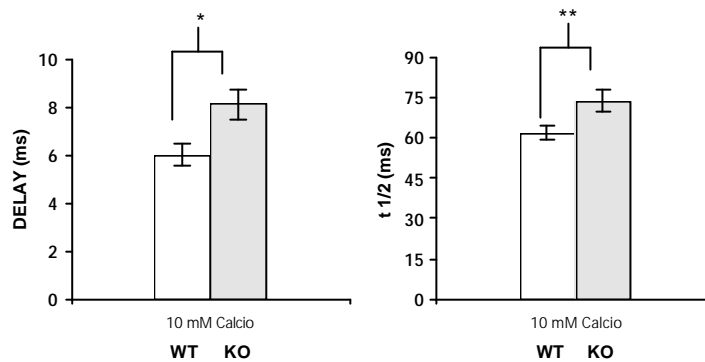


Figura 2.10. Análisis de los parámetros cinéticos *Delay* y $t_{1/2}$. En los histogramas de ambos parámetros puede observarse una mayor duración para el genotipo KO. Esto indica que tanto la apertura y expansión del poro de fusión como la liberación es más lenta en células cromafines de genotipo KO comparada con el control cuando la proteína Syt VII se encuentra ausente, aún cuando la concentración de calcio extracelular es mayor. Estos resultados reafirman la idea de que la proteína Syt VII acelera la formación, apertura y expansión del poro de fusión así como la velocidad de liberación de neurotransmisores en células cromafines de ratón. WT: $n=199$; KO: $n=173$.

Además se observó que también a una $[Ca^{2+}]_p$ 10mM tanto la corriente máxima (I_{max}) como la carga (Q) tienen mayor magnitud en las células de genotipo KO (Tabla 2.2, Figura 2.11) y que en el genotipo KO existe una menor cantidad de fusiones transitorias (Figura 2.12).

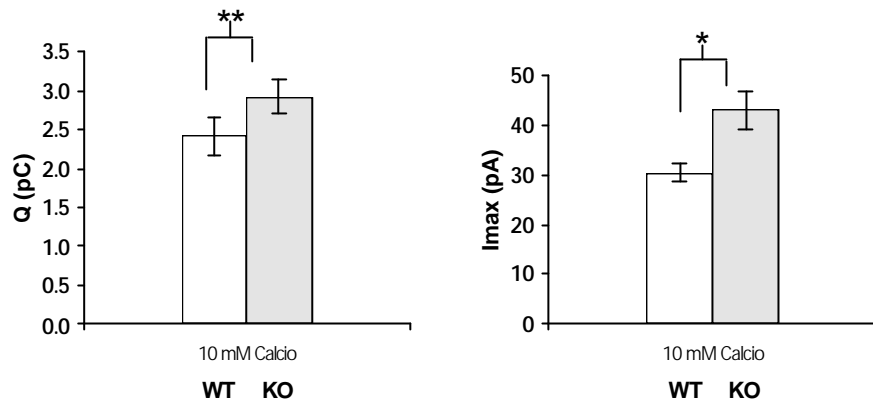


Figura 2.11. Valores de Q y I_{max} en CC WT y CC KO. En los histogramas puede observarse que tanto la carga como la corriente máxima tienen valores mayores en el genotipo KO. WT: n=199; KO: n=173.

Tipos de eventos

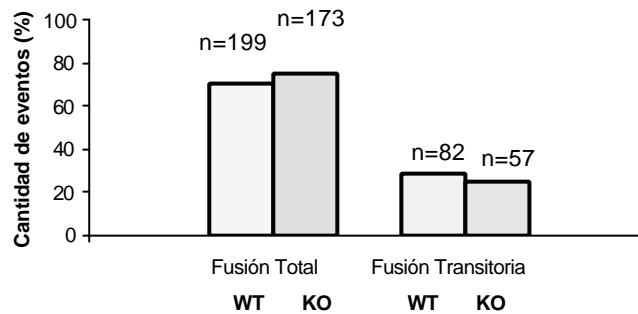


Figura 2.12. Tipos de eventos. En este gráfico se muestra la cantidad de eventos de cada tipo para ambos genotipos, silvestre y knock out. Se puede observar que la cantidad de eventos de fusión transitoria es ligeramente menor en el genotipo knock out. Los porcentajes para fusión total son: 71 y 75% para los genotipos WT y KO respectivamente; para fusión transitoria: 29 y 25% para WT y KO respectivamente. $[Ca^{2+}]_i$ 10mM. Total de eventos (Fusión total + Fusión transitoria): WT=281, KO=230.

Al igual que en la Tabla 2.1 al observar los resultados de la Tabla 2.2 se corrobora que la proteína Syt VII no modifica la maquinaria empleada para la formación de las vesículas sinápticas. Se sugiere también que la proteína Syt VII participa en el proceso de exocitosis mediado por calcio regulando la apertura y expansión del poro de fusión. Finalmente también se comprueba que la Syt VII acelera la liberación de neurotransmisores en células cromafines de ratón independientemente de la concentración de calcio extracelular.

2.3 La regulación del poro de fusión y la liberación de neurotransmisores dependen de la concentración de calcio extracelular.

En el apartado 2.2 se observó como independientemente de la concentración de calcio extracelular el efecto de la proteína Syt VII es el mismo, ya que tanto a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM como a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM se observa la misma tendencia en los datos obtenidos a partir de los registros. Sin embargo, al comparar los datos obtenidos de células de genotipo WT a ambas concentraciones de calcio extracelular y de células de genotipo KO también a ambas concentraciones de calcio extracelular, se observó que existen diferencias significativas. En las Tablas 2.3 y 2.4 se presentan los datos obtenidos a ambas concentraciones de calcio.

Tabla 2.3 Datos obtenidos de experimentos de amperometría en parche en CC WT a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM y $[Ca^{2+}]_p$ 10mM.

Parámetro	WT 5mM Ca	WT 10mM Ca	Diferencia Significativa
Step (fF)	1.4 ± 0.1	1.1 ± 0.1	***
Delay (ms)	9.4 ± 0.7	6.0 ± 0.5	***
I_{max} (pA)	21.7 ± 1.6	30.5 ± 1.9	***
$t_{1/2}$ (ms)	78.6 ± 3.5	61.7 ± 2.7	***
RT (ms)	17.3 ± 0.8	15.5 ± 0.7	*
Q (pC)	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.2	ND
No. eventos (n)	209	199	
No. Células	20	12	
No. Ratones	6	5	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$. ND: no existe diferencia significativa.

Tabla 2.4 Datos obtenidos de experimentos de amperometría en parche en CC KO a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM y $[Ca^{2+}]_p$ 10mM.

Parámetro	KO 5mM Ca	KO 10mM Ca	Diferencia Significativa
Step (fF)	1.3 ± 0.1	0.9 ± 0.04	°°°
Delay (ms)	12.1 ± 0.8	8.1 ± 0.6	°°°
I_{max} (pA)	31.1 ± 3.1	43.1 ± 3.9	°°
$t_{1/2}$ (ms)	107.8 ± 4.9	73.6 ± 4.1	°°°
RT (ms)	22.6 ± 1.1	18.6 ± 1.0	°°
Q (pC)	3.5 ± 0.3	2.9 ± 0.2	ND
No. eventos (n)	183	173	
No. Células	16	12	
No. Ratones	4	5	

°p<0.05, °°p<0.01 y °°°p<0.001. ND: no existe diferencia significativa.

Al analizar los datos de la Tabla 2.3 se observa que para el genotipo WT existe una diferencia significativa en el tamaño del salto de capacitancia (Step) dependiente de la concentración de calcio extracelular. Recordando que a partir de la capacitancia es posible obtener el tamaño de la vesícula, podemos sugerir que el tamaño de la vesícula sí disminuye cuando se aumenta la concentración de calcio extracelular. Una posible explicación a este fenómeno puede ser que el calcio esté dando la señal a la célula para producir una mayor cantidad de vesículas que estén disponibles para llevar a cabo fusión y liberar su contenido. Esto es, que al haber mayor disponibilidad de calcio en el medio, la maquinaria encargada de la formación de las vesículas acelere su producción dando lugar a la aparición de vesículas más pequeñas. Por otra parte, los parámetros *Delay* y $t_{1/2}$ (Tabla 2.3; Figura 2.13) también presentan una disminución significativa cuando se aumenta la concentración de calcio extracelular. Esto nos sugiere que el aumento en la concentración de calcio acelera la apertura y expansión del poro de fusión, así como la velocidad de liberación de neurotransmisores en células cromafines de ratón. A pesar de que las vesículas difieren en tamaño cuando se varía la concentración de calcio en células cromafines la cantidad de neurotransmisor liberado puede o no variar. Este efecto podría estar regulado por otro mecanismo.

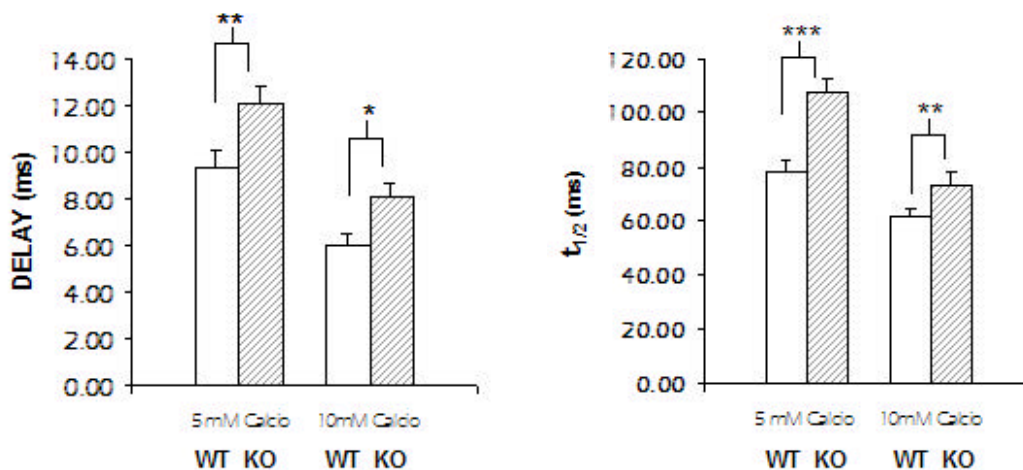


Figura 2.13. Efecto del calcio extracelular en el fenómeno de excitosis. Se puede observar como el *Delay* es menor para el genotipo WT a una concentración de 10mM de calcio que a una concentración de 5 mM de calcio. Se observa lo mismo para el $t_{1/2}$ (Tabla 2.3). El calcio produce un efecto “acelerante” de la apertura y expansión del poro de fusión así como de la liberación de neurotransmisores. Lo mismo ocurre para el caso de los ratones KO. La diferencia significativa fue calculada mediante la prueba paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Además al comparar los datos obtenidos de las fusiones transitorias se observa que cuando se da un aumento en la concentración de calcio existe un aumento en el número de fusiones transitorias en ambos genotipos (Figura 2.14).

Fusiones transitorias

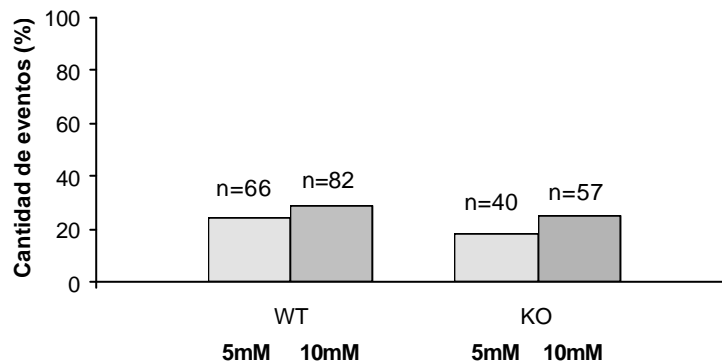


Figura 2.14. Fusiones transitorias. El aumento en la concentración de calcio extracelular, aumenta ligeramente la cantidad de eventos de fusión transitoria para ambos genotipos WT y KO. Los porcentajes para fusión transitoria en células WT son: 24 y 29% para las concentraciones de calcio 5mM y 10mM respectivamente; para células KO son: 18 y 25% para las concentraciones de calcio 5mM y 10mM respectivamente. Total de eventos (Fusión total + Fusión transitoria): $[Ca^{2+}]_p$ 5mM: WT=276, KO=222; $[Ca^{2+}]_p$ 10mM: WT=281, KO=230.

En general, el calcio acelera el proceso de excitosis en células cromafines de ratón. Una posible explicación de lo que ocurre en la célula con la maquinaria de excitosis sería que, al haber una mayor cantidad de calcio en el medio, la

maquinaria de exocitosis indica a la célula que debe mantener disponible una mayor cantidad de vesículas, ya que el proceso estará acelerado y por lo tanto es probable que la maquinaria encargada de la formación de las vesículas produzca vesículas más pequeñas. Ahora bien, ya que estas vesículas se encuentran disponibles para llevar a cabo fusión, es posible que se acerquen a la membrana celular debido a que probablemente todo el proceso está acelerado por el calcio y en lugar de realizar fusiones completas llevan a cabo fusiones transitorias ya que la misma señal de calcio obliga a las vesículas a permanecer disponibles. En este caso, las vesículas liberan parte de su contenido aunque tal vez dicha señal de calcio las obliga a regresar al medio citoplásmico y ser recargadas para seguir realizando exocitosis.

**PAPEL DEL DOMINIO C2B DE LA
SINAPTOTAGMINA VII EN EL PROCESO DE
EXOCITOSIS REGULADO POR CALCIO**

Capítulo 3.

Papel del dominio C2B de Sinaptotagmina en el proceso de exocitosis regulado por calcio.

En el capítulo anterior se observó que el papel de la proteína Syt VII en el fenómeno de exocitosis mediado por calcio es acelerar la apertura y expansión del poro de fusión, así como el flujo de liberación de neurotransmisores en células cromafines de ratón. Además, participa en la regulación (vía restricción) del tamaño del poro de fusión. Por otra parte, se observó que el efecto de la Syt VII en el proceso de exocitosis no depende de la concentración de calcio extracelular. Finalmente, observamos que el proceso de exocitosis mediado por calcio sí depende de la concentración de calcio extracelular. En el presente capítulo se muestran los resultados de experimentos de amperometría en parche realizados con células cromafines de ratones de genotipo knock in (KI). Los ratones del genotipo KI tienen inactivo el dominio C2B (dominio sensor de calcio) de la proteína Sinaptotagmina VII. Dicha inactivación consiste en el reemplazo de 3 residuos de aspartato por alaninas en los *loops* de unión a calcio, el resto de la proteína se encuentra intacta y funcional. La finalidad de inactivar este dominio es observar cuál es su papel en la detección de calcio en el proceso de exocitosis mediado por calcio.

3.1 El dominio C2B de la proteína Sinaptotagmina VII participa en la regulación del poro de fusión y en el control de la liberación de neurotransmisores.

Con la finalidad de determinar el papel que juega el dominio C2B de la proteína Syt VII en el proceso de exocitosis mediado por calcio, se realizaron experimentos de amperometría en parche en células cromafines de ratones de genotipo silvestre (WT), knock out (KO) (ver Capítulo 2) y knock in (KI) de la cepa Blacksix a una concentración de la pipeta $[Ca^{2+}]_p$ 5mM de acuerdo a las condiciones planteadas en el Anexo D. Se analizaron los registros obtenidos y los datos se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1. Parámetros de registros de células cromafines (CC) de ratones de genotipo WT, KO y KI a una concentración de calcio extracelular $[Ca^{2+}]_p$ 5mM. Se muestran también las diferencias significativas (DS) calculadas mediante la prueba paramétrica Wilcoxon-Mann-Whitney para muestras de tamaño diferente. DS WT-KI : diferencia significativa entre CC de genotipo WT y células cromafines de genotipo KI. DS KO-KI : diferencia significativa entre CC de genotipo KO y células cromafines de genotipo KI.

$[Ca^{2+}]_p=5mM$	WT	KO	KI	DS WT - KI	DS KO - KI
Step	1.4 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1	°°°	•••
Delay	9.4 ± 0.7	12.1 ± 0.8	11.4 ± 0.7	°	ND
I_{max}	21.7 ± 1.6	31.1 ± 3.1	21.9 ± 1.6	ND	••
t_{1/2}	78.6 ± 3.5	107.8 ± 4.9	119.1 ± 4.4	°°°	ND
RT	17.3 ± 0.8	22.6 ± 1.1	26.4 ± 1.1	°°°	•
Q	2.4 ± 0.2	3.5 ± 0.3	3.0 ± 0.2	°°°	•
n	209	183	209		
No. Células	20	16	16		
No. Ratones	6	4	2		

Con ° se denota una diferencia significativa del 95% ($p < 0.05$). Con °° se denota una diferencia significativa del 99% ($p < 0.01$). Finalmente, con °°° se denota una diferencia significativa del 99.9% ($p < 0.001$). ND denota que no existe diferencia significativa.

Analizando los datos mostrados en la Tabla 3.1 se observa que el tamaño del salto de capacitancia (Step) es significativamente diferente tanto entre genotipos WT y KI como entre genotipos KO y KI (Figura 3.1). Recordemos que el tamaño de salto no es significativamente diferente entre genotipos WT y KO a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM (Figura 2.3; Tabla 2.1). Estos datos indican que la ausencia del dominio C2B afecta el tamaño del salto de capacitancia y por lo tanto el tamaño de vesícula.

Las células cromafines de ratones de genotipo knock in producen vesículas más pequeñas que los ratones de genotipo silvestre y knock out aunque mediante ésta técnica no es posible determinar porqué sucede esto. Sin embargo estos resultados sugieren que la Sinaptotagmina VII participa en este nivel de la regulación del ciclo de las vesículas sinápticas.

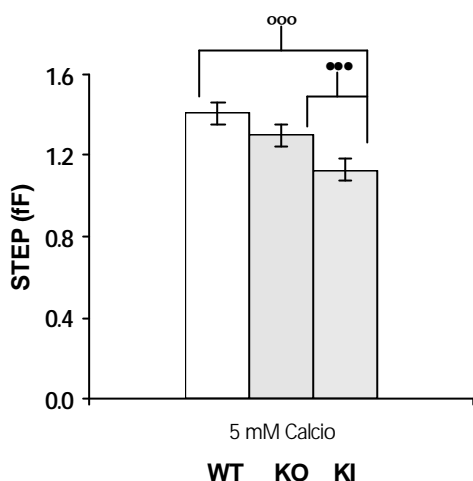


Figura 3.1. Capacitancia de membrana. Se observa que el tamaño de salto de capacitancia de membrana (STEP) es significativamente diferente entre genotipos WT y KI y entre genotipos KO y KI. La diferencia significativa se calculó mediante la prueba paramétrica de Wilcoxon-Mann-Whitney. $[Ca^{2+}]_i = 5 \text{ mM}$. °°° $p < 0.001$, °° $p < 0.001$

Continuando con el análisis de los datos obtenidos observamos también que los parámetros *Delay* y $t_{1/2}$ de las células cromafines KI no son significativamente diferentes comparados con los obtenidos para el genotipo KO pero si guardan una diferencia significativa al ser comparados con el genotipo WT (Figura 3.2).

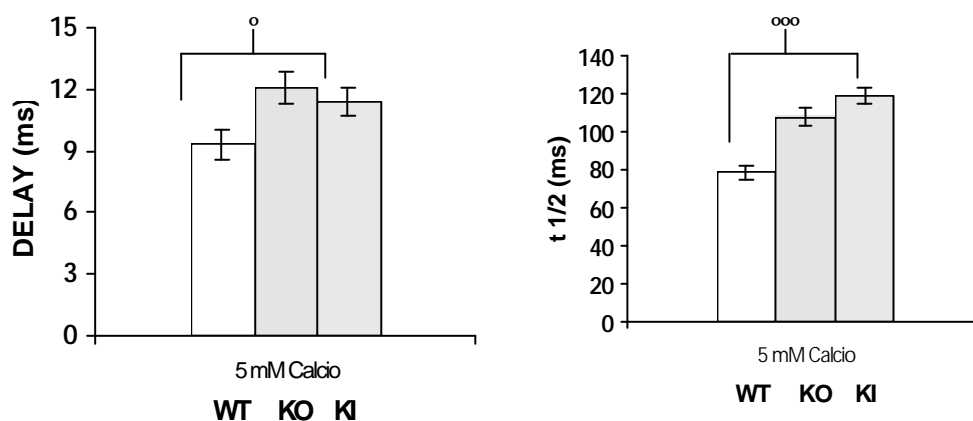


Figura 3.2. Comparación del *Delay* y el $t_{1/2}$ entre genotipos WT, KO y KI. En los histogramas puede observarse que en ambos parámetros existe una diferencia significativa entre genotipos WT y KI sin embargo no existe diferencia entre los genotipos KO y KI. ° $p < 0.05$, °°° $p < 0.001$.

Esto sugiere que cuando la proteína Syt VII está presente sólo con el dominio C2A activo sigue la misma tendencia que cuando está ausente. Como ya se ha

mostrado, cuando la proteína no está presente (genotipo KO) se observa un aumento en el tiempo necesario para la apertura del poro de fusión (*Delay*, Figura 2.4; Figura 2.5), así como un aumento en el tiempo de liberación y difusión de los neurotransmisores ($t_{1/2}$, Figura 2.4; Figura 2.5). En el capítulo anterior se sugirió que la proteína Syt VII (completa) era la responsable de acelerar la apertura y expansión del poro de fusión y también de acelerar la velocidad de liberación de neurotransmisores en células cromafines de ratón. Ahora bien, ya que tanto el *Delay* como el $t_{1/2}$ son de igual magnitud en KO y KI (Tabla 3.1) se sugiere que el dominio C2B de la proteína Syt VII es el encargado de llevar a cabo los efectos mencionados anteriormente.

Con la finalidad de observar más claramente las similitudes entre los efectos producidos por la ausencia de la proteína y por la proteína incompleta, se realizaron ajustes a las distribuciones de probabilidad de histogramas obtenidos a partir del *Delay*. En la Figura 3.3 se muestran los histogramas obtenidos de los datos del *Delay*. En la Figura 3.4 se muestran los ajustes de probabilidad hechos a cada histograma. En la Figura 3.5 puede observarse que el ajuste de probabilidad del *Delay* de células cromafines de genotipo KI a una $[Ca^{2+}]_p$ 5mM (*KI 5, línea 4*) coincide con el ajuste de probabilidad del *Delay* de células cromafines de genotipo KO a una $[Ca^{2+}]_p$ 5mM (*KO 5, línea 5*), lo cual corrobora que dicho dominio (C2B) está implicado en la apertura del poro de fusión. Por otra parte en el Capítulo 3 se muestra el efecto del calcio en el fenómeno de exocitosis donde sólo se realizaron comparaciones entre genotipo WT a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM y WT a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM y entre genotipo KO a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM y KO a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM. Al realizar los ajustes de probabilidad del *Delay* se observa que el ajuste de células cromafines WT a una $[Ca^{2+}]_p$ 5mM (*WT 5, línea 3*) coincide con el ajuste de células cromafines KO a una $[Ca^{2+}]_p$ 10mM (*KO 10, línea 2*).

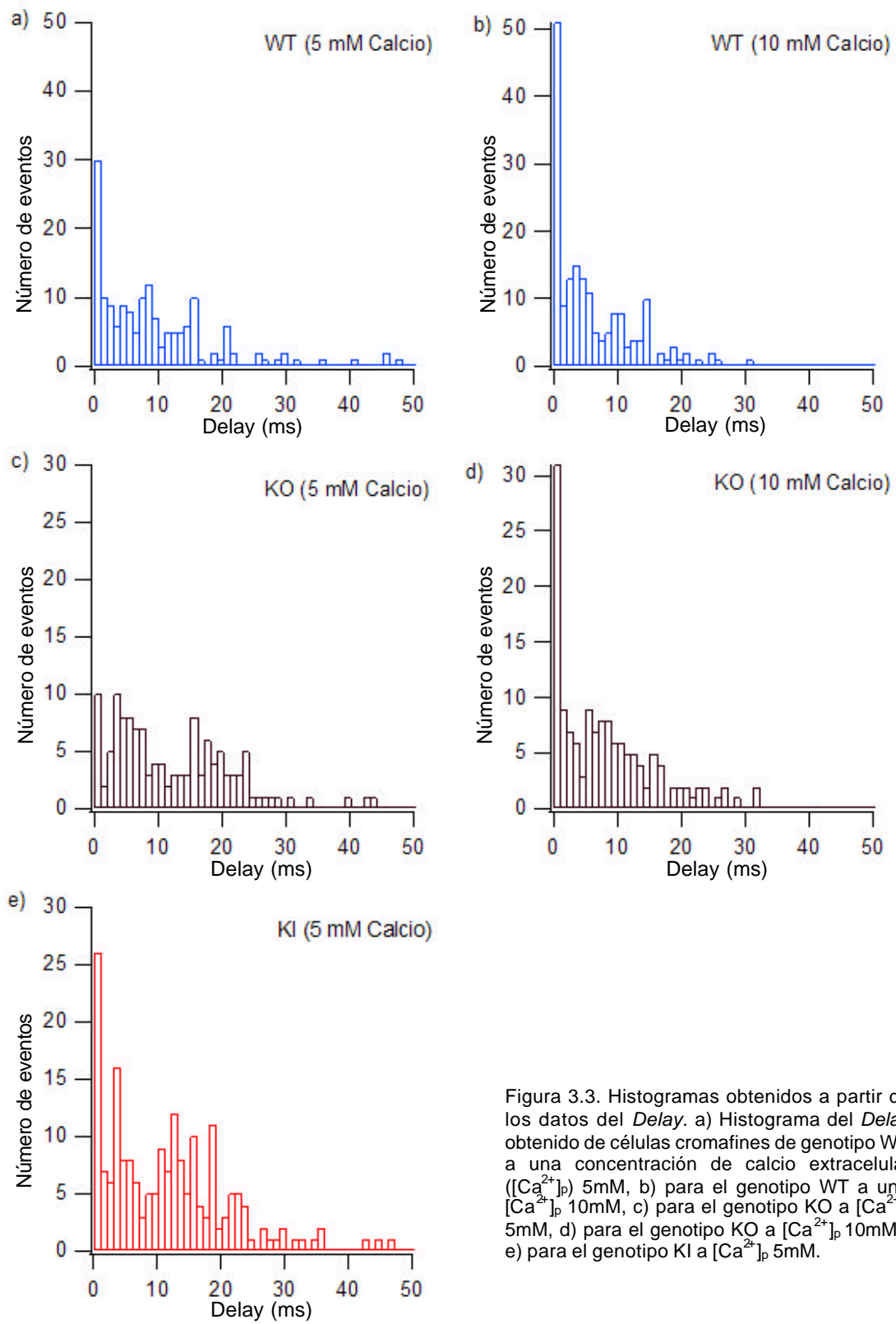


Figura 3.3. Histogramas obtenidos a partir de los datos del *Delay*. a) Histograma del *Delay* obtenido de células cromafines de genotipo WT a una concentración de calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_p$) 5mM, b) para el genotipo WT a una $[Ca^{2+}]_p$ 10mM, c) para el genotipo KO a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM, d) para el genotipo KO a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM y e) para el genotipo KI a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM.

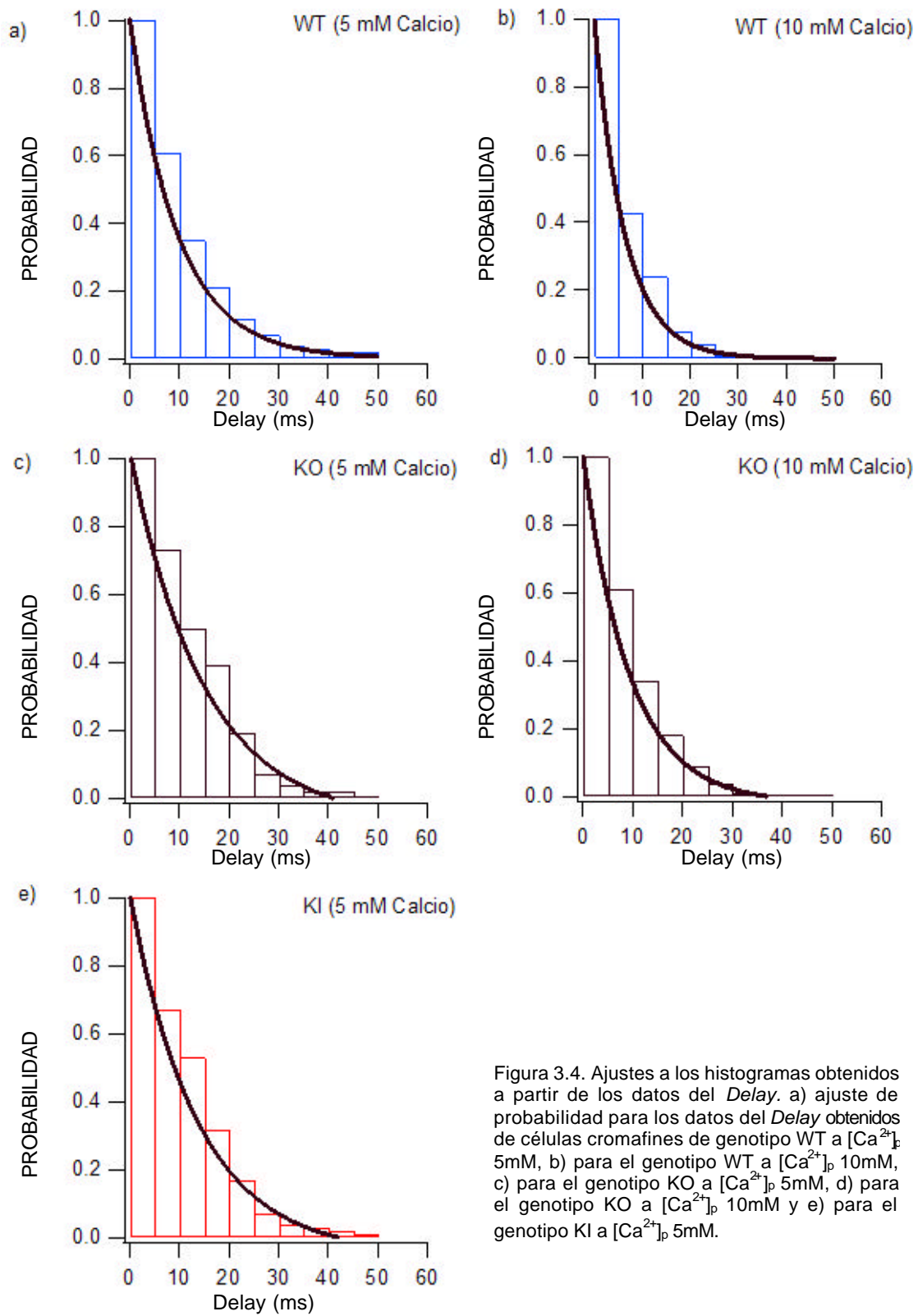


Figura 3.4. Ajustes a los histogramas obtenidos a partir de los datos del *Delay*. a) ajuste de probabilidad para los datos del *Delay* obtenidos de células cromafines de genotipo WT a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM, b) para el genotipo WT a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM, c) para el genotipo KO a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM, d) para el genotipo KO a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM y e) para el genotipo KI a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM.

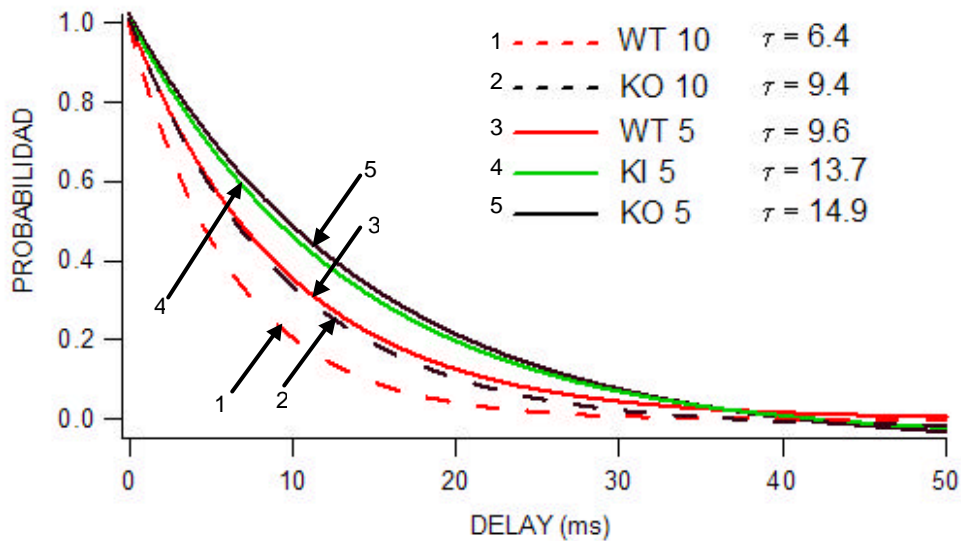


Figura 3.5. Ajustes de probabilidad. En éste gráfico puede observarse con mayor claridad la similitud que guarda el parámetro *Delay* entre genotipos knock in (KI 5) y knock out (KO 5) a una concentración de calcio extracelular, [Ca²⁺]_p de 5mM. De igual forma, se observa la similitud entre WT 5 y KO 10. En la *línea 1* se muestra el genotipo WT a [Ca²⁺]_p de 10mM. En la *línea 2* se muestra el genotipo KO a [Ca²⁺]_p de 10mM. En la *línea 3* se muestra el genotipo WT a [Ca²⁺]_p de 5mM. En la *línea 4* se muestra el genotipo KI a [Ca²⁺]_p de 5mM. Finalmente en la *línea 5* se muestra el genotipo KO a [Ca²⁺]_p de 5mM.

Las similitudes entre los genotipos KI y KO sugieren que el encargado de realizar el efecto producido por la ausencia de la proteína Syt VII es el dominio C2B ya que ambos resultados fueron obtenidos aplicando una concentración de calcio extracelular de 5mM. Sin embargo, las similitudes entre los genotipos WT a [Ca²⁺]_p 5mM y KO a [Ca²⁺]_p 10mM no pueden explicarse tan directamente ya que las concentraciones de calcio extracelular son diferentes pero dichos resultados sugieren algo muy interesante en cuanto a que el fenotipo de la Syt VII parece ser restablecido. En la introducción se menciona que las Sinaptotagminas se encuentran agrupadas en 3 grupos dependiendo de su capacidad para liberar calcio, siendo la Syt VII la que más tiempo tarda en liberarlo por lo que muestra una mayor afinidad por este ion. Recordemos que una proteína de baja afinidad llena sus sitios aceptores de iones calcio y mantiene esos iones unidos a ella por un período de 50ms. Una proteína de afinidad media los mantiene unidos durante 250ms y una proteína de alta afinidad los mantiene unidos durante 500ms (Hui, 2005). Es posible que al haber un incremento en la concentración de calcio en el

medio alguna(s) otra(s) sinaptotagmina(s) de menor afinidad por el calcio, esté(n) rescatando el fenotipo producido por la Syt VII.

3.2 La ausencia del dominio C2B incrementa la frecuencia de eventos de fusión transitoria.

Con la finalidad de indagar más sobre el efecto producido por la proteína Syt VII sin el dominio C2B en el proceso de exocitosis mediado por calcio, se contabilizaron los eventos de fusiones completas y fusiones transitorias para determinar si la ausencia del dominio C2B afecta el tipo de mecanismo de exocitosis empleado por la célula. Es necesario mencionar que no se realizaron experimentos con células cromafines de genotipo knock in a $[Ca^{2+}]_p$ 10mM ya que se había observado que la concentración de calcio no afecta la tendencia del efecto producido por la ausencia de la proteína (Apartado 2.2 *El efecto de la Sinaptotagmina VII no depende de la concentración de calcio extracelular*). En la Tabla 3.2 se muestran los resultados del conteo de fusiones transitorias y completas en los 3 genotipos estudiados a $[Ca^{2+}]_p$ 5mM.

Tabla 3.2. Porcentaje de tipos de eventos para cada genotipo a ambas concentraciones de calcio extracelular.

$[Ca^{2+}]_p$	GENOTIPOS						
	5mM	WT (%)	WT (n)	KO (%)	KO (n)	C2B KI (%)	C2B KI (n)
Fusiones completas		76	210	82	182	54	211
Fusiones transitorias		24	66	18	40	46	179
n_{total}			276		222		390

En la Tabla 3.2 se observa que al estar ausente el dominio C2B, se incrementan los eventos de fusión transitoria (casi un 50% de los eventos totales). Esto concuerda con el hecho de que el dominio C2B es el responsable de la apertura y expansión del poro de fusión (Apartado 3.1). Sin embargo la explicación del porqué en ausencia de este dominio se producen más eventos de fusión transitoria que cuando está ausente toda la proteína no es tan sencilla. Para explicar esto, se propone la siguiente hipótesis (ver Figura 3.4): Es posible que ya que la proteína está incompleta, es decir sólo le falta el dominio C2B pero el resto

de la proteína es funcional, el dominio C2A (con sitios aceptores de iones calcio) esté realizando la función de sensor de calcio. Ya que se observó que el dominio C2B es responsable de la apertura y expansión del poro de fusión (Figura 3.2; Figura 3.3) al estar ausente, el dominio C2A trata de suplir su función pero ya que no es el encargado de este proceso (Wang CT, 2005) cuando él regula el poro de fusión, no se logra una expansión total lo que produciría el aumento de las fusiones transitorias. Así pues, ambos dominios juegan un papel en la regulación del poro de fusión. De esta forma podríamos explicar porque en presencia de ambos dominios (genotipo WT) se observan más eventos de fusiones completas. En las células de genotipo WT el dominio C2B se encarga de expandir el poro de fusión y al estar presente, el dominio C2A no se involucra en la regulación. Pero en células donde sólo está presente el dominio C2A el poro de fusión está sufriendo una restricción al momento de expandirse. Por lo tanto, el dominio C2B estaría encargado de llevar a cabo la expansión del poro de fusión y el dominio C2A se encargaría de la restricción de la expansión del poro de fusión. Lo cual significa que el dominio C2B es responsable de las fusiones completas y el dominio C2A es responsable de las fusiones transitorias. En la Figura 3.4 se muestra representado el modelo de la hipótesis que planteamos para la explicación del funcionamiento de los dominios C2A y C2B en el proceso de exocitosis mediado por calcio.

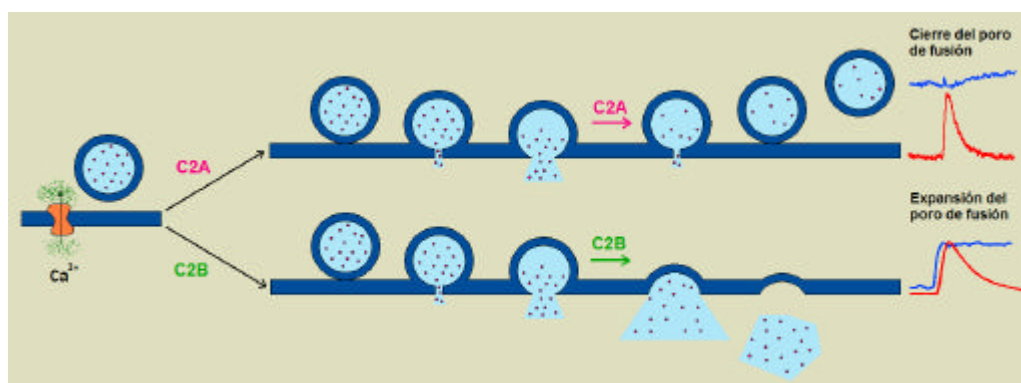


Figura 3.4. Hipótesis de la regulación del poro de fusión en células cromafines por la proteína Syt VII. La Syt VII regula la formación, apertura y expansión del poro de fusión a través de sus dominios C2A y C2B. Con los experimentos realizados en células cromafines de ratón se mostró que el papel del dominio C2B es lograr la expansión del poro de fusión. Por otra parte, se sugiere que el papel del dominio C2A en el fenómeno de exocitosis es restringir el tamaño del poro de fusión, lo cual produce un aumento en la cantidad de fusiones transitorias en células de genotipo KI.

Todos los resultados obtenidos (Capítulo 2 y Capítulo 3) sugieren que la proteína Sinaptotagmina VII juega un papel importante en el proceso de exocitosis mediado por calcio regulando la apertura y expansión del poro de fusión a través de sus dominios C2A y C2B.

DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el tamaño de salto de capacitancia a una concentración extracelular de calcio de 5mM no es significativamente diferente entre los genotipos WT y KO lo que nos lleva a proponer que las vesículas generadas no varían de tamaño en ausencia de la proteína. Sin embargo, se observa que al estar ausente la proteína aumentó la duración del *Delay* lo que nos indica que a las células de genotipo KO les toma más tiempo lograr la apertura del poro de fusión, pues la vesícula tarda más en iniciar la liberación de su contenido una vez que se ha fusionado con la membrana celular y formado el poro de fusión. Además, el $t_{1/2}$ también es mayor en CC KO lo que significa que en éstas células la liberación de neurotransmisores es más lenta comparado con el control. Se observó también que tanto el punto máximo del flujo de liberación de neurotransmisores (I_{max}) como la carga de neurotransmisor (Q) son mayores en las células cromafines de genotipo KO comparadas con el control. Aunque mediante esta técnica no es posible elucidar porqué las vesículas de genotipo KO almacenan una mayor cantidad de carga, estos resultados nos sugieren que la proteína Sinaptotagmina VII participa en la etapa de carga de neurotransmisores del ciclo de las vesículas sinápticas. Con estos datos es posible sugerir que la proteína Sinaptotagmina VII ayuda a la apertura y expansión del poro de fusión, ya que cuando está ausente se observa un incremento en el tiempo desde la formación del poro de fusión hasta su apertura lo que da lugar al inicio de la liberación de los neurotransmisores. Además el flujo de liberación de neurotransmisores también se ve afectado cuando la proteína está ausente.

Por otra parte, en presencia de la proteína se observaron más eventos de fusión transitoria sugiriendo que probablemente la proteína participa de alguna forma en la regulación (vía restricción) del tamaño del poro de fusión, lo cual correlaciona con lo observado por Jaiswal y colaboradores (2004). De acuerdo a esto se sugiere que la proteína Syt VII está involucrada en el proceso de exocitosis mediada por calcio donde juega un papel importante en la regulación del poro de fusión y por lo tanto en la liberación de neurotransmisores.

Los resultados obtenidos a una concentración de calcio extracelular ($[Ca^{2+}]_p$) de 10mM confirmaron que el efecto observado en los experimentos a una $[Ca^{2+}]_p$ de 5mM es debido únicamente a la ausencia de la proteína ya que se observó que aún a una concentración de calcio extracelular mayor, la Sinaptotagmina acelera la apertura y expansión del poro de fusión y también la cinética de liberación de neurotransmisores.

También se observó que al aumentar la concentración de calcio en la pipeta, los parámetros *Delay* y $t_{1/2}$ presentan una disminución significativa. Lo que sugiere que el calcio está implicado en la regulación del poro de fusión así como en la regulación de la velocidad de liberación de neurotransmisores. Se observó además, que el calcio sí modifica el tamaño de las vesículas, aunque mediante esta técnica no es posible elucidar mediante que mecanismo está siendo regulado este fenómeno. Finalmente, se observó también que al haber un aumento en la concentración de calcio extracelular, aumenta la cantidad de fusiones transitorias lo cual correlaciona con los resultados obtenidos por Alés y colaboradores (1999).

En los experimentos llevados a cabo con las células cromafines de genotipo KI se observó que la ausencia del dominio C2B afecta el tamaño de vesícula ya que se observó que las células cromafines de ratones de genotipo knock in producen vesículas más pequeñas que los ratones de genotipo silvestre y knock out aunque mediante ésta técnica no es posible determinar porqué sucede esto. Sin embargo estos resultados sugieren que la Sinaptotagmina VII participa en este nivel de la regulación del ciclo de las vesículas sinápticas.

Los resultados del *Delay* y del $t_{1/2}$ muestran que el efecto producido por el genotipo KI es el mismo que el observado para el genotipo KO. Lo cual significa que el responsable de acelerar la apertura y expansión del poro de fusión así como de acelerar la liberación de neurotransmisores es el dominio C2B. Al contrastar los ajustes de probabilidad obtenidos a partir de los histogramas realizados con los datos del *Delay* de los 3 genotipos y a ambas concentraciones

de calcio se observó que el efecto en el genotipo WT a una $[Ca^{2+}]_p$ de 5mM es similar al observado en el genotipo KO a una $[Ca^{2+}]_p$ de 10mM. Lo que sugiere que al haber un incremento en la concentración de calcio en el medio alguna(s) otra(s) sinaptotagmina(s) de menor afinidad por el calcio, está(n) rescatando el fenotipo producido por la Syt VII.

Por otra parte, en ausencia del dominio C2B se observó que la cantidad de fusiones transitorias aumenta a casi un 50%, lo que sugiere que este dominio regula al poro de fusión promoviendo su expansión. Estos resultados nos permiten sugerir que la Sinaptotagmina VII regula la expansión del poro de fusión a través de sus dominios C2A y C2B ya que en células donde sólo está presente el dominio C2A el poro de fusión está sufriendo una restricción al momento de expandirse. Por lo tanto, el dominio C2B estaría encargado de llevar a cabo la expansión del poro de fusión y el dominio C2A se encargaría de la restricción de la expansión. Lo cual significa que el dominio C2B es responsable de las fusiones completas y el dominio C2A es responsable de las fusiones transitorias.

CONCLUSIONES

Conclusiones.

El papel de la proteína Sinaptotagmina VII en el fenómeno de exocitosis regulado por calcio es acelerar la apertura y expansión del poro de fusión, así como la liberación de neurotransmisores en células cromafines de ratón.

El efecto de la Sinaptotagmina VII es independiente de la concentración de calcio extracelular ya que al aumentar la concentración a 10mM en los experimentos se observó que la Sinaptotagmina VII produce el mismo efecto acelerando la apertura y expansión del poro de fusión y la velocidad de liberación de neurotransmisores que a una concentración de 5mM de calcio.

El calcio regula al poro de fusión y el flujo de liberación de neurotransmisores ya que se observaron diferencias significativas tanto en células de genotipo WT como en células de genotipo KO al variar la concentración de calcio extracelular.

El dominio C2B de la proteína Sinaptotagmina VII participa en la regulación del poro de fusión y en el control de la liberación de neurotransmisores ya que cuando este dominio no está presente, tanto la proteína mutada como la ausencia de la proteína aceleran la apertura y expansión del poro de fusión y la cinética de liberación de neurotransmisores.

Es posible que alguna(s) Sinaptotagmina(s) de menor afinidad por el calcio que la Sinaptotagmina VII esté rescatando el fenotipo producido por ésta última cuando se aumenta la concentración de calcio extracelular a 10mM ya que cuando la proteína no está presente se observa que acelera la apertura y expansión del poro

de fusión al igual que en el genotipo silvestre a una concentración de calcio extracelular de 5mM.

Finalmente, de acuerdo con todos los resultados obtenidos se plantea la hipótesis de que la expansión o cierre del poro de fusión está regulada por los dominios C2A y C2B de la proteína Sinaptotagmina VII debido a que en ausencia del dominio C2B se incrementa la frecuencia de eventos de fusión transitoria. Esto sugiere que el dominio C2A participa en el proceso de exocitosis restringiendo la expansión del poro de fusión y el dominio C2B participa promoviendo la expansión del poro de fusión.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

Alberts B, Bray D, Hopkin K, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Essential Cell Biology*. 2004. Second Edition. Garland Publishing: Taylor-Francis Group.

Albillos A, Dernick G, Horstmann H, Almers W, Alvarez de Toledo G, Lindau M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature* 1997, **389**:509-512.

Albrecht TH, Akamine S, Carver TE, Quate CF. Microfabrication of cantilever styli for the atomic force microscope. *J. Vac. Sci. Technol.* 1990, **A8**:3386-3396.

Alés E, Tabares L, Poyato JM, Valero V, Lindau M, Alvarez de Toledo G. High calcium concentrations shift the mode of exocytosis to the kiss and run mechanism. *Nature Cell Biol.* 1999, **1**:40-44.

Almers W, Neher E. Gradual and stepwise changes in the membrane capacitance of rat peritoneal mast cells. *J. Physiol.* 1987, **386**:205-217.

Alvarez de Toledo G, Fernández Chacon R, Fernández JM. Release of secretory products during transient vesicle fusion. *Nature* 1993, **373**:555-557.

Alvarez de Toledo G, Fernández JM. The events leading to secretory granule fusion. *Cell Physiology of Blood*, Gunn RB, Parker JC. Eds. 1988, 334-344.

Amatore C, Arbault S, Bonifas I, Bouret Y, Erard M, Ewing AG, Sombers LA. Correlation between vesicle quantal size and fusion pore release in chromaffin cell exocytosis. *Biophys. J.* 2005, **88**:4411-4420.

Aunis D, Hesketh JE, Devilliers G. Freeze-fracture study of the chromaffin cell during exocytosis: Evidence for connections between the plasma membrane and secretory granules and for movements of plasma membrane-associated particles. *Cell Tissue Res.* 1979, **197**:433-441.

Barclay JW, Morgan A, Burgoyne RD. Calcium-dependent regulation of exocytosis. *Cell Calcium* 2005, **38**:343-353.

Binnig G, Quate CF, Gerber C. Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* 1986, **56**:930-933.

Brumback AC, Lieber JL, Angleson JK, Betz WJ. Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods* 2004, **33**:287-294.

Brunger AT. Structural insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent exocytosis. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000, **10**(3):293-302.

Burgess TL, Kelly RB. Constitutive and regulated secretion of proteins. *Ann. Rev. Cell Biol.* 1987, **3**:243-293.

Butz S, Fernandez-Chacon R, Schmitz F, Jahn R, Sudhof TC. The subcellular localizations of atypical synaptotagmins III and VI. Synaptotagmin III is enriched in synapses and synaptic plasma membranes but not in synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 1999, **274**(26):18290-18296.

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

Chandler DE, Heuser JE. Arrest of membrane fusion events in mast cells by quick-freezing. *J. Cell Biol.* 1980, **86**:666-674.

Chapman ER. Synaptotagmin: a Ca(2+) sensor that triggers exocytosis?. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002, **3**(7):498-508.

Dernick G, Alvarez de Toledo G, Lindau M. Exocytosis of single chromaffin granules in cell-free inside-out membrane patches. *Nat. Cell Biol.* 2003, *Advance Online Publication* 1-5.

Dernick G, Gong LW, Tabares L, Alvarez de Toledo G, Lindau M. Patch amperometry: high-resolution measurements of single-vesicle fusion and release. *Nature Methods* 2005, **2**:699-708.

Desai RC, Vyas B, Earles CA, Littleton JT, Kowalchuck JA, Martin TFJ, Chapman ER. The C2B domain of Synaptotagmin I is a Ca²⁺ sensing module essential for exocytosis. *J. Cell Biol.* 2000, **150**(5):1125-1135.

Douglas WW. Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells. *Brit. J. Pharmacol.* 1968, **34**:451-474.

Duncan RR, Greaves J, Wiegand UK, Matskevich I, Bodammer G, Apps DK, Shipston MJ, Chow RH. Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature* 2003, **422**(6928):176-180.

Evanko D. Primer: spying on exocytosis with amperometry. *Nat. Methods* 2005, **2**(9):650.

Fatt P, Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. *J. Physiol.* 1952, **117**(1):109-128.

Fernández Chacon R, Alvarez de Toledo G. Cytosolic calcium facilitates release of secretory products after exocytotic vesicle fusion. *FEBS Lett.* 1995, **363**:221-225.

Fernández JM, Neher E, Gomperts BD. Capacitance measurements reveal stepwise fusion events in degranulating mast cells. *Nature* 1984, **312**:453-455.

Fernandez-Chacon R, Konigstorfer A, Gerber SH, Garcia J, Matos MF, Stevens CF, Brose N, Rizo J, Rosenmund C, Südhof TC. Synaptotagmin I functions as a calcium regulator of release probability. *Nature* 2001, **410**(6824):41-49.

Fukuda M, Kanno E, Satoh M, Saegusa C, Yamamoto A. Synaptotagmin VII is targeted to dense-core vesicles and regulates their Ca²⁺-dependent exocytosis in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 2004, **279**(50):52677-52684.

Geppert M, Goda Y, Hammer RE, Li C, Rosahl TW, Stevens CF, Südhof TC. Synaptotagmin I: a major Ca²⁺ sensor for transmitter release at a central synapse. *Cell* 1994, **79**(4):717-727.

Gong LW, Hafez I, Alvarez de Toledo G, Lindau M. Secretory vesicles membrane area is regulated in tandem with quantal size in chromaffin cells. *J. Neurosci.* 2003, **23**:7917-7921.

Gonon F, Buda M, Cespuoglio R, Jouvét M, Pujol JF. In vivo electrochemical detection of catechols in the neostriatum of anaesthetized rats: dopamine or DOPAC?. *Nature* 1980, **286**:902-904.

Gray EG. Electron microscopy of synaptic contacts on dendrite spines of the cerebral cortex. *Nature* 1959, **183**(4675):1592-1593.

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

Heuser JE, Reese TS. Evidence for recycling of synaptic vesicle membrane during transmitter release at the frog neuromuscular junction. *J. Cell Biol.* 1973, **57**:315-344.

Hui E, Bai J, Wang P, Sugimori M, Llinas RR, Chapman ER. Three distinct kinetic groupings of the synaptotagmin family: candidate sensors for rapid and delayed exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, **102**:5210-5214.

Jackson MB, Chapman ER. Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2006, **35**:135-160.

Jahn R, Lang T, Südhof TC. Membrane fusion. *Cell* 2003, **112**:519-533.

Jaiswal JK, Chakrabarti S, Andrews NW, Simon SM. Synaptotagmin VII restricts fusion pore expansion during lysosomal exocytosis. *PLoS Biol.* 2004, **2**(8):E233.

Jena BP. Fusion pore or porosome: structure and dynamics. *Journal of Endocrinology* 2003, **176**:169-174.

- Johns LM, Levitan ES, Sheldon EA, Holz RW, Axelrod D. Restriction of secretory granule motion near the plasma membrane of chromaffin cells. *J. Cell Biol.* 2001, **153**(1):177-190.
- Kilic G. Exocytosis in bovine chromaffin cells: studies with patch-clamp capacitance and FM1-43 fluorescence. *Biophys. J.* 2002, **83**(2):849-857.
- Kissinger PT, Hart JB, Adams RN. Voltammetry in brain tissue: a new neurophysiological measurement. *Brain Res.* 1973, **55**(1):209-213.
- Leszczyszyn DJ, Jankowski JA, Viveros OH, Diliberto EJ, Near JA, Wightman RM. Nicotinic receptor-mediated catecholamine secretion from individual chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 1990, **265**(25):14736-14737.
- Li C, Ullrich B, Zhang JZ, Anderson RGW, Brose N, Südhof TC. Ca²⁺ dependent and Ca²⁺ independent activities of neural and nonneural synaptotagmins. *Nature* 1995, **375**:594-599.
- Lin RC, Scheller RH. Structural organization of the synaptic exocytosis core complex. *Neuron* 1997, **19**(5):1087-1094.
- Lindau M, Fernandez JM. IgE-mediated degranulation of mast cells does not require opening of ion channels. *Nature* 1986, **319**:150-153.
- Lindau M, Almers W. Structure and function of fusion pores in exocytosis and ectoplasmic membrane fusion. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995, **7**:509-517.
- Littleton JT, Adolfsen B. Genetic and molecular analysis of the synaptotagmin family. *Cell Mol. Life Sci.* 2001, **58**:393-402.
- Lupas A, Van Dyke M, Stock J. Predicting coiled-coils from protein sequences. *Science* 1991, **252**:1162-1164.
- Martinez I, Chakrabarti S, Hellevik T, Morehead J, Fowler K, Andrews NW. Synaptotagmin VII regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes in fibroblasts. *J. Cell Biol.* 2000, **148**(6):1141-1149.
- McCreery RL, Dreiling R, Adams RN. Voltammetry in brain tissue: quantitative studies of drug interactions. *Brain Res.* 1974, **73**(1):23-33.
- Meldolesi J, Chieriegatti E. Fusion has found its calcium sensor. *Nat. Cell Biol.* 2004, **6**(6):476-478.
- Monck JR, Fernández JM. The exocytotic fusion pore. *J. Cell Biol.* 1992, **119**:1395-1404.

- Monck JR, Robinson IM, Escobar AL, Vergara JL, Fernandez JM. Pulsed laser imaging of rapid Ca²⁺ gradients in excitable cells. *Biophys. J.* 1994, **67**:505-514.
- Nalefski EA, McDonagh T, Somers W, Seehra J, Falke JJ, Clark JD. Independent folding and ligand specificity of the C2 calcium-dependent lipid binding domain of cytosolic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**(3):1365-1372.
- Nussey SS, Whitehead SA. Endocrinology: an integrated approach. 2001. Bios. Scientific Publisher Ltd. Oxford.
- O'Connor V, Augustine GJ, Betz H. Synaptic vesicle exocytosis molecules and models. *Cell* 1994, **76**:785-787.
- Popov AA. Ultrastructural changes in the size of mast cell granules and in the granular matrix during an experimental anaphylactic shock. *Anat. Anz.* 1988, **166**(1-5):267-273.
- Purves D, Fitzpatrick D, Williams SM, McNamara JO, Augustine GJ, Katz LC, LaMantia AS. Neuroscience. 2001. 2nd Edition. Sinauer Associates Inc.
- Rizo J, Südhof TC. C2-domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J. Biol. Chem.* 1998, **273**(26):15879-15882.
- Rhee JS, Li LY, Shin OH, Rah JC, Rizo J, Südhof TC, Rosenmund C. Augmenting neurotransmitter release by enhancing the apparent Ca²⁺ affinity of synaptotagmin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005, **102**(51):18664-18669.
- Scheller R, Lin R. Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000, **16**:19-49.
- Schiavo G, Stenbeck G, Rothman JE, Sollner TH. Binding of the synaptic vesicle v-SNARE, synaptotagmin, to the plasma membrane t-SNARE, SNAP-25, can explain docked vesicles at neurotoxin-treated synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997, **94**(3):997-1001.
- Schmoranzler J, Goulian M, Axelrod D, Simon SM. Imaging constitutive exocytosis with total internal reflection fluorescence microscopy. *J. Cell Biol.* 2000, **149**(1):23-31.
- Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and medical aspects. 1999. 6th Edition. Lippincott Williams and Wilkins-American Society for Neurochemistry.
- Spruce AE, Breckenridge LJ, Lee AK, Almers W. Properties of the fusion pore that forms during exocytosis of a mast cell secretory vesicle. *Neuron* 1990, **4**:643-654.

- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions. *Nature* 1995, **375**(6533):645-653.
- Südhof TC. Synaptotagmins: why so many?. *J. Biol. Chem.* 2002, **277**:7629-7632.
- Südhof TC. The synaptic vesicle cycle. *Annu. Rev. Neurosci.* 2004, **27**:509-547.
- Südhof TC, Rizo J. Synaptotagmins: C2-domain proteins that regulate membrane traffic. *Neuron* 1996, **17**(3):379-388.
- Sugita S, Shin OH, Han W, Lao Y, Südhof TC. Synaptotagmins form a hierarchy of exocytotic Ca²⁺ sensors with distinct Ca²⁺ affinities. *EMBO J.* 2002, **21**(3):270-280.
- Sugita S, Han W, Butz S, Liu X, Fernandez-Chacon R, Lao Y, Südhof TC. Synaptotagmin VII as a plasma membrane Ca(2+) sensor in exocytosis. *Neuron* 2001, **30**(2):459-473.
- Tabares L, Alés E, Lindau M, Alvarez de Toledo G. Exocytosis of catecholamine (CA)-containing and CA-free granules in chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* 2001, **276**:39974-39979.
- Wang CT, Lu JC, Bai J, Chang PY, Martin TFJ, Chapman ER, Jackson MB. Different domains of synaptotagmin control the choice between kiss-and-run and full fusion. *Nature* 2003, **424**:943-947.
- Wang CT, Bai J, Chang PY, Chapman ER, Jackson MB. Synaptotagmin-Ca²⁺ triggers two sequential steps in regulated exocytosis in rat PC12 cells: fusion pore opening and fusion pore dilation. *J. Physiol.* 2006, **570**(Pt 2):295-307.
- Wightman RM, Haynes CL. Synaptic vesicles really do kiss and run. *Nature Neurosci.* 2004, **7**(4):321-322.
- Yoshihara M, Adolfsen B, Littleton JT. Is synaptotagmin the calcium sensor?. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003, **13**:315-323.
- Yoshihara M, Montana ES. The synaptotagmins: calcium sensors for vesicular trafficking. *Neuroscientist* 2004, **10**(6):566-574.
- Zenisek D, Steyer JA, Almers W. Transport, capture and exocytosis of single synaptic vesicles at active zones. *Nature* 2000, **406**:849-854.

MATERIALES Y MÉTODOS

**Preparación de microelectrodos
y micropipetas de amperometría en parche.**

A1. Preparación de microelectrodos de amperometría en parche.

El microelectrodo de amperometría en parche se compone de dos microelectrodos ensamblados: uno de amperometría y otro de “patch clamp”, los cuales permiten la medición simultánea de la capacitancia de membrana indicando la fusión de una vesícula a la membrana plasmática y la corriente amperométrica producida por la oxidación de catecolaminas. Debido a que el electrodo de amperometría se encuentra dentro de la pipeta y a una distancia de 50 a 100 μm (Dernick G *et al.*, 2005) de la punta de la misma, en ocasiones puede ensuciarse con lípidos y otros componentes de la membrana celular, lo cual impide una buena detección. Es por ello que éste electrodo debe prepararse con mayor frecuencia. A continuación se muestra paso a paso la preparación de los microelectrodos de amperometría.

A1.1 Preparación de microelectrodos de amperometría.

El procedimiento de fabricación de microelectrodos de amperometría inicia con el llenado de una jeringa de 1 mL con acetona que se coloca en un soporte bajo microscopio estereoscópico. Posteriormente se coloca un tubo de polietileno (SIMS Portex Ltd.) de 0.4 mm de diámetro y aproximadamente 7 cm de longitud dentro de la jeringa con acetona el cual es llenado por capilaridad. La función de la acetona es reducir la atracción electrostática entre la fibra de carbono y las paredes del tubo de polietileno y permitir un canulado sencillo. Se toma una fibra de carbono de 5 μm de diámetro (Thornel T650/42 de Amoco Co.) y se introduce en el tubo de polietileno por lo menos hasta unas $\frac{3}{4}$ partes de la longitud del tubo

con ayuda de pinzas “enguantadas”. Una vez que se ha introducido la fibra, se elimina la acetona colocando el tubo de polietileno sobre la superficie de un papel absorbente.

Para aislar la fibra, se utiliza un dispositivo que consiste en un filamento de tungsteno conectado a una fuente de voltaje constante colocado bajo microscopio estereoscópico. Para fundir el tubo de polietileno que contiene la fibra de carbono, éste se coloca a través del filamento el cual es calentado mediante la aplicación de corriente. El dispositivo permite variar la corriente aplicada con la finalidad de calentar el filamento a la temperatura óptima para fundir el polietileno sin llegar a romperlo (Figura A1). Para un tubo de 0.4 mm de diámetro la temperatura óptima la obtuvimos aplicando al filamento una corriente de aproximadamente 1.8 ampers.

Cuando el polietileno comienza a fundirse, se estira de forma manual para estrechar el tubo y permitir su adhesión a la fibra de carbono. Llevado a cabo este paso, se realiza un corte al tubo de polietileno con ayuda de un bisturí con la finalidad de separar las zonas aisladas. Posteriormente la punta es calentada nuevamente con el filamento para retraer el polietileno y exponer la fibra de carbono. Una vez expuesta la fibra de carbono, se realiza un corte en la punta de la fibra ya que al calentarse pierde sensibilidad como detector (Figura A1).

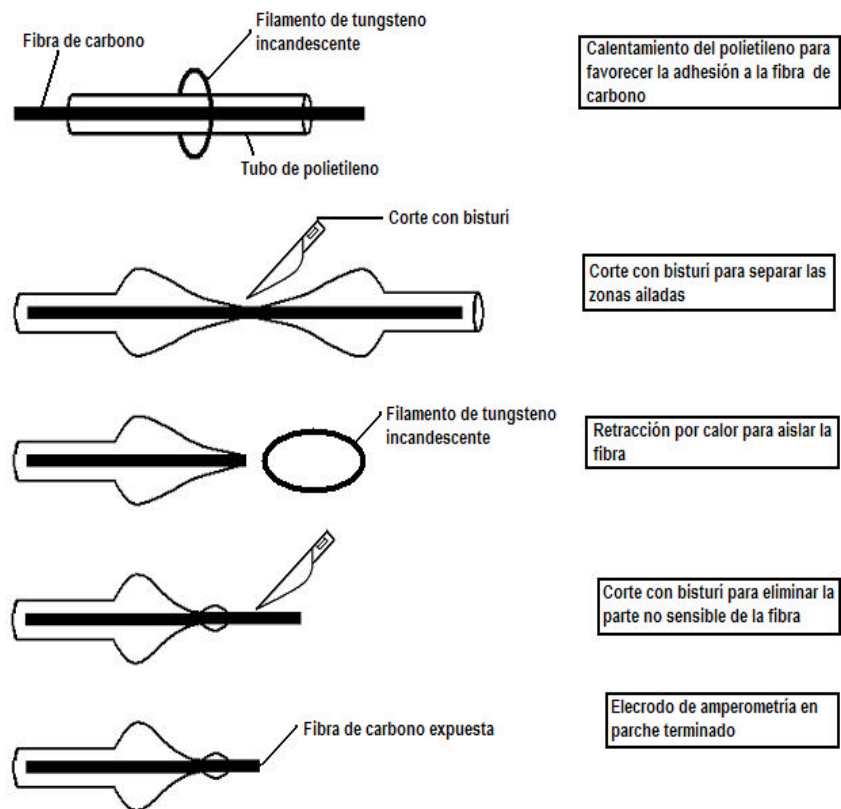


Figura A1. Esquema ilustrativo del procedimiento de fabricación de microelectrodos de amperometría en parche.

Para realizar los experimentos de amperometría en parche, el electrodo es llenado con una solución de cloruro de potasio a una concentración 3 M y es insertada en el "holder" del equipo. Posteriormente se introduce la pipeta de "patch clamp" (Figura A2) con solución interna (ver Anexo C).

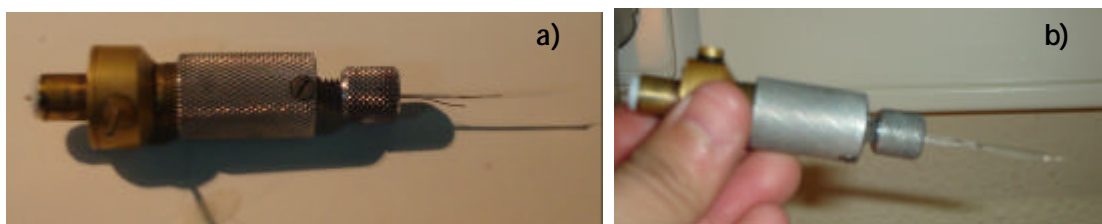


Figura A2. Fibra de carbono montada en el "holder" (a) e introducida en la pipeta "patch clamp" con solución interna (b).

A1.2. Preparación de micropipetas de “patch clamp”.

Para la preparación de micropipetas de “patch clamp”, se utilizan capilares de vidrio de 85 mm de longitud, 2 mm de diámetro externo y 1.4 mm de diámetro interno (Hilgenberg GmbH). Dichos capilares son estirados en un estirador horizontal programable (Modelo P-97 de Sutter Instrument Co.). Una vez que se ha conseguido la forma deseada de la pipeta (Figura A3), la punta es recubierta con un elastómero (Sylgard 184, de WPI Inc.) que solidifica rápidamente con aire caliente. El elastómero no debe tocar la punta de la pipeta, por lo que se coloca a una distancia de aproximadamente 2 mm lejos de la punta. La función de este recubrimiento es disminuir la capacitancia eléctrica de la pipeta. Finalmente las pipetas son pulidas con calor, el cual se obtiene con ayuda de un filamento de platino-iridio de 0.102 mm de diámetro (PT0402 de WPI Inc.) y la aplicación de una corriente de aproximadamente 1.5 A. La finalidad del pulido de las pipetas es facilitar la obtención de sellos y permitir que el electrodo de fibra de carbono se aproxime al punto máximo de la punta de la pipeta para lograr un mayor acercamiento a la membrana celular de modo que la corriente generada por el neurotransmisor se registre justo en el momento en que es producida. La punta de la pipeta se aproxima al filamento caliente (sin tocarlo) hasta observar la forma óptima de la punta la cual debe tener un tamaño de 2-3 μ m de diámetro.

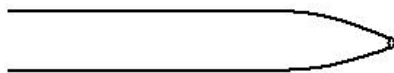


Figura A3. Forma óptima de las pipetas utilizadas en amperometría en parche.

Anexo B.

Cultivo de células cromafines de ratón.

B1. Preparación de cubreobjetos para la siembra celular.

La preparación de los soportes para la siembra celular consiste en recubrir cubreobjetos con poli-L-lisina, un polímero de alto peso molecular que permite la adhesión de células animales. Para esto, se cortan cubreobjetos de vidrio (Menzel Glaser No. 1) con ayuda de una punta de diamante en rectángulos de aproximadamente 5mm por 3mm. Posteriormente se colocan en etanol al 90% durante 10 minutos para eliminar impurezas. Se flamean en mechero Bunsen dentro de la campana de flujo laminar y se colocan en cajas de Petri de 35mm de diámetro disponiendo 5 cubreobjetos por caja. Una vez colocados en cajas petri, se adiciona una gota de poli-L-lisina a una concentración de 0.1 mg/mL en cada cubreobjetos y se dejan a temperatura ambiente durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavan con agua desionizada estéril y se dejan secar en campana de flujo laminar.

B2. Extracción y purificación de células cromafines.

Obtención de glándulas suprarrenales.

Para la obtención de las glándulas suprarrenales, se utiliza un ratón por preparación. El ratón es anestesiado con cloroformo en campana de cristal, sacrificado con guillotina y desangrado. La finalidad del desangrado es evitar la contaminación del cultivo con glóbulos rojos y leucocitos. El ratón se sujeta en corcho por sus extremidades y se abre por la cavidad peritoneal dejando al descubierto los órganos internos. Estas glándulas son de fácil localización debido

a que se encuentran sobre los riñones y recubiertas de tejido adiposo. Para obtenerlas, se utilizan pinzas y tijeras. Una vez extraídas se colocan en una caja de Petri de 35mm de diámetro con solución Locke mantenida a 4°C.

Una vez obtenidas las glándulas se procede a eliminar el tejido adiposo y la corteza con ayuda de pinzas y bisturí sobre una caja de Petri con hielo con la finalidad de mantener una baja temperatura. Este procedimiento se lleva a cabo bajo microscopio estereoscópico. La corteza se retira con la finalidad de obtener la médula suprarrenal, ya que en ella se encuentran las células cromafines. Una vez obtenidas las médulas suprarrenales éstas son colocadas en solución Locke (ver Anexo C1) .

Extracción de células cromafines.

Una vez obtenidas las médulas suprarrenales se utiliza uno de los dos protocolos descritos a continuación para la extracción de células cromafines. Ambos métodos son funcionales sin embargo el uso de cada uno de ellos depende de la edad del ratón al cual se le extrajeron las glándulas suprarrenales. En nuestro caso particular el método de digestión enzimática con colagenasa resultó eficiente cuando se trataba de ratones de aproximadamente 3 meses de edad. Para el caso de ratones de 8 meses o más edad resultó mas eficiente el método de digestión con colagenasa y papaína.

Digestión enzimática con colagenasa.

Las médulas se colocan en 1 mL de solución de dispersión con colagenasa (ver Anexo C2) en una caja de Petri de 35mm. Se incuban las médulas durante 15 minutos a 37°C en atmósfera de 5% CO₂. Una vez transcurrido este tiempo, se realiza dispersión mecánica con ayuda de una micropipeta P1000. Se observa bajo microscopio para revisar la evolución de la digestión, la cual es indicada por la aparición de células cromafines en el medio y porque el colágeno de la médula empieza a disolverse. Si es necesario se repite el paso de incubación y dispersión mecánica procurando que la digestión enzimática no sea llevada a cabo por más de 1 hora.

Ya que se han obtenido las células cromafines, se coloca el contenido de la caja en un tubo Falcon de 15 ml llenando con medio de incubación hasta un volumen final de 14 ml. El tubo se centrifuga a 800 rpm durante 10 minutos. Una vez transcurrida la centrifugación se elimina el sobrenadante y el *pellet* (pastilla o concentrado de células que permanece en el fondo del tubo) se resuspende en aproximadamente 250 μ L de medio de incubación y se procede a sembrar en los soportes preparados previamente colocando aproximadamente 15 μ L de la suspensión celular en cada uno de ellos. Realizado esto, se incuban durante 30 min a 37°C. Esto se realiza con el objeto de permitir la fijación de las células a los soportes. Transcurrido este tiempo, se llenan las cajas de Petri con 2 a 3ml de medio de incubación y se mantienen a 37°C durante 24 h. Después de este tiempo, las células pueden ser utilizadas para la realización de experimentos.

Digestión enzimática con colagenasa y papaína.

El primer paso en este protocolo es colocar las médulas en 1 mL de solución de dispersión con colagenasa, preparada de la misma forma que en el protocolo *Digestión enzimática con colagenasa*. En este caso, se mantienen las médulas en incubación a 37°C durante 1h y durante este tiempo, aproximadamente a 15 minutos de iniciada la digestión con colagenasa, se añaden 20 μ l de papaína (esterilizada con filtro de 0.2 μ m de diámetro) por 1 ml de solución enzimática. Ya preparada la solución enzimática con papaína se coloca en una caja de Petri de 35mm y se gasea en atmósfera de 5% CO₂ hasta que las médulas terminen la digestión con colagenasa (aprox. 45 min). Una vez que transcurre el tiempo de digestión en colagenasa, las médulas son transferidas a la solución con papaína y se mantienen en digestión aproximadamente 45 minutos. Habiendo terminado esta segunda digestión, las médulas se colocan en 1 ml de solución de inactivación para evitar que la papaína continúe actuando. Se incuban en esta solución durante 10 min a 37°C. Pasado este tiempo, se retira el sobrenadante y el *pellet* se resuspende, por dispersión mecánica con ayuda de una micropipeta, en aproximadamente 250 μ l de medio de incubación y se procede a sembrar en los

soportes preparados previamente. A partir de este punto se procede de forma similar al protocolo *Digestión enzimática con colagenasa*.

Preparación de soluciones.

C1. Solución Locke.

La solución Locke es utilizada como solución de extracción y como solución de dispersión. Una vez preparada se ajusta el pH con NaOH a 7.4 y se mide su osmolaridad, procurando mantenerla en un rango de 300-310 mOsm (condición isotónica). Al momento de usarse, se agrega glucosa en una concentración de 11mM (Tabla C1).

Tabla C1. Composición de la solución Locke.

Composición de la solución Locke (en mM)			
NaCl	KCl	HEPES	NaHCO ₃
154	5.6	10	3.6

C2. Solución de dispersión.

La solución de dispersión con colagenasa consiste en disolver en solución Locke, 3mg/ml de colagenasa y 9mg/ml de albúmina bovina. Una vez preparada la solución de dispersión, se esteriliza por filtrado con filtro de 0.2 µm de diámetro de poro.

C3. Medio de incubación.

El medio de incubación se compone de medio DMEM (Dulbecco/Vogt Modified Eagle's Minimal Essential Medium con glucosa y piruvato), 10% de suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) y 0.2% de penicilina-estreptomicina.

C4. Solución externa para registros electrofisiológicos.

La solución externa es la solución empleada en el baño o cámara de amperometría en parche. El pH es ajustado a 7.3 con NaOH a una osmolaridad de 310 mOsm. La composición se muestra en la Tabla C2.

Tabla C2. Composición de la solución externa.

Composición de la solución externa (en mM)				
NaCl	KCl	HEPES	MgCl₂	CaCl₂
144	5.9	10	1.2	2

C5. Solución interna para registros electrofisiológicos.

La solución interna es la solución empleada en la pipeta de amperometría en parche. En los experimentos realizados para estudiar el efecto del calcio sobre la excitación se utilizaron las concentraciones de 5mM y 10mM de calcio en la solución interna. Su pH se ajusta a 7.3 con NaOH y se mantiene en condiciones isotónicas. Su composición se muestra en la Tabla C3.

Tabla C3. Composición de solución de la pipeta.

	Composición de la solución interna (en mM)				
	NaCl	KCl	MgCl₂	CaCl₂	HEPES
5-Ca²⁺	140	5	1	5	10
10-Ca²⁺	140	5	1	10	10

Anexo D.

Parámetros de amperometría en parche.

D1. Equipo de amperometría en parche.

El equipo de amperometría en parche consta de diversos componentes. En la Figura D1 se muestran los principales componentes de éste sistema.

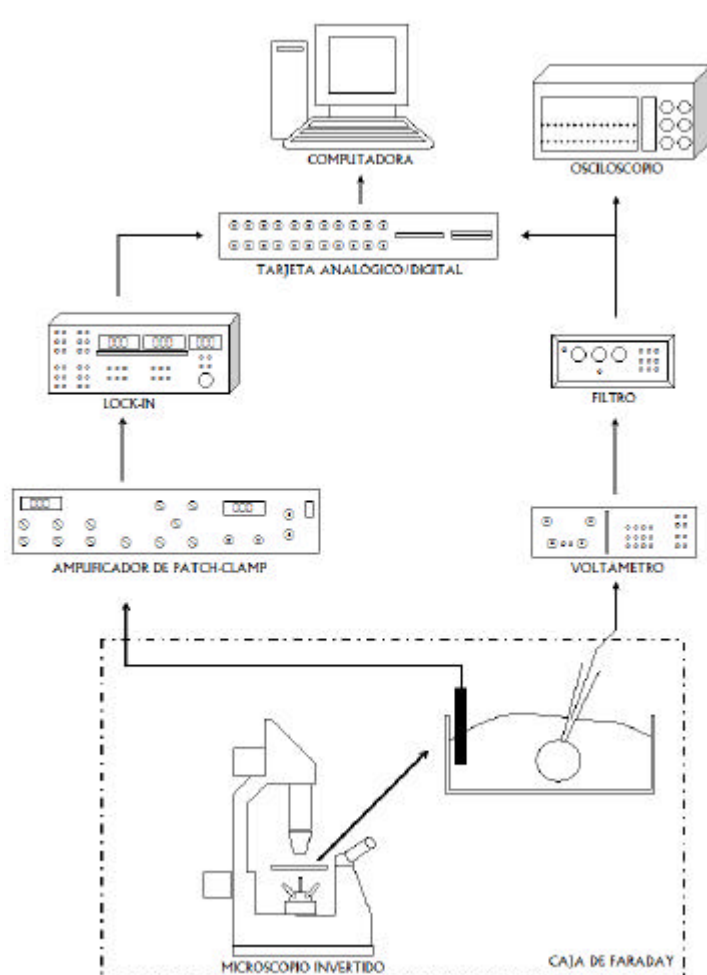


Figura D1. Esquema de los principales componentes del equipo de amperometría en parche.

En el esquema de la Figura D1 se muestran los componentes del equipo de amperometría en parche. El electrodo de amperometría es conectado a un amplificador lock-in el cual es conectado a la tarjeta analógico/digital, que permite enviar la señal a la computadora y generar el registro de la corriente amperométrica. Por otra parte, el electrodo de amperometría en parche es conectado a un amplificador de patch-clamp, el cual también envía señal a la tarjeta analógico/digital y permite que la computadora genere el registro de capacitancia. El osciloscopio se emplea para monitorear el estado del sello realizado.

D2. Parámetros de amperometría en parche.

Una vez hechas las conexiones, es necesario configurar algunos parámetros. Para el amplificador lock-in SR830 es necesario ajustar los parámetros como se muestra en la Tabla D1.

Tabla D1. Ajuste de los parámetros del amplificador Lock-in.

Variable	Ajuste
Time constant	1ms, 24 dB
Signal input	Input, A; couple, AC; ground, FLOAT
Sensitivity	1 V
Reserve	LOW NOISE
Filters	LINE & 2xLINE
Channel 1	Output X, OFFSET Off, RATIO Off, Expand Off
Channel 2	Output Y, OFFSET Off, RATIO Off, Expand Off
Interface	RS232, 8, 9600, none
Reference	Phase +120, Freq 20 kHz, Ampl. 0.5 V, Harm #1 Trig SINE, Source INTERNAL

Para el amplificador de patch clamp, EPC7 los parámetros se ajustan de acuerdo a lo indicado en la Tabla D2.

Tabla D2. Ajuste de los parámetros del amplificador de patch clamp EPC7.

Variable	Ajuste
Gain	50 mV/pA
C-Slow compensation	10 pF range
C-Slow	0.2 pF (minimum)
G-series	0.2 μ s
Series resistance compensation	Off
Filter 1	10 kHz
Filter 2	3 kHz
Stimulus scaling	0.1
Stimulus input filter TR switch	2 μ s

La ganancia (Gain) se utiliza generalmente en el valor de 50 mV/pA para obtener registros con bajo ruido. Para algunos experimentos fue ajustada a 20 mV/pA con la finalidad de evitar la saturación del sistema.

El programa utilizado para el registro en amperometría en parche fue diseñado en el laboratorio del Dr. Guillermo Álvarez de Toledo y está basado en la plataforma de IGOR Pro. Para el registro de eventos mediante el equipo de amperometría en parche es necesario utilizar el amplificador de patch clamp en el modo de voltage-clamp y ajustar en la computadora una frecuencia de muestreo de 1kHz. La frecuencia de muestreo puede ajustarse a frecuencias mayores (ej.10kHz) para lograr una mejor detección. En nuestro caso particular se hizo una prueba para determinar la frecuencia de muestreo más adecuada. Los eventos fueron registrados a una frecuencia de 1kHz pues dicha frecuencia es suficiente para el propósito de nuestra investigación.

Para mayor información a cerca de la forma de realizar conexiones e información sobre el equipo de amperometría en parche puede consultarse el artículo "Patch amperometry: high-resolution measurements of single-vesicle fusion and release" (Dernick G *et al.*, 2005).

D3. ¿Cómo se lleva a cabo un experimento de amperometría en parche?

Una vez que se han preparado tanto el microelectrodo de patch clamp como el de amperometría, estos son colocados en el "holder" y posteriormente, el "holder" es colocado en el microscopio y se conecta la manguera que permite realizar la succión para realizar el parche en la célula. Una vez montado, se llena la cámara de registro con solución externa y se coloca un cubreobjetos. Posterior a esto, se selecciona una célula y con ayuda de los micromanipuladores se aproxima la pipeta hasta hacer contacto con la superficie de la célula. Una vez realizado esto, se realiza una ligera succión a través de la manguera y con ayuda del osciloscopio se observa hasta obtener un sello de una resistencia aproximada de 1Gohm. Una vez obtenido el sello, se espera hasta que se observe secreción. Generalmente el registro termina cuando el sello se rompe. Una vez terminado el registro, se cambia la pipeta y se repite el experimento con otra célula nueva.